



**HAL**  
open science

# Acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) e prévention des dommages cérébraux induits par un stress chronique

Marie Hennebelle

## ► To cite this version:

Marie Hennebelle. Acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) e prévention des dommages cérébraux induits par un stress chronique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112064 . tel-00691980

**HAL Id: tel-00691980**

**<https://theses.hal.science/tel-00691980>**

Submitted on 27 Apr 2012

**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 11

École Doctorale Agriculture, Biologie, Environnement et Santé

**THÈSE DE DOCTORAT**

**Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

**Spécialité : Nutrition / Neurosciences**

Présentée par **Marie HENNEBELLE**

**Acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) et prévention des  
dommages cérébraux induits par un stress chronique**

**Approche *in vivo* chez le rat et *in vitro* sur la lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y et sur  
culture primaire d'astrocytes**

Directrices de thèse : Sylvie Vancassel et Isabelle Denis

INRA, Unité NuReLiCe, Jouy-en-Josas

Soutenue publiquement le 6 avril 2012

Devant le jury :

**M. Philippe Legrand**, Pr, Agrocampus Ouest, Rennes  
**M. Guillaume Ferreira**, CR, INRA, Bordeaux  
**Mme Brigitte Potier**, CR, INSERM, Paris  
**Mme Pascale Gisquet**, DR, Université Paris-Sud 11, Orsay  
**M. Mohammed Taouis**, PR, Université Paris-Sud 11  
**Mme Catherine Transler**, Unilever  
**Mme Sylvie Vancassel**, CR, INRA, Jouy-en-Josas  
**Mme Isabelle Denis**, CR, INRA, Jouy-en-Josas

**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examinatrice**  
**Examinatrice**  
**Examineur**  
**Invitée**  
**Co-directrice**  
**Co-directrice**



Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'INRA de Jouy-en-Josas au sein de l'unité de Nutrition Lipidique et Régulation des fonctions Cérébrales (NuReLiCe). Ils ont été financés par Unilever et sont ancrés dans un projet ANR ALIA NeurΩ3 (2010-2013).

*Merci à Monique Laviaille, directrice de l'unité NuReLiCe, pour m'avoir accueillie au sein de son unité.  
Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail dans votre laboratoire.*

*Un grand merci à Sylvie Vancassel et Isabelle Denis qui m'ont encadrée tout au long de ma thèse et qui ont mis en place le projet ANR ALIA NeurΩ3. Merci pour votre disponibilité et vos conseils. Merci de m'avoir guidée tout au long de ces 3 années, tout en me laissant une grande autonomie.*

Merci à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

*Merci à Philippe Legrand (Agrocampus Ouest, Rennes) et Guillaume Ferreira (INRA, Bordeaux) de me faire l'honneur d'en être les rapporteurs. Merci à Brigitte Pottier (INSERM, Centre de Psychiatrie et neurosciences Paul Broca, Paris), Pascale Gisquet (Centre de Neurosciences Paris-Sud, Orsay) et Mohammed Taouis (Centre de Neurosciences Paris-Sud, Orsay) d'être examinateurs de ce travail de thèse.*

Merci aux membres de mon comité de thèse et à l'ensemble des collaborateurs du projet de recherche ANR ALIA NeurΩ3 :

*Merci à Brigitte Potier et Jean-Marie Billard (INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences Paul Broca, Paris) pour m'avoir fait découvrir l'univers de l'électrophysiologie et de votre aide dans l'analyse des résultats et leur interprétation, ainsi que pour votre disponibilité pour répondre à toutes mes questions.*

*Merci à Pascale Gisquet (Centre de Neurosciences Paris-Sud, Orsay) pour votre accueil dans le laboratoire et vos conseils précieux dans l'élaboration puis l'analyse de la partie comportementale. Merci à Cathy pour le temps consacré à me former aux tests comportementaux alors que tu étais en pleine rédaction de mémoire. Merci à Laure pour ta participation active dans l'avancée des résultats au cours de ton année de post-doc et dans les discussions sur l'interprétation de ces derniers.*

*Merci à Unilever pour avoir financé cette étude et pour l'intérêt que vous y avez porté. Et plus particulièrement, merci à Catherine Transler qui a suivi l'avancée du projet tout au long de ces 3 années.*

Merci à l'ensemble de l'unité NuReLiCe pour votre accueil et votre gentillesse :

*Merci à Stéphanie Denis pour son aide précieuse sur la partie concernant la lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y. On pourra dire que travailler ensemble fut « en chantant ».*

*Merci à Gaëlle Champeil-Potokar pour m'avoir formée à la culture primaire d'astrocytes et aux techniques d'immunohistochimie. Merci pour ton sérieux et ta gentillesse.*

*Merci à Marielle Levillain, Claire Maudet et Patrice Dahirel pour le soin prodigué aux animaux. Contention, pesées, rations, soins, prélèvements ont fait partie intégrante de votre quotidien pendant ces 3 années de thèse ; merci pour votre aide et votre bonne humeur.*

*Merci à Emilie et Alizée, les thésardes dont j'ai eu le plaisir de partager le bureau. Merci à Alizée pour sa douceur et sa gentillesse au quotidien ; nos thèses sont pour ainsi dire « complémentaires » au sein du projet ANR et ça a été un plaisir de travailler avec toi. Merci à Emilie pour tous les échanges que l'on a pu avoir et pour ton soutien ; nous avons fait nos débuts au laboratoire ensemble et ça a été vraiment agréable de pouvoir partager cette expérience avec toi.*

*Merci à Marie-Sylvie Lallemand et Alain Linard pour leur aide dans l'analyse lipidique.*

*Merci à Marie-José Sapa, Françoise Maurice-Péroumal et Sandrine Boguais du secrétariat pour m'avoir aidée à gérer tout le côté administratif et les petits besoins au quotidien.*

*Merci aux « anciennes » ! Géraldine, Barbara et Audrey, pour votre accueil, votre soutien et vos conseils au quotidien, et pour m'avoir embrigadée dans l'aventure Doc'J.*

*Merci également à tous les stagiaires et post-doc que j'ai eu l'occasion de côtoyer de près ou de loin lors de ma thèse. Merci à Rojo, Benjamin, Perrine, Charlotte et Hélène pour votre bonne humeur et les échanges scientifiques (ou pas) que nous avons pu avoir lors de vos passages au laboratoire, mais également par la suite.*

*Merci à tous les autres membres de l'unité NuReLiCe. Merci pour les échanges que j'ai pu avoir avec vous, les conseils que vous avez pu me donner et votre gentillesse. J'ai passé de très bons moments parmi vous.*

Merci à toutes les personnes dont j'ai eu l'occasion de faire la connaissance au cours de ces 3 ans de thèse :

*Merci à tous les membres de l'association Doc'J qui se sont succédés. Merci pour cette expérience enrichissante et tous les bons moments passés ensemble.*

*Merci aux marcheurs, aux musiciens, aux choristes, aux tennismen, ... qui m'ont apporté des bouffées d'air et m'ont permis de lâcher la pression quand j'en avais besoin.*

Merci à mes proches qui m'ont accompagnée et soutenu tout au long de cette aventure :

*Merci Maman et Papa et merci le frangin. Merci d'être là pour moi quoiqu'il arrive. Merci pour le réconfort que vous m'apportez et pour le regard que vous posez sur moi.*

*Merci les amis, qui m'ont soutenue tout au long de cette expérience. Merci pour vos encouragements et les bons moments passés ensemble.*

*Enfin merci Chonchon, mon partenaire particulier. Merci pour tout. Malgré la distance, tu as été là pour moi en permanence. Tu as été d'une patience et d'un soutien incroyable. Merci pour ton amour « sans frontières » et tout le bonheur que tu m'apportes.*



**Résumé :**

L'équilibre alimentaire entre les AGPI n-6 et les AGPI n-3 joue probablement un rôle important dans le fonctionnement du système nerveux central et notamment dans la régulation de la neurotransmission. Des études suggèrent qu'une déficience en AGPI n-3 renforcerait la sensibilité des individus à des agressions de type chronique, tel que le stress ou le vieillissement.

Notre objectif était de caractériser l'impact des apports alimentaires en AGPI n-3 sur la réponse à un stress chronique. Pour cela, la régulation de paramètres biochimiques, comportementaux et électrophysiologiques par un stress chronique de contention a été évaluée chez le rat recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficients en AGPI n-3 ; équilibrés ; enrichis en AGPI-LC n-3). L'influence des glucocorticoïdes (hormones impliquées dans la réponse au stress) et des AGPI sur des fonctions cellulaires participant à la transmission synaptique a été analysée *in vitro* par des mesures de libération de neurotransmetteurs sur la lignée neuroblastique SH\_SY5Y et par l'analyse des propriétés régulatrices astrocytaires en culture primaire.

Nos résultats montrent que, chez le rat, la réponse au stress est modulée par les apports alimentaires en AGPI n-3 : la déficience en AGPI n-3 accentue la sensibilité au stress, notamment la réduction de l'activité locomotrice et la sensibilité aux environnements anxiogènes ; à l'inverse, l'enrichissement en AGPI-LC n-3 atténue la réponse au stress chronique, en réduisant la perte de poids, le pic de corticostérone plasmatique et la réponse émotionnelle. Comme le suggèrent les résultats obtenus *in vitro*, ces effets sont liés à des régulations complexes par les AGPI et les glucocorticoïdes des paramètres de libération de neurotransmetteur, de la plasticité morphologique astrocytaire et de la capacité de capture du glutamate par les astrocytes.

**Mots clés :** AGPI n-3, stress chronique, cerveau, comportement, électrophysiologie, neurones, astrocytes

**Abstract :**

Dietary balance between n-6 PUFA and n-3 PUFA probably plays a major role in the regulation of brain function. Some studies suggest that an n-3 PUFA deficiency exacerbates the sensitivity of individuals to emotional disturbances, such as chronic stress.

The aim of our work was to determine the impact of n-3 PUFA dietary intakes on stress response. The regulation of biochemical, electrophysiological and behavioural parameters by chronic restraint stress has been evaluated in rats receiving different n-3 PUFA supplies (n-3 PUFA deficient, balanced, n-3 LC-PUFA enriched). In parallel, we have conducted an *in vitro* study to characterize the effects of glucocorticoids (one of the major hormone involved in stress response) and of PUFA on the release of neurotransmitter (in human neuroblastoma SH\_SY5Y cells) and on several astrocytic properties involved in synaptic regulation (in primary culture of rat astrocytes).

In rats, we have shown that stress response is modulated by the n-3 PUFA status: the n-3 PUFA deficiency exacerbated the sensibility to stress, by aggravating the reduction of locomotor activity and the sensibility to anxiogenic environment; conversely, the n-3 LC-PUFA enrichment reduced rat responses to chronic stress, by limiting the weight loss, the increase in plasma corticosterone and the emotional response. As suggested by the results obtained *in vitro*, these effects are linked to complex influences of PUFA and glucocorticoids on the release of neurotransmitter and on astroglial morphological plasticity and glutamate uptake capacity.

**Mots clés :** n-3 PUFA, chronic stress, brain, behaviour, electrophysiology, neurons, astrocytes



## PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

### Publications scientifiques :

**Hennebelle M**, Balasse L, Latour A, Champeil-Potokar G, Denis S, Gisquet-Verrier P, Lavalie M, Denis I, Vancassel S, Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress. Soumis.

Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Lavalie M, Potier B, Billard JM, Vancassel S, Denis I, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) deficiency aggravates the age-related impairment of astroglial function and glutamatergic transmission in rat hippocampus. En préparation.

### Autres publications :

**Hennebelle M**, Omega 3 et membranes cérébrales, Juil-Août-Sept 2009, Agromag, 14 :30

### Communications affichées internationales :

*N-3 Polyunsaturated fatty acids (PUFA) deficiency aggravates the age-related alteration in glutamatergic synaptic transmission and astroglial function in rat hippocampus.* Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Vancassel S, Billard JM, Potier B, Denis I. Euroglia 2011 (Prague).

*Characterization of stress response in rats with different n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) status.* **Hennebelle M**, Latour A, Denis S, Champeil-Potokar G, Transler C, Potier B, Billard JM, Lavalie M, Denis I and Vancassel S. FENS 2010 (Amsterdam).

*Characterization of stress resistance in rats receiving different n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) supply.* **Hennebelle M**, Latour A, Denis S, Champeil-Potokar G, Transler C, Potier B, Billard JM, Lavalie M, Vancassel S and Denis I. ISSFAL 2010 (Maastrich).

*N-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency aggravates the age-related impairment of astroglial function in rats* Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Harbeby E, Guesnet P, Vancassel S, Billard JM, Renault A, Lavalie M, Denis I. FENS 2010 (Amsterdam).

### **Communications affichées nationales :**

*Characterization of stress response in rats with different n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) status.* **Hennebelle M**, Latour A, Denis S, Champeil-Potokar G, Transler C, Potier B, Billard JM, Laviaille M, Denis I and Vancassel S. Colloque IFR NeuroSud 2011 (Gif/Yvette).

*Rôle des AGPI n-3 dans les fonctions cognitives. Modulation par le stress et le vieillissement cérébral.* **Balasse L**, **Hennebelle M**, Latour A, Laviaille M, Denis I, Vancassel S, Gisquet P. Colloque IFR NeuroSud 2011 (Gif/Yvette).

*Characterization of stress resistance in rats receiving different n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) supply.* **Hennebelle M**, Latour A, Denis S, Champeil-Potokar G, Potier B, Billard JM, Laviaille M, Vancassel S, Denis I. Journées ABIES 2010 (Paris).

### **Communications orales :**

*Une déficience en Acide Gras Poly-Insaturés n-3 (AGPI n-3 ou  $\omega$ 3) aggrave les modifications astrocytaires liées au vieillissement chez le rat.* **Denis I\***, Grintal B, Latour A, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Harbeby E, Guesnet P, Vancassel S, Billard JM, Renault A, Laviaille M. Colloque IFR NeuroSud 2011 (Gif/Yvette).

*N-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) deficiency aggravates the age-related impairment of astroglial function in rat brain.* **Denis I**, Grintal G, Latour A, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Harbeby E, Guesnet P, Vancassel S, Billard JM, Renault A, Laviaille M. Journées Chevreul, Lipids and Brain II, 2011 (Paris).

*N-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency aggravates the age-related impairment of astroglial function in rat brain.* **Denis I**, Grintal B, Latour A, Champeil-Potokar G, **Hennebelle M**, Harbeby E, Guesnet P, Vancassel S, Billard JM, Renault A, Laviaille M. ISSFAL 2010 (Maastrich).

Régulation de la transmission glutamatergique au cours du stress chez le rat : influence des apports alimentaires en AGPI n-3, **Hennebelle M**, Denis I, Vancassel S. Colloque Doc'J 2008 (Jouy-en-Josas)

\* Orateur

## ABBREVIATIONS

[ <sup>3</sup> H]-NA : Noradrénaline tritiée	CREB : Cyclic AMP-Dependent Response Element Binding Protein
2-AG : 2-arachidonylglycerol	CRH : Corticotropin-Releasing Hormone
AA : Acide Arachidonique	CytP450 : Cytochrome P450
AC : Fibres Commisurales	DAAO : D-Amino Acid Oxydase
ACTH : Adreno-CorticoTrophin Hormone	Déf : Déficient en AGPI n-3
AEA : N-arachidonylethanolamine	DG : Gyrus Denté
AET : Apport Energétique Total	DHA : Acide Docosahexaénoïque
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	DMA : Diméthyl Acétal
AG : Acides Gras	DMI : Désipramine
AGMI : Acides Gras MonoInsaturés	DO : Densité Optique
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés	DPA : Acide DocosaPentaénoïque
AGPI-LC : Acides Gras Polyinsaturés à Longue Chaîne	EAAC : Excitatory Amino Acid Carrier
AGS : Acides Gras Saturés	EAAT : Excitatory Amino Acid Transporter
AGT : Acides Gras Totaux	EC : Cortex Entorhinal
ALA : Acide $\alpha$ -linoléinique	eCB : EndoCannabinoïdes
AMPA : $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate	ECL : Enhanced ChemiLuminescence
AMPC : AdenylMonoPhosphate cyclique	EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ANC : Apports Nutritionnel Conseillés	EET : Acide epoxyEicosaTriénoïque
ANR : Agence Nationale de la Recherche	EGF : Epidermal Growth Factor
AP : Anti-Protéases	Enr : Enrichi en AGPI-LC n-3
APV : DL-2-amino-5-phosphonoralenat	EPA : Acide Eicosapentaénoïque
AQP : Aquaporine	Eq : Equilibrés en AGPI n-6 et n-3
BDNF : Brain Derived Neurotrophin Factor	ERK : Extracellular Receptor Kinase
BSA : Bovine Serum Albumine	FABP : Fatty Acid Binding Protein
C100nM : Corticostérone 100nM	FABPpm : Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein
CA : Corne d'Ammon	FAO : Food and Agricultural Organization
CaMKII : Protéine Kinase	FAT : Fatty Acid Translocase
Calcium/Calmoduline-Dépendante II	FAT4 : Fatty Acid Transporter 4
COX : Cyclo-Oxygénase	FATP : Fatty Acid Transport Protein
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse	FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
	FITC : FluoresceinIsoThioCyanate

GC : Glucocorticoïdes

GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GLAST : Glutamate Aspartate Transporter

GLT-1 : Glutamate Transporter 1

GLUT-1 : Glucose Transporter 1

GR : Récepteur aux Glucocorticoïdes

GRE : Element de Réponse aux Glucocorticoïdes

GS : Glutamine Synthétase

HAM-F12 : Ham's Nutrient Mixture F-12

HETE : Hydroxy-Eicosa-Tetra-Enoïque

HHS : Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien

i/o : Input/Output

IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate

KA : Récepteurs Kainate

LA : Acide Linoléique

LOX : Lipoxygénase

LPP : Voies Perforantes Latérales

LT : Leucotriènes

LTD : Dépression à Long-Terme

LTP : Potentialisation à Long-Terme

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MEM : Milieu Essentiel Minimum

MEME : Minimum Essential Medium Eagle

mGluR : Récepteurs Métabotropiques du Glutamate

MPP : Voies Perforantes Médiales

MR : Récepteur aux Minéralocorticoïdes

NA : Noradrénaline

NET : NorEpinephrine Transporter

NGF : Nerve Growth Factor

NMDA : N-methyl-D-aspartate

SNAPs : Soluble NSF Accessory Protein

NPD1 : Neuroprotectine D1

NS : Non Stressés

NSF : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive Factor

OH-C : Hydro-Cortisone

PBS : Phosphate saline Buffer

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PG : Prostaglandine

PKA : Protéine Kinase A

PKC : PhosphoKinase C

PL : PhosphoLipides

PLA2 : Phospholipase A2

PLD : PhosphoLipase D

PPAR : Peroxysomal Proliferator Activated Receptor

PPF : Paired-Pulse Facilitation

PPSE : Potentiel Post-synaptique Excitateur

PS : PhosphatidylSérine

PTGS : Prostaglandin-endoperoxide Synthase

P-Tyr : Phospho-Tyrosine

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

PVN : Noyau ParaVentriculaire

QI : Quotient Intellectuel

RE : Réticulum Endoplasmique

RIPA : Radio-ImmunoPrecipitation Assay

RXR : retinoid X receptor

S : Stressés

Sb : Subiculum

SC : Collatérales de Schaeffer

SEM : Ecart Standard à la Moyenne

SM : SphingoMyéline

SM : Sec1/Munc-18 like

SNAP25 : Synaptosomal-Associated Protein 25kDa

SNC : Système Nerveux Central

SR : Sérine Racémase

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein

Stx1a : Syntaxine 1a

SVF : Sérum de Veau Foetal

Syn : Synapsine

Syp : SynaptoPhysine

Syt 1 : SynaptoTagmine 1

TBST : Tris Buffered Saline Tween 20

TLDA : Taqman Low Density Array

TPA : 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-Acétate

TX : Thromboxanes

VA : Volée Afférente

VAMP : Vesicle-Associated Membrane Protein

V-Glut : Transporteur Vésiculaire du Glutamate

Vim : Vimentine

Vit E : Vitamine E



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>15</b>
<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>23</b>
<b>Partie 1 : Les acides gras polyinsaturés (AGPI), molécules indispensables au bon fonctionnement du système nerveux central (SNC) .....</b>	<b>25</b>
<b>I. Contexte nutritionnel de l'étude .....</b>	<b>25</b>
I.1 Définition des AGPI.....	25
<i>I.1.1 Les acides gras .....</i>	<i>25</i>
<i>I.1.2 Les 2 principales séries d'AGPI.....</i>	<i>25</i>
I.2 Déséquilibre alimentaire des populations occidentales .....	29
<i>I.2.1 Sources alimentaires en AGPI .....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.2 Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) .....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.3 Etudes épidémiologiques de consommation .....</i>	<i>31</i>
<b>II. AGPI n-3 et cerveau .....</b>	<b>33</b>
II.1 Statut lipidique particulier du cerveau.....	33
<i>II.1.1 Composition lipidique cérébrale générale .....</i>	<i>33</i>
<i>II.1.2 Spécificités régionales et cellulaires .....</i>	<i>34</i>
II.2 Importance des apports alimentaires durant la période périnatale.....	35
<i>II.2.1 Incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales .....</i>	<i>35</i>
<i>II.2.2 Conséquence d'une déficience ou d'une supplémentation en AGPI n-3 alimentaires sur la composition lipidique cérébrale .....</i>	<i>36</i>
II.3 AGPI et fonctionnement cérébral .....	37
<b>III. Mécanismes d'action des AGPI dans le cerveau .....</b>	<b>37</b>
III.1 Rôle structural .....	39
<i>III.1.1 Les AGPI dans les phospholipides membranaires.....</i>	<i>39</i>
<i>III.1.2 Mécanismes d'action des AGPI membranaires .....</i>	<i>39</i>
III.2 Action des AGPI libres .....	41
<i>III.2.1 Libération des AGPI membranaires .....</i>	<i>41</i>
<i>III.2.2 Synthèse de médiateurs oxygénés et inflammation.....</i>	<i>43</i>
<i>III.2.3 Régulation de la transcription .....</i>	<i>44</i>

<b>Partie 2 : La synapse tripartite glutamatergique .....</b>	<b>47</b>
<b>I. Présentation de la synapse tripartite glutamatergique .....</b>	<b>47</b>
I.1 Généralités .....	47
I.1.1 Définition .....	47
I.1.2 La neurotransmission glutamatergique dans l'hippocampe .....	49
I.2 Le cycle du glutamate dans la synapse.....	51
I.2.1 Synthèse et libération du glutamate au niveau du neurone pré-synaptique .....	51
I.2.2 Capture et recyclage du glutamate .....	52
<b>II. La neurotransmission glutamatergique : mécanismes neuronaux .....</b>	<b>53</b>
II.1 Mécanismes pré-synaptiques de la neurotransmission.....	53
II.1.1 Transport vésiculaire du glutamate.....	53
II.1.2 La libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique.....	55
II.1.3 Régulation des phénomènes présynaptiques par les AGPI.....	57
II.2 Récepteurs post-synaptiques et plasticité cérébrale .....	59
II.2.1 Récepteurs post-synaptiques du glutamate .....	59
II.2.2 Plasticité synaptique.....	63
II.2.3 Modulation de la plasticité cérébrale par les AGPI .....	68
<b>III. La régulation astrocytaire de la neurotransmission glutamatergique.....</b>	<b>71</b>
III.1 Le réseau astrocytaire : définition et fonctions .....	71
III.1.1 Généralités sur les astrocytes .....	71
III.1.2 Principales fonctions astrocytaires .....	73
III.1.3 Le double jeu des astrocytes : Docteur Jekyll et Mister Hyde .....	79
III.2 Rôle des AGPI dans le fonctionnement astrocytaire.....	80
<b>Partie 3 : Le stress chronique .....</b>	<b>83</b>
<b>I. La réponse au stress : Définitions et description des différents acteurs .....</b>	<b>83</b>
I.1 Définition et description de la réponse au stress.....	83
I.2 Les différents circuits impliqués .....	85
I.2.1 La réponse d'urgence : le système nerveux sympathique .....	85
I.2.2 L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) .....	85
I.2.3 La régulation de la réponse au stress par le système limbique .....	87
I.3 Les glucocorticoïdes (GCs) .....	88
I.3.1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau cérébral .....	89
I.3.2 Deux modes d'action complémentaires .....	89
I.4 Modèle de stress chronique.....	93
I.4.1 Spécificité du stress chronique versus le stress aigu.....	93

1.4.1	<i>Modèle du stress chronique de contention</i>	94
<b>II.</b>	<b>Impact d'un stress chronique sur le comportement animal et le fonctionnement cérébral</b>	<b>95</b>
II.1	Modulation des paramètres de la neurotransmission glutamatergique	95
II.1.1	<i>Modulation structurale des neurones</i>	95
II.1.2	<i>Modulation de la libération pré-synaptique de glutamate</i>	96
II.1.3	<i>Modulation de la plasticité synaptique</i>	97
II.2	Impact du stress sur la régulation astrocytaire de la neurotransmission glutamatergique	98
II.2.1	<i>Modulation structurale des astrocytes</i>	98
II.2.2	<i>Modulation des capacités de capture et recyclage du glutamate</i>	98
II.3	Modifications comportementales	99
II.3.1	<i>Modulation de la locomotion</i>	99
II.3.2	<i>Modulation de la réponse émotionnelle</i>	100
II.3.3	<i>Modulation des capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiale</i>	101
<b>III.</b>	<b>Rôle protecteur des AGPI face aux altérations cérébrales liées au stress chronique</b>	<b>102</b>
III.1	Les endocannabinoïdes	102
III.2	Les AGPI n-3	103
<b>OBJECTIFS</b>		<b>105</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>		<b>111</b>
<b>Partie 1 : Caractérisation de la réponse au stress de rats Wistar recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3</b>		<b>113</b>
<b>I. Modèle animal</b>		<b>113</b>
I.1.	Conditions d'élevage	113
I.2.	Protocoles alimentaires	113
I.3.	Protocole de stress de contention	115
I.4.	Sacrifices des animaux et prélèvements des structures cérébrales	115
<b>II. Mesures de paramètres physiologiques</b>		<b>117</b>
II.1.	Croissance pondérale et prise alimentaire	117
II.2.	Dosage de la corticostérone plasmatique	117
II.2.1	<i>Prélèvements du plasma</i>	117
II.2.2	<i>Dosage de la concentration plasmatique de corticostérone</i>	117
<b>III. Etude comportementale</b>		<b>119</b>
III.1.	Mesure de l'activité locomotrice	119
III.1.1	<i>Openfield</i>	119

III.1.2 Test d'actimétrie .....	119
III.2. Réponse émotionnelle .....	121
III.2.1 Labyrinthe en croix surélevé ( <i>Elevated Plus Maze</i> ).....	121
III.2.2 Test de préférence au sucrose .....	123
III.2.3 Peur conditionnée à un son .....	123
III.2.4 Réaction au sursaut .....	125
III.3. Apprentissage : Labyrinthe de Barnes.....	125
III.3.1 Principe général .....	125
III.3.2 Acquisition .....	126
III.3.3 Rétention .....	126
III.3.4 Flexibilité.....	127
<b>IV. Mesures électrophysiologiques.....</b>	<b>129</b>
IV.1. Préparation des tranches d'hippocampe.....	129
IV.1.1 Dissection .....	129
IV.1.2 Mise en place des électrodes.....	129
IV.2. Transmission synaptique basale .....	131
IV.2.1 Courbe intensité-réponse ( <i>Input-Output</i> ).....	131
IV.2.2 <i>Paired-Pulse Facilitation (PPF)</i> .....	131
IV.3. Plasticité synaptique .....	132
IV.3.1 <i>Potentialisation à Long Terme (LTP)</i> .....	132
IV.3.2 <i>Dépression à long terme (LTD)</i> .....	132
<b>V. Taqman Low Density Array (TLDA) .....</b>	<b>132</b>
V.1. Récupération des échantillons et extraction des ARN totaux .....	132
V.2. Rétrotranscription.....	135
V.3. TLDA .....	135
V.4. Normalisation et analyse des résultats .....	137
<b>Partie 2 : Etude mécanistique sur des modèles <i>in vitro</i> .....</b>	<b>139</b>
<b>I. Culture de la lignée de neuroblastomes humains SH-SY5Y .....</b>	<b>139</b>
I.1. Présentation du modèle.....	139
I.2. Conditions de culture .....	139
I.2.1 <i>Etude des effets d'une supplémentation en AGPI</i> .....	141
I.2.2 <i>Etude des effets des glucocorticoïdes</i> .....	141
I.3. Estimation du captage de noradrénaline tritiée ( $[^3\text{H}]\text{-NA}$ ) par les cellules SH_SY5Y .....	141
I.4. Mesure de la libération de noradrénaline tritiée ( $[^3\text{H}]\text{-NA}$ ) par les cellules SH_SY5Y.....	143
<b>II. Culture primaire d'astrocytes issus de rats nouveaux nés .....</b>	<b>144</b>

II.1.Culture primaire d'astrocytes.....	144
II.1.1 Mise en culture primaire des astrocytes de rats.....	144
II.1.2 Culture secondaire.....	145
II.1.3 Supplémentation en AGPI et/ou Vitamine E.....	147
II.1.4 Traitement aux glucocorticoïdes.....	147
II.2.Mesure de la capture astrocytaire du glutamate.....	148
II.2.1 Protocole expérimental de mesure de la capture du glutamate.....	148
II.2.2 Comptage de la radioactivité et analyse des résultats.....	148
II.2.3 Dosage de Bradford.....	149
II.3. Etude de la morphologie astrocytaire par immunomarquage.....	149
II.3.1 Préparation de la culture d'astrocytes.....	149
II.3.2 Protocole d'immunomarquage.....	149
II.3.3 Analyse des images.....	153
<b>Partie 3 : Techniques communes aux études <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>.....</b>	<b>153</b>
<b>I. Analyse de la composition lipidique membranaire.....</b>	<b>153</b>
I.1 Extraction des lipides totaux.....	153
I.2 Séparation des principales classes de phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) et phosphatidylserine (PS).....	155
I.3 Préparation des esters méthyliques d'acides gras.....	156
I.4 Chromatographie en phase gazeuse.....	157
<b>II. Analyse semi-quantitative de marqueurs protéiques du stress et de la synapse glutamatergique par Western Blotting.....</b>	<b>159</b>
II.1 Préparation des échantillons.....	159
II.2 Dosage des protéines par la méthode DC Assay.....	161
II.3 Migration et transfert.....	161
II.4 Hybridation et Immunodétection.....	163
<b>V. Analyse statistique.....</b>	<b>164</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>165</b>
<b>Partie 1 : Effet des apports en AGPI et du stress sur la composition lipidique des membranes cellulaires.....</b>	<b>167</b>
<b>I. Analyse de la composition lipidique au niveau du cortex frontal de rat (étude <i>in vivo</i>).....</b>	<b>167</b>
I.1. Caractérisation générale des différentes classes de phospholipides.....	167
I.2. Impact du régime alimentaire.....	168
I.3. Impact du stress de contention.....	173

<b>II. Etude de la composition lipidique des membranes cellulaires sur des modèles de culture <i>in vitro</i></b>	<b>175</b>
.....	
II.1. Culture primaire d'astrocytes de rats.....	175
II.1.1 <i>Caractérisation des cellules témoins (Vitamine E)</i> .....	180
II.1.2 <i>Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique des membranes astrocytaires</i> ..	180
II.1.3 <i>Impact de la corticostérone sur la composition lipidique des membranes astrocytaires</i> ...	183
II.2. Lignées cellulaires de neuroblastomes humains SH_SY5Y.....	183
II.2.1 <i>Caractérisation des cellules témoins</i> .....	185
II.2.2 <i>Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique des membranes neuronales (Tableau 17)</i> .....	185
II.2.3 <i>Impact de l'OH-C 100nM sur la composition lipidique des membranes neuronales</i> .....	186
<b>Partie 2 : Effet du statut en AGPI n-3 sur la réponse au stress chez le rat</b> .....	<b>189</b>
<b>I. Etudes des marqueurs du stress</b> .....	<b>189</b>
I.1. Croissance pondérale et prise alimentaire.....	189
I.1.1 <i>Croissance pondérale de la naissance à l'âge adulte</i> .....	189
I.1.2 <i>Evolution du poids au cours du stress de contention</i> .....	189
I.2. Dosage de la corticostérone plasmatique.....	191
I.2.1 <i>Impact du régime alimentaire sur le taux basal de corticostérone plasmatique</i> .....	191
I.2.2 <i>Evolution du taux de corticostérone plasmatique au cours des 21 jours de contention</i> .....	191
I.3. Analyse des récepteurs aux corticostéroïdes.....	191
<b>II. Etude comportementale</b> .....	<b>193</b>
II.1. Mesure de l'activité locomotrice .....	193
II.1.1 <i>Openfield</i> .....	193
II.1.2 <i>Cyclotron</i> .....	193
II.2. Réponse émotionnelle .....	195
II.2.1 <i>Mesure du temps de toilettage dans l'openfield</i> .....	195
II.2.2 <i>Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze)</i> .....	195
II.2.3 <i>Test de préférence au sucrose</i> .....	197
II.2.4 <i>Peur conditionnée</i> .....	197
III.2.5 <i>Réaction de sursaut</i> .....	199
II.3. Apprentissage : Labyrinthe de Barnes.....	201
II.3.1 <i>Apprentissage spatial</i> .....	201
III.3.2 <i>Rétention</i> .....	201
III.3.3 <i>Flexibilité Comportementale : Adaptation des animaux à un changement de consigne</i> ..	203
<b>III. Etude de la transmission synaptique et de la plasticité cérébrale</b> .....	<b>207</b>

III.1. Transmission synaptique de base .....	207
III.1.1 Courbe d'intensité-réponse (Input-Output) .....	207
III.1.2 Paired-Pulse Facilitation (PPF).....	209
III.1.3 Analyse de l'expression protéique des transporteurs vésiculaires du glutamate.....	209
III.2. Plasticité synaptique.....	211
III.2.1 Potentialisation à Long Terme (LTP).....	211
III.2.2 Dépression à Long Terme (LTD).....	213
<b>IV. Analyse de l'expression génique de marqueurs du stress et du fonctionnement synaptique ...</b>	<b>215</b>
IV.1. Facteurs de croissance (BDNF, EGF, FGF2, GDNF, NGF).....	215
IV.2. Récepteurs du glutamate.....	217
IV.2.1 Récepteurs ionotropiques du glutamate (AMPA et NMDA).....	217
IV.2.2 Récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR 1 à 8 ou Grm 1 à 8).....	217
IV.3. Transporteurs du glutamate .....	217
IV.3.1 Transporteurs vésiculaires du glutamate (V-Glut 1 et 2) .....	217
IV.3.2 Transporteurs astrocytaires du glutamate (GLAST et GLT-1).....	219
IV.4. Marqueurs de l'exocytose.....	219
IV.5. Récepteurs aux corticoïdes (GR et MR) .....	219
IV.6. Marqueurs du métabolisme lipidique.....	220
IV.6.1 Facteurs de transcription (PPARs) .....	220
IV.6.2 Phospholipases A2 (PLA <sub>2</sub> ) .....	220
IV.6.3 Cyclooxygénase (COX2) et lipoxygénases (Alox 5, 12 et 15) .....	220
IV.7. Autres marqueurs .....	220
IV.7.1 Marqueurs astrocytaires : Sérine Racémase (SRR), Glutamine Synthase (Glu), S100 $\beta$ , GFAP et Vimentine .....	220
IV.7.2 Marqueurs neuronaux : Map2 .....	221
<b>Partie 3 : Etude de la modulation de libération de noradrénaline par les AGPI et par les glucocorticoïdes sur un modèle de neuroblastomes humains SH_SY5Y .....</b>	<b>223</b>
<b>I. Mesure de la libération de noradrénaline en conditions basale et stimulées .....</b>	<b>223</b>
<b>II. Etude de l'effet-dose des AGPI sur la capture et la libération de noradrénaline .....</b>	<b>223</b>
II.1. Effet de la supplémentation en AGPI pendant 72h sur la capture de noradrénaline.....	225
II.2. Effet de la supplémentation en AGPI pendant 72h sur la libération de noradrénaline.....	225
II.2.1 Etude de la libération basale .....	225
II.2.2 Etude de la libération stimulée au KCl 105mM .....	225
II.2.3 Etude de la libération stimulée au Carbachol 1mM .....	225

<b>III. Etude des effets croisés d'une supplémentation en AGPI et d'un traitement par l'hormone du stress (hydrocortisone, OH-C) .....</b>	<b>227</b>
III.1. Mesure de la capture de noradrénaline.....	227
III.2. Mesure de la libération de noradrénaline : effet de l'hydrocortisone sur cellules témoins ...	227
III.3. Mesure de la libération de noradrénaline : effet croisé de l'hydrocortisone et d'une supplémentation en AGPI pendant 72h.....	229
III.3.1 Etude de la libération basale .....	229
III.3.2 Etude de la libération stimulée au KCl 105mM .....	229
III.3.3 Etude de la libération stimulée au Carbachol 1mM .....	229
<b>Partie 4 : Etude de la modulation du fonctionnement astrocytaire par les AGPI et les glucocorticoïdes sur un modèle de culture primaire d'astrocytes de rats nouveau-nés .....</b>	<b>233</b>
<b>I. Etude morphologique des astrocytes en culture par immunohistochimie .....</b>	<b>233</b>
I.1. Impact de la corticostérone sur la morphologie astrocytaire.....	237
I.2. Impact de l'enrichissement en AGPI sur la morphologie astrocytaire .....	237
I.3. Effet combiné de la corticostérone et des AGPI sur la morphologie astrocytaire .....	239
<b>II. Etude des récepteurs aux glucocorticoïdes .....</b>	<b>241</b>
II.1. Localisation des différents types de récepteurs par immunohistochimie.....	241
II.2. Etude de l'expression protéique de GR par Western Blot .....	243
<b>III. Etude des capacités de capture du glutamate .....</b>	<b>245</b>
III.1. Impact d'un traitement en C100nM sur les capacités de capture du glutamate en fonction de la supplémentation en sérum et/ou Vitamine E du milieu .....	245
III.1. Impact croisé des AGPI et de la C100nM sur les capacités de capture du glutamate par les astrocytes en culture.....	247
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>249</b>
<b>Partie 1 : Modulation de la composition lipidique membranaire des différents partenaires cellulaires.....</b>	<b>252</b>
<b>I. Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique membranaire cellulaire.....</b>	<b>252</b>
I.1 Modulation de la composition lipidique cérébrale par les apports alimentaires en AGPI n-3 chez le rat .....	252
I.2 Modulation de la composition lipidique membranaire par les apports en AGPI sur les modèles cellulaires.....	253
<b>II. Impact du stress sur la composition lipidique membranaire cellulaire .....</b>	<b>255</b>
II.1 Modulation de la composition lipidique corticale chez le rat .....	255

II.1.1	<i>Le stress chronique de contention réduit la proportion en AGPI n-3 des membranes cérébrales chez les rats équilibrés</i>	255
I.2.1	<i>L'impact du stress sur la composition lipidique cérébrale est modulé par le régime alimentaire</i>	256
II.2	<b>Modulation de la composition lipidique membranaire cellulaire dans les modèles cellulaires</b>	257
II.2.1	<i>La corticostérone favorise une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans la culture primaire d'astrocytes</i>	257
II.2.2	<i>L'hydrocortisone favorise l'incorporation des AGPI dans les lignées de neuroblastomes humains SH_SY5Y</i>	258
<b>Partie 2 : Modulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI n-3 chez le rat</b>		<b>259</b>
<b>I. Caractérisation des effets du stress chronique de contention chez les rats équilibrés</b>		<b>260</b>
I.1	<i>Le stress chronique de contention module la croissance pondérale et la concentration plasmatique de corticostérone</i>	260
I.2	<i>Le stress chronique de contention module le comportement émotionnel, mais pas les capacités d'apprentissage</i>	262
I.2.1	<i>L'activité locomotrice est réduite chez les rats stressés</i>	262
I.2.2	<i>La réponse émotionnelle des rats est modulée chez les rats stressés</i>	263
I.2.3	<i>Les capacités d'apprentissage dans le labyrinthe de Barnes sont maintenues chez les rats stressés</i>	265
I.3	<i>Le stress chronique de contention module les paramètres électrophysiologiques</i>	266
I.3.1	<i>La probabilité de libération pré-synaptique de glutamate est réduite chez les rats stressés</i>	266
I.3.2	<i>La plasticité synaptique, en particulier la LTP, est modulée chez les rats stressés</i>	268
I.4	<i>Le stress chronique de contention module l'expression génique de certains marqueurs de la synapse tripartite glutamatergique</i>	269
I.4.1	<i>L'expression génique de BDNF est augmentée chez les rats stressés</i>	269
I.4.2	<i>L'expression génique du récepteur métabotrope du glutamate mGlu7 est augmentée chez les rats stressés</i>	271
I.4.3	<i>L'expression génique de la syntaxine 1a est augmentée chez les rats stressés</i>	271
I.4.4	<i>L'expression génique du facteur de transcription PPARδ est augmentée chez les rats stressés</i>	272
I.4.5	<i>L'expression génique de la vimentine, marqueur du cytosquelette des astrocytes, est augmentée chez les rats stressés</i>	273

1.4.6 L'expression génique des autres marqueurs étudiés de la synapse tripartite glutamatergique n'est pas modulée par le stress chronique de contention .....	274
<b>II. Modulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI .....</b>	<b>277</b>
II.1 Perte de poids corporel et pic de concentration plasmatique de corticostérone induites par le stress chronique de contention.....	277
11.1.1 La perte de poids liée au stress chronique est réduite chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 .....	277
11.1.2 Le pic de corticostérone plasmatique induit par le stress de contention est réduit chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, sans modification de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR) .....	278
II.2 Comportement émotionnel et capacités d'apprentissage spatial .....	279
11.2.1 Activité locomotrice et réponse émotionnelle .....	279
11.2.2 Apprentissage spatial .....	282
II.3 Paramètres électrophysiologiques.....	283
11.3.1 L'enrichissement en AGPI-LC n-3 module l'efficacité synaptique et la probabilité de libération pré-synaptique de glutamate et cet effet est inhibé par le protocole de stress .....	283
11.3.2 L'impact du stress sur la plasticité synaptique est indépendant des apports en AGPI n-3 .....	285
II.4 Modulation de l'expression génique des marqueurs étudiés.....	285
11.4.1 La déficience ou l'enrichissement du régime alimentaire en AGPI n-3 ont des effets similaires à ceux du stress chronique .....	285
11.4.2 Effets propres du stress chronique de contention et des apports alimentaires en AGPI n-3 .....	288
11.4.3 Absence d'effet du stress chronique de contention et des apports alimentaires en AGPI n-3 .....	290
<b>Partie 3 : Impact des AGPI et du stress sur les partenaires de synapse tripartite : neurones et astrocytes (études <i>in vitro</i>) .....</b>	<b>292</b>
<b>I. Modulation des propriétés de la lignée cellulaire de neuroblastomes humains par les apports en AGPI et l'hydrocortisone.....</b>	<b>292</b>
I.1 La libération de noradrénaline par les cellules SH_SY5Y est modulée de manière dose-dépendante par les AGPI.....	293
I.2 La libération de noradrénaline par les cellules SH_SY5Y est modulée par l'hydrocortisone et les apports en AGPI.....	296
1.2.1 L'hydrocortisone réduit la capture de noradrénaline par les cellules SH_SY5Y, indépendamment de leur statut en AGPI .....	296
1.2.2 L'hydrocortisone réduit la libération basale de noradrénaline par les cellules SH_SY5Y ....	297

1.2.3 Les effets de l'hydrocortisone sont dépendants du statut lipidique des membranes cellulaires.....	297
<b>II. Modulation des propriétés d'astrocytes en culture primaire par les apports en AGPI et le stress</b>	<b>300</b>
II.1 La corticostérone modifie la morphologie des astrocytes en culture et cet effet est modulé par le statut lipidique des cellules .....	300
II.1.1 La corticostérone favorise une morphologie pavimenteuse des astrocytes.....	300
II.1.2 La morphologie astrocytaire est modifiée en fonction du statut lipidique des cellules .....	302
II.1.3 L'impact de la corticostérone sur l'organisation morphologique des astrocytes est modulée par les apports en AGPI .....	303
II.2 Les apports en AGPI et la corticostérone modifient l'expression et la localisation des récepteurs aux glucocorticoïdes.....	304
II.2.1 Le traitement à la corticostérone réduit l'expression de GR et favorise sa translocation vers le noyau .....	304
II.2.2 Les AGPI (DHA et AA), malgré une réduction de l'expression de GR, ne modifient pas la réponse à la corticostérone .....	305
II.3 L'impact de la corticostérone sur les capacités de capture du glutamate des astrocytes est inhibé par les AGPI .....	305
II.3.1 la corticostérone stimule la capture de glutamate par les astrocytes .....	305
II.3.2 Les AGPI, DHA et AA, inhibent l'effet de la corticostérone .....	306
<b>CONCLUSION/PERSPECTIVES .....</b>	<b>309</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>315</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>383</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure et nomenclature des acides gras polyinsaturés (AGPI) .....	24
Figure 2 : Voie de bioconversion des principales familles d'acides gras polyinsaturés .....	26
Figure 3 : Composition moyenne en acides gras des principales huiles végétales de consommation .	28
Figure 4 : Teneur des principaux AGPI des phospholipides des membranes du cortex cérébral .....	32
Figure 5 : Principaux modes d'action des AGPI dans la physiologie cellulaire.....	38
Figure 6 : Synthèse des principaux dérivés oxygénés dans le cerveau .....	42
Figure 7 : Présentation des principales cellules gliales .....	46
Figure 8 : Voies hippocampales glutamatergiques .....	48
Figure 9 : Schéma récapitulatif du cycle du glutamate au sein de la synapse tripartite.....	50
Figure 10 : Etapes du processus d'exocytose.....	54
Figure 11 : Formation du complexe SNARE.....	56
Figure 12 : Principe général d'action des récepteurs ionotropiques et métabotropiques.....	60
Figure 13 : Mécanismes impliqués dans le processus de LTP NMDA-dépendante.....	64
Figure 14 : Mécanismes impliqués dans les processus de LTD NMDA- et mGluR-dépendante.....	66
Figure 15 : Représentation schématique du réseau astrocytaire .....	70
Figure 16 : Schéma simplifié du couplage neuro-métabolique entre neurones et astrocytes .....	72
Figure 17 : La gliotransmission .....	76
Figure 18 : Le double jeu des astrocytes .....	78
Figure 19 : Axe corticotrope .....	84
Figure 20 : Structures du système limbique.....	86
Figure 21 : Action génomique lente des glucocorticoïdes .....	90
Figure 22 : Action des glucocorticoïdes selon une courbe en U-inversé .....	92
Figure 23 : Schéma récapitulatif des protocoles alimentaires et du protocole de stress.....	114
Figure 24 : Zones cérébrales d'intérêt pour l'étude.....	116
Figure 25 : Dispositif de l'openfield.....	118
Figure 26 : Dispositif du test d'actimétrie .....	118
Figure 27 : Dispositif du labyrinthe en croix surélevé .....	120
Figure 28 : Protocole conditionnement et d'extinction d'une peur conditionnée .....	122
Figure 29 : Dispositif du labyrinthe de Barnes .....	124
Figure 30 : Mise en place des électrodes au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe pour les mesures électrophysiologiques .....	128
Figure 31 : Réponse enregistrée suite à une stimulation électrique unique .....	130
Figure 32 : Taqman Low Density Array (TLDA) ou cartes microfluidiques (Applied Biosystem).....	136

Figure 33 : Culture de lignées de neuroblastomes humains SH_SY5Y .....	138
Figure 34 : Protocole général de la mesure de la libération de [ <sup>3</sup> H]-NA par les cellules SH_SY5Y .....	142
Figure 35 : Culture primaire d'astrocytes issus de rats nouveaux-nés.....	146
Figure 36 : Principe général de l'analyse de la composition lipidique .....	152
Figure 37 : Allure général d'un chromatogramme obtenu suite au passage d'échantillon d'éthers méthyliques en CPG .....	158
Figure 38 : Principe général de l'analyse protéique par Western Blot .....	160
Figure 39 : Croissance pondérale des rats de la naissance à l'âge de 6 mois .....	188
Figure 40 : Variation de poids des rats au cours de la période de stress de contention .....	188
Figure 41 : Evolution de la concentration de corticostérone plasmatique mesurée 30 minutes après la mise en contention des rats au fil des 21 jours de stress .....	190
Figure 42 : Expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et MR au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe chez le rat.....	190
Figure 43 : Activité globale et temps de toilettage mesurés lors d'un test d'openfield.....	192
Figure 44 : Nombre d'entrées dans les différents compartiments sur le labyrinthe en croix surélevé .....	194
Figure 45 : Evolution du temps de « freezing » mesuré au cours de la phase d'acquisition et des 2 jours d'extinction d'une peur conditionnée.....	198
Figure 46 : Amplitude du sursaut au son de 120 dB observé chez les rats.....	198
Figure 47 : Latence et nombre d'erreurs effectuées avant d'entrer dans l'issue mesurés lors de la phase l'apprentissage spatial sur le labyrinthe de Barnes .....	200
Figure 48 : Latence et nombre d'erreurs effectuées avant d'entrer dans l'issue mesurés lors du changement de consignes sur le labyrinthe de Barnes.....	202
Figure 49 : Courbes d'intensité-réponse mesurées sur des tranches d'hippocampe de rats.....	206
Figure 50 : Paired-Pulse Facilitation (PPF) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats .....	208
Figure 51 : Expression protéique des récepteurs transporteurs vésiculaires du glutamate V-Glut 1 et 2 au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe des rats.....	208
Figure 52 : Potentialisation à Long Terme (LTP) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats ...	210
Figure 53 : Dépression à Long Terme (LTD) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats.....	212
Figure 54 : Effet du régime alimentaire sur l'expression génique de différents marqueurs au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe .....	216
Figure 55 : Impact du protocole de stress sur l'expression génique de différents marqueurs au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe .....	218
Figure 56 : Pourcentage de libération basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM de NA des cellules SH_SY5Y en condition témoin.....	222

Figure 57 : Libération de NA basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM par les cellules SH_SY5Y supplémentées d'AGPI (DHA, AA, EPA) pendant 72h .....	224
Figure 58 : Libération basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM par les cellules SH_SY5Y supplémentées en AGPI (DHA et AA) pendant 72h et/ou d'OH-C 100nM.....	228
Figure 59 : Immuno-marquage de la GFAP (filaments intermédiaires du cytosquelette) sur les astrocytes en culture primaire .....	234
Figure 60 : Immuno-marquage de l'ézrine (filopodes périphériques) sur les astrocytes en culture primaire.....	235
Figure 61 : Immuno-marquage de l'actine (cytosquelette) et P-Tyr (activation des complexes d'adhérence focale) sur les astrocytes en culture primaire.....	236
Figure 62 : Evolution de la morphologie (marquage GFAP) des astrocytes supplémentés en DHA 30µM en fonction du temps d'exposition à la corticostérone.....	238
Figure 63 : Immuno-marquage des récepteurs aux glucocorticoïdes GR sur les astrocytes en culture primaire .....	240
Figure 64 : Expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes GR sur les astrocytes en culture primaire .....	242
Figure 65 : Capacité de capture du glutamate des astrocytes cultivés dans différentes conditions de culture (0%SVF, 0,65%SVF, 1% SVF, Vitamine E) et/ou de Corticostérone 100nM pendant 1h (A.), 24h (B.), ou 6 jours (C.).....	244
Figure 66 : Capacité de capture du glutamate des astrocytes cultivés en présence d'AGPI (DHA et AA) et/ou de Corticostérone 100nM pendant 6 jours .....	246

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) pour un adulte consommant 2000 Kcal .....	30
Tableau 2 : Composition des régimes en macronutriments .....	112
Tableau 3 : Composition des régimes en acides gras (AG).....	112
Tableau 4 : Numéro d'ascension et principales fonctions des 48 gènes étudiés .....	134
Tableau 5 : Composition des tampons utilisés au cours des mesures de captage et libération de [ <sup>3</sup> H]-NA par les cellules SH_SY5Y .....	140
Tableau 6 : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage des astrocytes en culture primaire .....	150
Tableau 7 : Protocole d'élution des différentes classes de phospholipides .....	154
Tableau 8 : Anticorps utilisés en Western Blot et leurs dilutions .....	162
Tableau 9 : Teneurs en acides gras principaux de la PE du cortex frontal de rat .....	169
Tableau 10 : Teneurs en acides gras principaux de la PC du cortex frontal de rat .....	170
Tableau 11 : Teneurs en acides gras principaux de la PS du cortex frontal de rat.....	171
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des effets du régime alimentaire et du stress sur la composition lipidique des membranes cérébrales : exemple de la PE.....	174
Tableau 13 : Teneurs en acides gras principaux de la PE des membranes cérébrales d'astrocytes...	177
Tableau 14 : Teneurs en acides gras principaux de la PC des membranes cérébrales d'astrocytes...	178
Tableau 15 : Teneurs en acides gras principaux de la PS des membranes cérébrales d'astrocytes...	179
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des effets des AGPI et de la C100nM pendant 6 jours sur la composition lipidique des membranes astrocytaires : exemple de la PE.....	182
Tableau 17 : Modulation de la composition lipidique des cellules SH_SY5Y par la supplémentation du milieu en AGPI et par une pré-incubation de 24h à l'OH-C.....	184
Tableau 18 : Quantité d'eau, de sucrose, de liquide total consommée et préférence au sucrose mesurés pendant les 24h (12h de phase diurne et les 12h de phase nocturne) suivant la privation d'eau de 20h.....	196
Tableau 19 : Résumé de l'impact du régime alimentaire et du stress chronique de contention sur les paramètres comportementaux des rats .....	204
Tableau 20 : Résumé de l'impact des apports alimentaires en AGPI n-3 et du stress chronique de contention sur les paramètres électrophysiologiques des rats .....	214
Tableau 21 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'étude de la capture et de la libération de NA par les cellules SH_SY5Y.....	230



# Avant Propos



Depuis plusieurs décennies, l'alimentation occidentale connaît un déséquilibre croissant des apports entre les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés (AGPI) : les n-6 et les n-3. Cette évolution des habitudes alimentaires, combinée au faible ratio de conversion dans l'organisme du précurseur des AGPI n-3 (acide  $\alpha$ -linoléique, ALA, 18:3 n-3) en acides gras à longue chaîne, provoque une diminution de la disponibilité tissulaire de ces dérivés, en particulier de l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3).

Après le tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides (50% de son poids sec). Les phospholipides membranaires des cellules du système nerveux central (SNC) sont constitués à 33% d'AGPI et notamment de DHA qui peut représenter à lui seul 50% des AGPI cérébraux. Des études ont montré que cette composition particulière des membranes cérébrales est influencée par les apports alimentaires. Ainsi, la question des conséquences sur les fonctions cérébrales d'un apport alimentaire inadéquat en AGPI n-3 a été soulevée.

Bien que les données à ce sujet restent incomplètes actuellement, les AGPI n-3 semblent jouer un rôle dans les processus de neuroprotection. Ainsi, chez l'animal, des troubles cognitifs tels qu'une diminution des capacités de mémorisation et d'apprentissage sont associés à une carence en AGPI n-3. De plus, selon des études épidémiologiques menées chez l'homme, des apports élevés en AGPI n-3 garantissant un bon statut cérébral en DHA pourraient réduire la prévalence de maladies neuro-dégénératives (telles que Alzheimer) ou -psychiatriques (telles que la dépression).

Les AGPI n-3 sont impliqués également dans une meilleure résistance au stress comportemental. En effet, en diminuant l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et la libération de glucocorticoïdes, ils semblent atténuer les réactions liées au stress, telles que les manifestations d'anxiété, d'agressivité ou d'hostilité.

Enfin, les AGPI n-3 influencent les fonctions cellulaires cérébrales comme la libération de neurotransmetteurs par les neurones, la capacité de couplage des astrocytes entre eux ou encore la libération de cytokines par la microglie.

Dans ce contexte bibliographique, le projet ANR ALIA Neur $\Omega$ 3 (2010-2013) tente d'établir un lien causal entre le statut en DHA des membranes cérébrales et les processus de neuroprotection, au sein d'une organisation particulière : la synapse tripartite glutamatergique.

Mettant en jeu l'interaction entre les neurones pré- et post-synaptiques et les astrocytes, cette synapse joue un rôle clé dans les processus de plasticité cérébrale, mémorisation et capacité d'apprentissage et est particulièrement sensible, notamment au niveau de l'hippocampe, au vieillissement et/ou au stress. Les astrocytes jouent un rôle important dans la régulation de la neurotransmission et dans le maintien de l'homéostasie synaptique, notamment en purifiant le milieu extracellulaire du glutamate en excès. En cas de rupture de l'homéostasie cérébrale, des mécanismes pro-inflammatoires se mettent en place *via* la microglie. Dans un premier temps, ces processus favorisent la réparation des dommages cérébraux, notamment en activant de manière réversible les astrocytes qui vont ainsi renforcer leurs fonctions neuroprotectives. Cependant, si la stimulation aversive devient trop intense ou trop répétée, les réactions engendrées peuvent devenir délétères et accentuer les dommages cérébraux. Les astrocytes activés subissent alors une altération irréversible de leur phénotype et perdent leurs capacités protectrices et réparatrices, processus appelé la gliose réactionnelle.

Les AGPI n-3 sont d'importants constituants des membranes cérébrales et leurs dérivés interviennent dans les processus anti-inflammatoires. Ces mécanismes pourraient être la source des effets neuroprotecteurs des AGPI n-3.

Ainsi, le projet ANR ALIA NeurΩ3, basé sur un protocole d'altération de l'homéostasie cérébrale par un stress chronique de contention, cherche, par une approche multidisciplinaire, à déterminer le rôle des AGPI n-3 dans les phénomènes de neuroprotection à différents stades de la vie.

Ma thèse est ancrée dans le projet ANR ALIA NeurΩ3 et a pour but d'étudier le rôle potentiellement neuroprotecteur des AGPI n-3 sur les altérations cérébrales induites par un stress chronique. Pour cela, deux approches ont été utilisées.

Une étude *in vivo* chez le rat nous a permis d'appréhender le rôle joué par les apports alimentaires en AGPI n-3 sur les modulations du fonctionnement cérébral liées à un stress chronique de contention. Nous nous sommes intéressés à la plasticité de la synapse glutamatergique du CA1 de l'hippocampe, en étudiant, par des mesures électrophysiologiques, les processus de LTP (Long-Term Potentiation) et LTD (Long-Term Depression) fortement impliqués dans la mémorisation et l'apprentissage. En parallèle, nous avons effectué une batterie de tests comportementaux, visant à caractériser l'activité

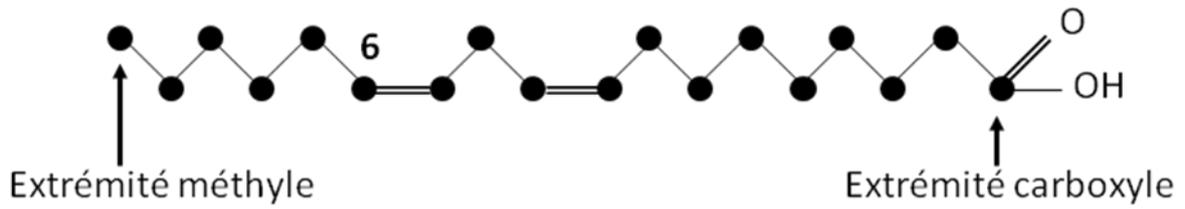
locomotrice, la réponse émotionnelle, ainsi que les capacités d'apprentissage et de mémorisation des rats. D'un point de vue biochimique, des dosages de la corticostérone plasmatique (hormone du stress chez le rat) ont été effectués afin de caractériser la réponse au stress. De plus, la composition lipidique des tissus cérébraux a été caractérisée et l'expression protéique et génique de marqueurs du stress, du fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique, ainsi que du métabolisme lipidique ont été analysées.

En parallèle, nous avons mené une étude *in vitro* visant à caractériser les mécanismes d'action des AGPI n-3 et des glucocorticoïdes sur les partenaires cellulaires impliqués dans la synapse glutamatergique : neurones et astrocytes. Ainsi, les effets de la supplémentation en AGPI et en hormone du stress sur la modulation de la neurotransmission dans une lignée de cellule de type neuronal (neuroblastomes humains) ont été étudiés à travers la mesure de capture et de libération en condition basale ou stimulée de neurotransmetteur radiomarqué au tritium. De plus, sur un modèle de culture primaire d'astrocytes de rats, l'impact croisé des AGPI et des glucocorticoïdes a été évalué en observant la morphologie cellulaire en immunohistochimie, ainsi que la capacité de transport du glutamate des cellules.

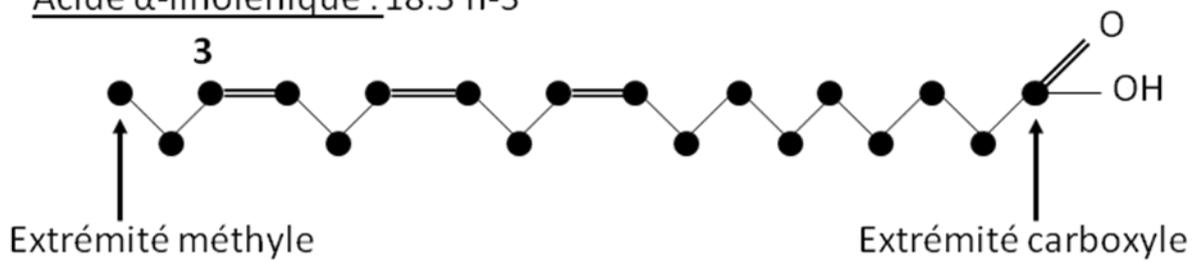


# Introduction Bibliographique

Acide linoléique : 18:2 n-6



Acide  $\alpha$ -linoléique : 18:3 n-3



- Atome de carbone
- == Double liaison
- Liaison simple

**Figure 1 : Structure et nomenclature des acides gras polyinsaturés (AGPI) :** Exemple des précurseurs de familles d'AGPI n-6 et AGPI n-3

## Partie 1 : Les acides gras polyinsaturés (AGPI), molécules indispensables au bon fonctionnement du système nerveux central (SNC)

### I. Contexte nutritionnel de l'étude

#### *1.1 Définition des AGPI*

##### 1.1.1 Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des molécules hydrophobes. Acides carboxyliques aliphatiques, ils sont composés d'une chaîne linéaire carbonée allant de 4 à 28 carbones portant une extrémité méthyle (-CH<sub>3</sub>) et une extrémité carboxyle (-COOH). On distingue 3 types d'acides gras en fonction de leur degré d'insaturation : les acides gras saturés (AGS), dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène, les mono-insaturés (AGMI), qui comportent une seule double liaison et les polyinsaturés (AGPI), qui possèdent au moins 2 doubles liaisons (Guesnet *et al*, 2005).

La nomenclature biochimique les répertorie en fonction de leur nombre de carbones, degré d'insaturation et position de leurs doubles liaisons. Ainsi, ils sont notés C x : y n-Z (ou ωZ), où x correspond au nombre de carbones, y à celui de doubles liaisons et Z à la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthylée de la chaîne carbonée (**Figure 1**). Les doubles liaisons sont séparées systématiquement par 3 atomes de carbone.

Les propriétés physiques et chimiques des acides gras dépendent de la longueur de leur chaîne carbonée et du nombre de double liaison. Ainsi, plus la chaîne carbonée est longue, plus la solubilité de ces molécules dans l'eau est faible ; de même, le degré d'insaturation entraîne une diminution du point de fusion (ce qui explique que les huiles sont riches en AGPI, tandis que le beurre contient essentiellement des AGS).

##### 1.1.2 Les 2 principales séries d'AGPI (**Figure 2**)

On distingue 2 principales séries d'AGPI : les AGPI n-6 et les AGPI n-3, qui se distinguent par la position de leur première double liaison à partir de l'extrémité méthyle (entre le 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> carbone pour les AGPI n-6 ; entre le 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> carbone pour les AGPI n-3). Contrairement aux précurseurs d'autres familles minoritaires d'AGPI (les n-7 et les n-9), les précurseurs de ces 2 familles, l'acide linoléique (LA, 18 :2n-6) pour les AGPI n-6 et l'acide α-linolénique (ALA, 18 :3n-3) pour les AGPI n-3 ne peuvent être synthétisés par l'organisme

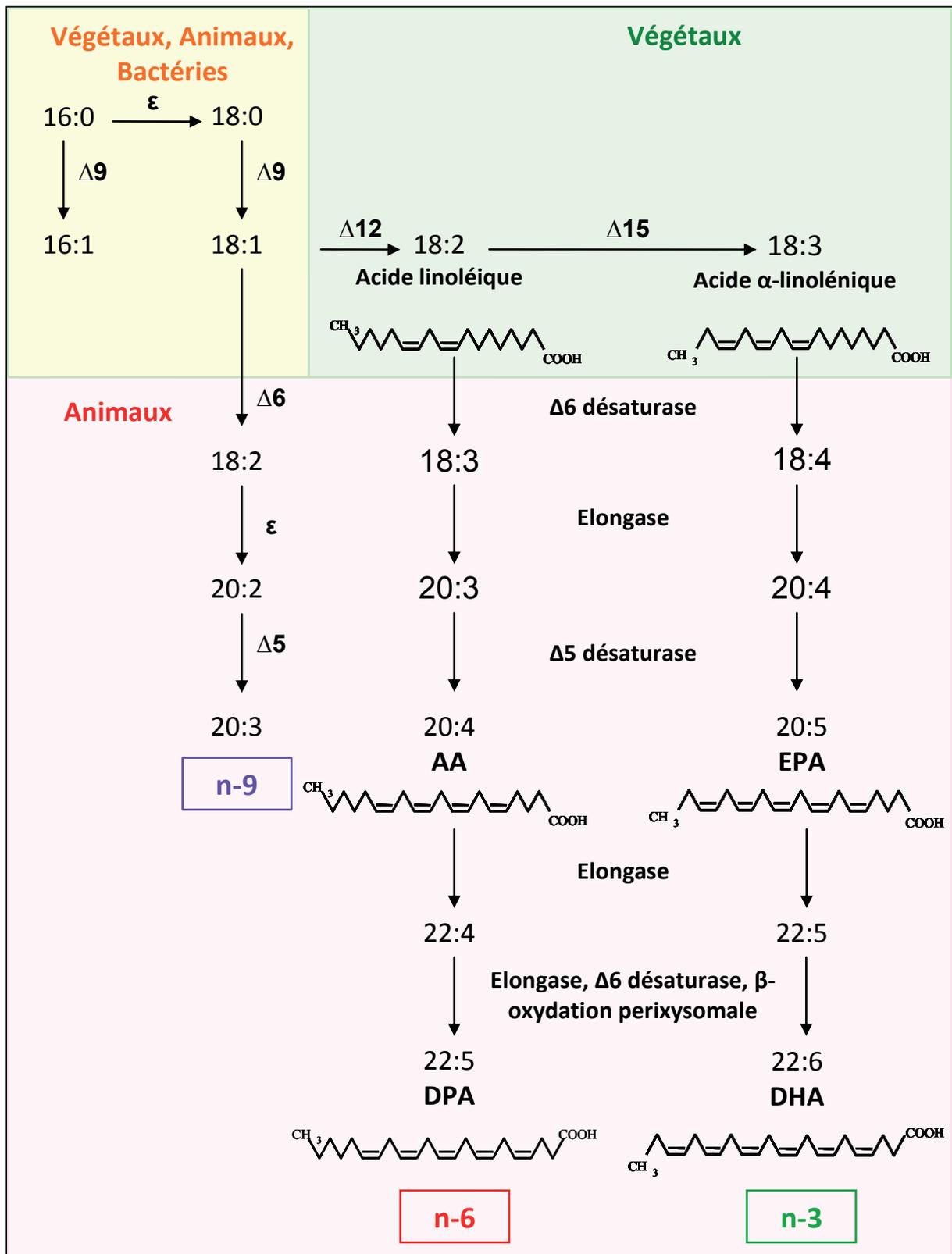


Figure 2 : Voie de bioconversion des principales familles d'acides gras polyinsaturés (adapté de Legrand, 2007)

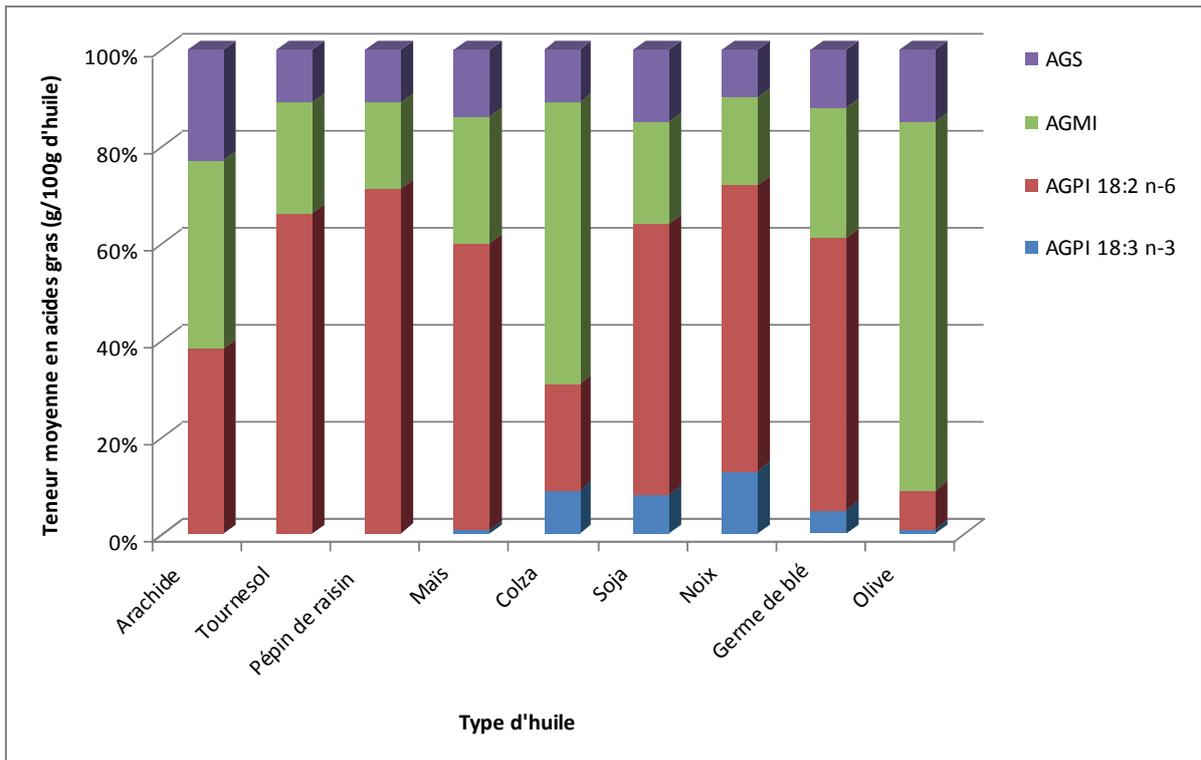
AA : Acide Arachidonique ; DPA : Acide DocosaPentaénoïque ; EPA : Acide EicosaPentaénoïque ; DHA : Acide DocosaHexaénoïque ;  $\epsilon$  : élongase ;  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$  : désaturases

chez les Mammifères faute de matériel enzymatique adéquat (absence des enzymes désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  nécessaires à leur synthèse respective à partir de l'acide oléique (18:1 n-9) et doivent donc obligatoirement être apportés par l'alimentation ; ils sont ainsi qualifiés d'indispensables.

Une fois absorbés, ces précurseurs conduisent à la synthèse spécifique au niveau du foie d'AGPI à longue chaîne (AGPI-LC). Dans le réticulum endoplasmique (RE), les précurseurs subissent une série de désaturations (ajout de doubles liaisons) et d'élongations (ajout d'atomes de carbones) successives à partir de leur extrémité carboxyle, permettant notamment la synthèse de l'acide arachidonique (AA, 22:5 n-6) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3). La synthèse des acides docosapentaénoïque (DPA, 22:5 n-6) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) est réalisée dans les peroxysomes par  $\beta$ -oxydation partielle d'AGPI à 24 carbones (Moore *et al*, 1995 ; Sprecher, 2002 ; Burdge et Calder, 2005). En condition d'apport alimentaire équilibré, la voie de synthèse de la famille des AGPI n-6 s'arrête au niveau de l'AA ; mais lors d'une déficience en AGPI n-3, celle-ci se poursuit jusqu'à la production de DPA n-6 qui vient totalement compenser la diminution de DHA et peut ainsi être considérée comme un marqueur de la carence en AGPI n-3. Les deux voies de conversion des familles n-3 et n-6 sont indépendantes l'une de l'autre et il n'existe donc aucune conversion possible entre les n-6 et les n-3 (Legrand, 2004 ; Guesnet *et al*, 2005).

Les désaturases ( $\Delta 5$  et  $\Delta 6$ ) utilisées étant communes aux 2 voies de conversion, il existe une compétition métabolique entre les familles de n-6 et n-3. La quantité de dérivés synthétisés est donc fortement influencée par les apports alimentaires en précurseurs, et plus particulier par le rapport entre LA et ALA. Cependant, les AGPI-LC peuvent également être apportés directement par l'alimentation.

La synthèse en AGPI-LC reste cependant minoritaire (inférieure à 5%) par rapport à la dégradation des précurseurs par  $\beta$ -oxydation (60% en 7 jours chez l'homme ; Cunnane, 2001) pour fournir de l'énergie à l'organisme (Brenna *et al*, 2009 ; Plourde and Cunnane, 2007 ; Sinclair *et al*, 2002) et à l'utilisation comme source d'acétate pour la synthèse d'acides gras saturés et monoinsaturés (Brenna, 2002). Cette conversion est cependant plus importante chez les femmes que chez les hommes, du fait de l'activation de la voie peroxisomale et de la régulation de l'activité et de l'expression des désaturases impliquées



**Figure 3 : Composition moyenne en acides gras des principales huiles végétales de consommation courante**

AGS : Acides Gras Saturés ; AGMI : Acides Gras Monoinsaturés ; AGPI : Acides Gras PolyInsaturés

par les hormones féminines (Burdge et Calder, 2005 ; Extier *et al*, 2009 ; Extier *et al*, 2010). La compétition métabolique ne concerne pas seulement les désaturases, mais également les acyltransférases (incorporation dans les phospholipides) et les enzymes de synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxanes) (Legrand, 2004 ; Burdge *et al*, 2005).

## ***1.2 Déséquilibre alimentaire des populations occidentales***

### **1.2.1 Sources alimentaires en AGPI**

Les précurseurs des 2 grandes familles d'AGPI, sont indispensables et doivent donc être apportés par l'alimentation via les matières grasses végétales (**Figure 3**). Les huiles de maïs, tournesol et arachide sont riches en acide linoléique. Les huiles de colza, noix, soja et lin (cette dernière n'est autorisée en France pour la consommation que depuis 2009) sont riches en acide  $\alpha$ -linoléique, contenant en moyenne 7 à 14 % des AG totaux. Parmi ces huiles, l'huile de colza est particulièrement intéressante, car elle contient peu de LA qu'il n'est pas tenu d'augmenter dans l'alimentation occidentale actuelle (18-22% contre 50-65% dans les autres huiles) et a un taux d'ALA en position sn2 plus important ce qui est un atout pour son métabolisme (58% contre 31-32% dans les autres huiles) (Combe et Boué-Vaysse, 2004).

Les AGPI à longue chaîne peuvent être synthétisés dans l'organisme, mais également apportés par l'alimentation. Ainsi, la viande, les abats et les œufs apportent principalement des AGPI-LC n-6, tandis que les dérivés à longue chaîne de la famille des n-3 sont apportés par les produits marins (poissons gras et crustacés) (Legrand, 2004).

Actuellement, on cherche à augmenter la teneur en 18:3 n-3 et en dérivés à longue chaîne des produits carnés et laitiers, en contrôlant l'alimentation des animaux d'élevage et par exemple en leur apportant des graines de lin ou des huiles de poissons. Une étude basée sur la consommation de produits d'animaux d'élevage dont le contenu en ALA a été en moyenne doublé par l'introduction de graines de lin extrudées dans leur alimentation a montré un doublement du niveau d'ALA dans le sérum des sujets ayant consommé ces produits comparés aux témoins (Weill *et al*, 2002).

### **1.2.2 Apports Nutritionnels Conseillés (ANC)**

Les Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) chez l'homme ont été établis en 2001 par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), puis réévalués en 2010. Les

		Besoin physiologique minimal	Prévention du risque				ANC 2010	
			Syndrome métabolique-diabète-obésité	Pathologies cardiovasculaires	Cancers: sein et côlon	Pathologies neuro-psychiatriques		Autres pathologies
Lipides Totaux		30	30-40	35-40	35-40	35-40	≤ 40	<b>35-40</b>
AG indispensables	Acide linoléique LA, C18:2 n-6	2	2	5	2	2	≤ 4	<b>4</b>
	Acide α-linolénique ALA, C18:3 n-3	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,8	<b>1</b>
	Acide docosahéxaénoïque DHA, C22:5 n-3	250 mg	500 mg	500-750 mg	500 mg	≥ 200-300 mg	500 mg	<b>250 mg</b>
AG non indispensables	Acide Eicosapentaénoïque EPA, C20:5 n-3	/						<b>250 mg</b>
	Acide laurique (C12:0)+ Acide myristique (C14:0)+ Acide palmitique (C16:0)	/		≤ 8				<b>≤ 8</b>
	Acides gras saturés totaux	/		≤ 12	≤ 12			<b>≤ 12</b>
	Acide oléique C18:1 n-9	/		≤ 20				<b>15-20</b>

**Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) pour un adulte consommant 2000 Kcal (Avis du 1<sup>e</sup> mars 2010 de l’AFFSA)**

Les valeurs sont exprimées, excepté pour l’EPA et le DHA, en pourcentage de l’apport énergétique sans alcool, que l’on appellera « apport énergétique » (AE), par souci de simplification. Dans le cas du DHA (acide docosahéxaénoïque, C22 :6 n-3) et de l’EPA (acide eicosapentaénoïque, C20 :5 n-3), les valeurs sont exprimées en milligrammes dans la mesure où les études disponibles ont utilisé cette unité.

ANC sont des valeurs de référence, qui couvrent les besoins physiologiques d'un individu en bonne santé (**Tableau 1**).

Chez l'adulte, la part lipidique dans l'apport énergétique total (AET) est fixée à 35-40%. De plus, des recommandations particulières ont été établies en fonction des différents types d'acides gras concernés. Nous ne parlerons ici que des apports concernant les 2 grandes familles d'AGPI : les AGPI n-6 et les AGPI n-3.

Pour l'acide linoléique, précurseur des AGPI n-6, l'ANC a été fixé à 4% des apports énergétiques (soit 10 g/jour chez l'homme adulte et 8 g/jour chez la femme adulte), tandis que pour l'acide  $\alpha$ -linoléique, à 1 % des apports énergétiques totaux (soit 2,5 g/jour chez l'homme adulte et 2 g/jour chez la femme) (Combe et Boué-Vaysse, 2004). De plus, il est important de bien équilibrer les apports en AGPI n-6 par rapport à ceux en AGPI n-3, pour palier aux problèmes de concurrence métabolique entre les 2 voies de conversion. Ainsi, dans le cadre d'un régime alimentaire global, il est recommandé que le rapport entre LA et ALA soit inférieur à 5.

Des ANC ont également été établis pour les AGPI-LC n-3. Ainsi, il est recommandé d'apporter 500mg d'AGPI-LC n-3/jour à l'organisme dont 250 mg de DHA. En effet, le taux de conversion du précurseur ALA en DHA dans l'organisme est insuffisant pour satisfaire les besoins de ce dernier.

### 1.2.3 Etudes épidémiologiques de consommation

Différentes études se sont intéressées aux apports alimentaires en AGPI n-3 au sein de la population française. L'étude SU.VI.MAX (Hercberg *et al*, 1998 ; Astorg *et al*, 2004), menée dans les années 90, s'intéresse aux habitudes alimentaires d'un échantillonnage de la population française et a permis plus particulièrement d'estimer leur consommation en AGPI n-6 et n-3. Concernant la consommation en AGPI à longue chaîne via les produits marins, une étude de consommation utilisant la méthode de bilan d'approvisionnement alimentaire définie par la FAO (FAO, 2002 et 2003) a été mise en place en 2005 (Bourre et Paquette, 2007). Une étude réalisée sur une population de femmes d'Aquitaine a également été menée afin de déterminer la consommation réelle d'acide  $\alpha$ -linoléique (Combe et Boué, 2001). Ces études sont basées sur l'analyse de questionnaires alimentaires, associée à des tables de composition en nutriments des aliments.

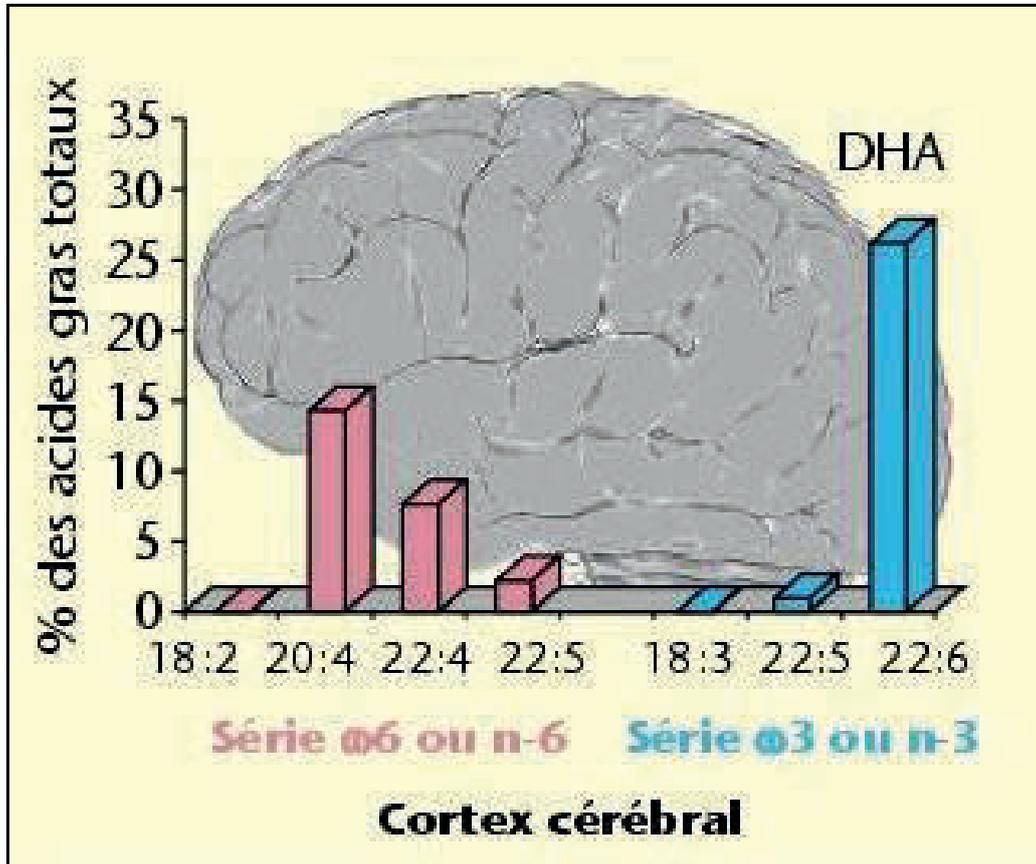


Figure 4 : Teneur des principaux AGPI des phospholipides des membranes du cortex cérébral : exemple de la phosphatidyléthanolamine (PE) (Tinoco, 1982)

Il ressort de ces études que la consommation en ALA est inférieure à celle préconisée par les ANC et ce quelque soit l'âge ou le sexe de la population étudiée. En effet, en France, l'ALA représente en moyenne 0,38% de l'énergie ingérée avec 95% de la population en-dessous de 0,5% ; ceci correspond à la plus faible consommation au sein des pays européens, mais également par rapport à d'autres pays industrialisés tels que les Etats-Unis, le Japon ou l'Australie (Astorg *et al*, 2004). En parallèle, il y a peu de variations entre les populations de la consommation de LA qui couvre bien les besoins de l'organisme. Il en résulte donc un ratio d'apports des précurseurs trop élevé au sein de la population française ; autour de 14 au lieu de 5. Ce ratio est doublé au niveau du tissu adipeux, traduisant un stockage deux fois plus faible de l'ALA comparé au LA (Combe et Boué, 2001).

Si on s'intéresse aux longues chaînes, l'étude SU.VI.MAX montre que la consommation en AGPI-LC n-3 est en moyenne de 497,3 +/- 325,1 mg/jour chez l'homme adulte et 399,6 +/- 286 mg/jour chez la femme dont 55% de DHA, 30% d'EPA et 15% de DPA. Cela couvre les apports recommandés chez l'homme, pas tout à fait chez la femme, mais il est important de noter les fortes variations inter-individu (Astorg *et al*, 2004). La source majoritaire d'AGPI-LC n-3 étant constituée par les produits de la mer, une étude a montré que les 5 poissons les plus contributives aux apports en DHA en France sont le saumon (47,6 mg/jour/personne), la sardine (28,4 mg/jour/personne), le thon (20,5 mg/jour/personne), le maquereau (15,7 mg/jour/personne) et le hareng (12,4 mg/jour/personne), qui fournissent ensemble 63% des apports en DHA (Bourre and Paquette, 2007).

Le déséquilibre alimentaire entre les deux familles d'AGPI n-3 et n-6 est également retrouvé dans d'autres pays industrialisés tels que l'Australie (Ollis *et al*, 1999 ; Meyer *et al*, 2003) ou les Etats-Unis (Kris-Etherton *et al*, 2000).

## **II. AGPI n-3 et cerveau**

### ***II.1 Statut lipidique particulier du cerveau***

#### **II.1.1 Composition lipidique cérébrale générale (Figure 4)**

Après le tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides. En effet, les lipides constituent 50 à 60% de son poids sec (Sastry, 1985), principalement sous la forme de phospholipides (PL). Ces PL se distinguent par leur richesse en AGPI, qui représentent 33%

des acides gras (Yehuda *et al*, 1999 ; Alessandri *et al*, 2004) et plus particulièrement les AGPI-LC tel que l'AA et le DHA. Ainsi, le DHA et l'AA représentent à eux seuls 50% et 30% respectivement des AGPI des PL cérébraux. Les précurseurs sont, quant à eux, principalement oxydés ou accumulés dans les triglycérides de réserve et sont donc quasiment absents des phospholipides membranaires (Cunnane et Anderson, 1997).

Les 3 classes majoritaires de phospholipides cérébraux sont la phosphatidylcholine (PC, 42-44 % des PL totaux), la phosphatidyléthanolamine (PE, 36-40 % des PL totaux) et la phosphatidylsérine (PS, 11-13 % des PL totaux), mais il existe également des classes minoritaires telles que la sphingomyéline (SM, 5-6 % des PL totaux) et le phosphatidylinositol (PI, 2-3 % des PL totaux) (Sastry, 1985). Ces classes de phospholipides cérébraux présentent des proportions différentes d'acide gras. Ainsi, si la PC est la classe la plus représentée de phospholipides dans le cerveau, ce sont les PE et PS qui sont les plus riches en AGPI n-3 et notamment en DHA (Garcia *et al*, 1998).

#### II.1.2 Spécificités régionales et cellulaires

Le métabolisme lipidique cérébral n'est pas homogène et il existe notamment des spécificités régionales et cellulaires.

Des analyses de la composition lipidique de différentes zones cérébrales ont été établies lors d'études menées sur la souris et sur le rat. Celles-ci ont montré que les AGPI n-6, notamment l'AA, sont particulièrement présents au niveau de la glande pituitaire et l'hippocampe, tandis que le pourcentage d'AGPI n-3, en particulier en DHA, est davantage élevé dans le cortex frontal (Delion *et al*, 1997 ; Carrié *et al*, 2000 ; Xiao *et al*, 2005).

Bien que la majorité du DHA et de l'AA présents dans les membranes cérébrales provienne du stock plasmatique (Spector, 2001), il semblerait que les astrocytes (Williard *et al*, 2001 ; Moore *et al*, 1991), et dans une moindre proportion les cellules endothéliales (Bernoud *et al*, 1998), sont capables de synthétiser ces AGPI-LC à partir de leurs précurseurs. Ces types cellulaires participeraient ainsi à moindre échelle au maintien de la composition lipidique cérébrale, par une synthèse et une libération locale d'AGPI vers les neurones, incapables d'effectuer cette synthèse (Moore, 2001).

## ***II.2 Importance des apports alimentaires durant la période périnatale***

### **II.2.1 Incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales**

L'incorporation des AGPI dans les membranes des cellules cérébrales (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, microglie) s'effectue massivement durant la période périnatale, du dernier trimestre de la grossesse à l'âge de 18 mois environ (Lauritzen *et al*, 2001 ; Clandinin, 1999). Celle-ci correspond à la période active de neurogenèse, migration et différenciation neuroblastique, synaptogenèse et myélinisation axonale (McNamara et Carlson, 2006). Chez l'Homme, on estime le taux d'incorporation du DHA dans les membranes cérébrales à 3mg/jour pendant le dernier trimestre de grossesse, puis 5 mg/jour pendant les premiers mois de la vie du nourrisson (Cunnane, 2000). Durant les 6 premiers mois de la vie postnatale, le cerveau accumule ainsi 50% du DHA corporel total incorporé, soit environ 900mg.

Durant cette période périnatale, le DHA est apporté via le placenta puis le lait maternel (Innis, 2004 ; Innis, 2005) dont la composition est fortement influencée par les apports alimentaires de la mère. Lors de la grossesse, on observe notamment que le placenta pompe sélectivement le DHA et l'AA maternel comparé aux autres acides gras (Larqué *et al*, 2003 ; Gil-Sanchez *et al*, 2010), afin de subvenir aux besoins du fœtus en développement ; ainsi, les concentrations placentaires en DHA et AA sont supérieures à celles observées dans les tissus maternels. C'est ce qu'on appelle le processus de biomagnification (Crawford *et al*, 1976). Les mécanismes de transfert des AGPI de la mère au placenta sont encore peu connus, bien que certaines pistes semblent se dessiner (pour revue, Duttaroy, 2009). Ainsi, si la diffusion passive reste un mécanisme possible, il semblerait que le transfert des AGPI maternels vers le placenta implique des protéines de transport membranaire spécifiques telles que Fatty Acid Transporter 4 (FAT4), plasma membrane Fatty Acid Binding Protein (FABPpm), Fatty Acid Transport Protein (FATP 1-6), Fatty Acid Translocase (FAT/CD36) ou intracellular Fatty Acid Binding Proteins (FABPs) (Campbell *et al*, 1998 ; Cunningham et McDermott, 2009). L'expression des gènes correspondant à ces protéines est fortement régulée par les facteurs de transcription nucléaires (PPARs, LXR, RXR, SREBP-1), qui jouent donc également un rôle dans l'accumulation placentaire d'AGPI-LC (Duttaroy, 2004 ; Xu *et al*, 2007 ; Wang *et al*, 2002).

### II.2.2 Conséquence d'une déficience ou d'une supplémentation en AGPI n-3 alimentaires sur la composition lipidique cérébrale

En modulant les apports alimentaires en AGPI de la mère durant la période critique d'accumulation des AGPI chez le fœtus en développement (gestation-lactation) et/ou de la descendance par la suite, il est possible de modifier la composition lipidique cérébrale chez le rat.

En éliminant l'apport d'AGPI n-3 dès les périodes de gestation-lactation des mères, on observe une chute de DHA cérébral de 50%, qui s'accompagne d'une incorporation accrue compensatrice de DPA n-6 (22:5 n-6) (Bourre *et al*, 1984 ; Aïd *et al*, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'humain ; une étude a notamment montré une chute de 50% du DHA dans le cerveau de nouveaux nés nourris avec des formules dépourvues en DHA comparativement aux bébés nourris au lait maternel (Cunnane, 2000). Toutes les structures cérébrales sont affectées par ces modifications de la composition lipidique suite à une déficience, cependant l'amplitude des variations diffère d'une région à l'autre. Ainsi, le cortex frontal semble plus sensible comparé à d'autres structures telles que l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et le cervelet (Levant *et al*, 2007; Favrelière *et al*, 1998).

A l'inverse, enrichir le régime AGPI n-3, permet de favoriser l'accumulation du DHA dans les organes et en particulier dans le cerveau. Cet enrichissement peut se faire soit via le précurseur ALA, soit par l'ajout d'AGPI-LC n-3 préformés. Si la source d'AGPI n-3 ne semble pas influencer son utilisation et accumulation dans les tissus chez la mère ou le fœtus (Valenzuela *et al*, 2004), l'équipe de Talahalli *et al* (2010) a mis en évidence que chez le raton, l'apport alimentaire de DHA+EPA préformé favoriserait sa rétention dans le sérum et le foie et son accréation dans les tissus tels que le cerveau. Ainsi, en enrichissant les apports alimentaires des femelles en gestation en AGPI-LC n-3 *via* des huiles de poisson, on observe une augmentation significative du contenu plasmatique et hépatique en AGPI n-3 (DHA et EPA), associée à une diminution de la proportion en AA (Childs *et al*, 2010). Ces modulations du contenu lipidique sont retrouvées dans de moindres proportions au niveau cérébral. Cependant, tout comme pour la déficience, il existe des spécificités régionales. Ainsi suite à un enrichissement du régime pendant la gestation et à l'âge adulte, l'hippocampe, ainsi que le bulbe olfactif, semble accumuler préférentiellement le DHA comparé au cortex frontal (Chung *et al*, 2008).

### **II.3 AGPI et fonctionnement cérébral**

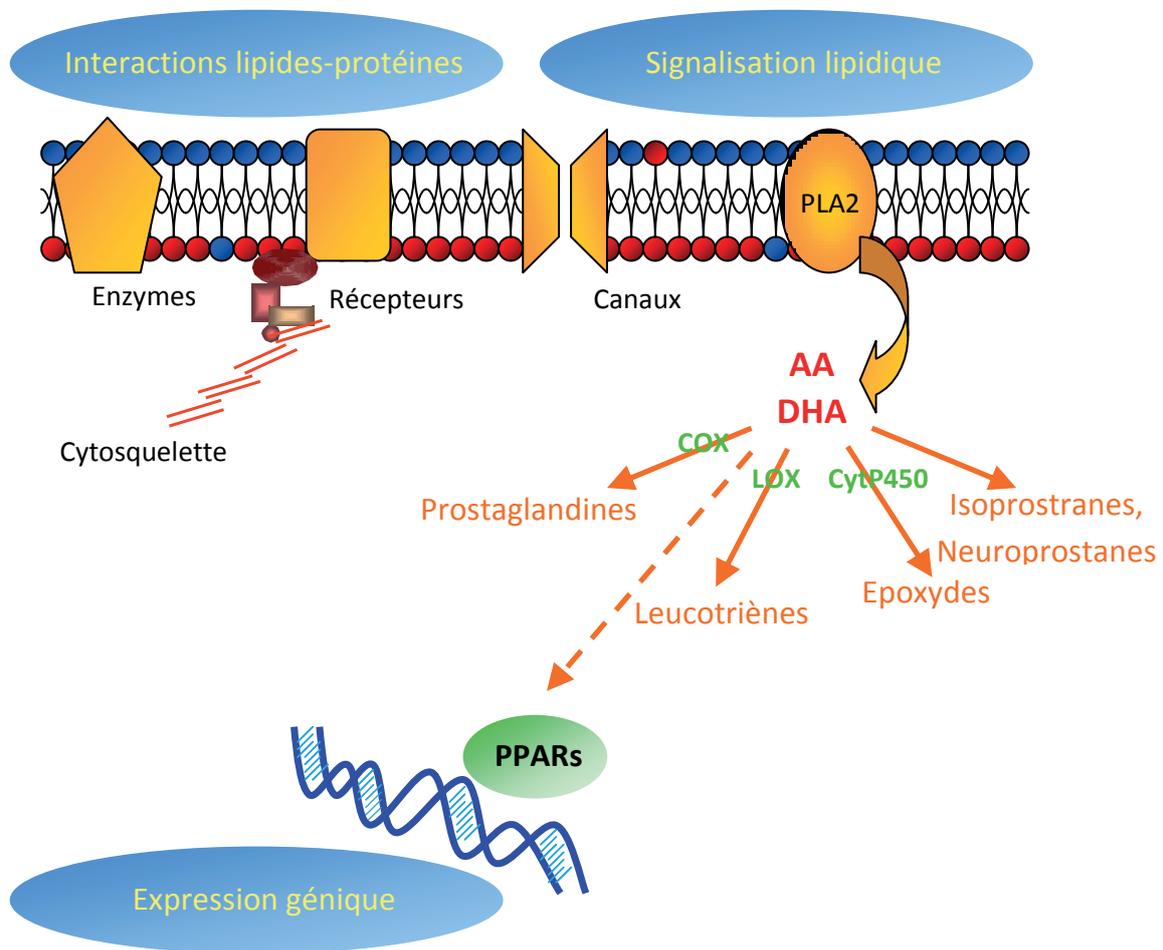
De nombreuses études expérimentales ont démontré qu'une déficience en AGPI n-3 était associée à des perturbations du fonctionnement cérébral, avec des conséquences sur certains types de comportements (Fedorova et Salem, 2006).

Ainsi, il a été démontré qu'une déficience en AGPI n-3 est associée à une diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation chez les rongeurs (Fedorova *et al*, 2007 ; Fedorova *et al*, 2009 ; Su, 2010). Ainsi dans des tests d'apprentissage spatial tels que le labyrinthe de Barnes ou la piscine de Morris, les animaux déficients effectuent davantage d'erreurs et nécessitent un temps plus long pour acquérir l'apprentissage. A l'inverse, un enrichissement des apports alimentaires en AGPI n-3 améliore les performances des animaux dans un test d'apprentissage spatial (Vinot *et al*, 2011). Chez l'Homme, des études portant sur la supplémentation en AGPI n-3 durant la période périnatale ont mis en évidence un effet bénéfique du DHA sur les capacités visuelles et cognitives des enfants (Boucher *et al*, 2011 ; Helland *et al*, 2003 ; Helland *et al*, 2008 ; Judge *et al*, 2007). Les enfants dont la mère a suivie un régime enrichi en AGPI n-3 au cours de sa grossesse présentent ainsi de meilleures capacités mnésiques et des scores au test de QI supérieurs.

Les modifications de teneurs cérébrales en DHA induites par les apports alimentaires semblent également moduler la réactivité et la sensibilité des individus aux troubles de l'humeur ou au stress (Mathieu *et al*, 2008 ; Takeuchi *et al*, 2003 ; Harauma et Moriguchi, 2011 ; Delarue *et al*, 2003). Ainsi, de nombreuses études d'observation et expérimentales ont établi une corrélation inverse entre la consommation et le statut cérébral en AGPI n-3 et la prévalence de la dépression (Liperoti *et al*, 2009) et des troubles anxieux (Ross *et al*, 2009) ou encore l'apparition de comportements hostiles et agressifs (Delarue *et al*, 2003 ; Hamazaki et Hamazaki, 2008). A l'inverse, une supplémentation en AGPI n-3 est associée à une réduction de l'anxiété (Vinot *et al*, 2011 ; Trofimiuk et Braszko, 2011) ou dans les cas de dépression à une atténuation des symptômes (Freeman *et al*, 2006).

### **III. Mécanismes d'action des AGPI dans le cerveau**

Les acides gras sont une des principales sources d'énergie pour l'organisme. Cependant, ils ont également d'autres fonctions et les AGPI interviennent notamment via 3 grands procédés : en modulant les propriétés physico-chimiques et dynamiques des membranes cellulaires, en servant de précurseurs à la synthèse de dérivés oxygénés et en



**Figure 5 : Principaux modes d'action des AGPI dans la physiologie cellulaire**

Le ratio AA/DHA dans les phospholipides membranaires module la physiologie cellulaire en modifiant l'environnement physico-chimiques des protéines membranaires (enzymes, récepteurs et canaux), en modulant le panel de médiateurs oxygénés issus des lipides suite à leur libération des membranes sous l'action des PLA<sub>2</sub> et en activant ou réprimant la transcription de certains gènes via les PPARs

PLA<sub>2</sub> : Phospholipases A<sub>2</sub> ; AA : Acide Arachidonique ; DHA : Acide Docosahexaénoïque ; COX : Cyclo-Oxygénase ; LOX : Lipoxygénase ; CytP450 : Cytochrome P450 ; PPAR : Peroxysomale Proliferator Activated Receptor

régulant la transcription de gènes via l'activation de facteurs de transcription (**Figure 5**) (Guesnet *et al*, 2005).

### ***III.1 Rôle structural***

Les LC-AGPI, en particulier DHA et AA, sont des constituants importants des phospholipides membranaires et peuvent ainsi jouer un rôle sur l'activité de certaines enzymes, transporteurs, récepteurs et canaux ioniques présents au sein des membranes.

#### *III.1.1 Les AGPI dans les phospholipides membranaires*

Les phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par 2 acides gras (en position sn1 et sn2) constituant les 2 queues hydrophobes et par un acide phosphorique (en position sn3) lié ou non à un alcool aminé constituant la tête polaire de la molécule. Leur dénomination prend en compte la nature de l'alcool aminé. Au niveau des membranes cérébrales, on retrouve ainsi 3 classes principales : les phosphatidylcholines, les phosphatidylethanolamines et les phosphatidylsérines. Les phospholipides sont donc des molécules amphiphiles qui vont spontanément s'organiser en bicouche et participer à la formation des membranes cellulaires. Concernant les acides gras, si la position sn1 est souvent occupée par un acide gras saturé tel que l'acide stéarique (C 18:0), on trouve en position sn2 un acide gras insaturé, en particulier le DHA ou l'AA.

Bien que la nature des pools d'AGPI plasmatiques soit variée (lipoprotéines, lysophosphatidylcholines, acides gras non estérifiés), les acides gras non estérifiés constituent la principale source des AGPI cérébraux (Chen *et al*, 2008). Une fois dans les cellules, les AGPI sont activés par addition d'un groupe acyl-CoA via des protéines de transport des acides gras (FATP, Fatty Acid Transport Protein) ayant une activité enzymatique d'acyl-CoA synthetase (Milger *et al*, 2006 ; Jia *et al*, 2007). Puis ils sont transférés vers les positions sn2 vacantes des phospholipides membranaires grâce à une enzyme fatty acyl transferase.

#### *III.1.2 Mécanismes d'action des AGPI membranaires*

L'action des AGPI membranaires peut s'effectuer soit directement en créant un micro-environnement membranaire flexible, qui favoriserait les changements de

conformation nécessaire à l'activité de certaines protéines, soit indirectement en induisant la formation de micro-domaines ordonnés appelés « rafts lipidiques ».

Contrairement aux acides gras saturés qui ont une conformation droite et rigide, les AGPI, de part la présence de leurs doubles liaisons, présentent un certain nombre de courbures de leur chaîne carbonée qui leur permettent d'adopter différentes conformations. Ceci permet de moduler leur encombrement stérique au sein des membranes et donc les propriétés physiques de ces dernières (Marszalek et Lodish, 2005). Ainsi, le DHA joue sur la fluidité membranaire, mais également sur sa perméabilité et sur son élasticité (Stillwell et Wassal, 2003). Les membranes naturellement riches en DHA, telles que les synaptosomes et les cellules de la rétine, présentent une prédisposition à former des vésicules et à fusionner (Salem *et al*, 1986 ; Stillwell et Wassal, 2003). Ces modulations des propriétés membranaires semblent jouer un rôle dans l'activité et les interactions de certaines protéines, notamment des récepteurs couplés à une protéine G. Ainsi au niveau des photorécepteurs de la rétine, les changements de conformation de la rhodopsine (photo-pigment rétinien intervenant dans la réception et la transduction du signal visuel) sont modulés par la composition des phospholipides membranaires, et notamment par la concentration en DHA (Niu *et al*, 2004 ; Litman *et al*, 2001).

Les AGPI jouent également un rôle dans la formation de microdomaines membranaires, tels que les rafts lipidiques. Des études suggèrent notamment que la faible affinité des AGPI à longue chaîne tel que le DHA pour le cholestérol favoriserait la ségrégation latérale de micro-domaines riches ou pauvres en cholestérol (Chapkin *et al*, 2008 ; Shaikh *et al*, 2004 ; Yaqoob, 2009). Les rafts lipidiques ont ainsi été décrits comme des régions membranaires rigides riches en sphingolipides et en cholestérol (Simons *et al*, 1997). Cet environnement particulier est favorable à l'activité de certaines protéines intégrées comme notamment les protéines du complexe SNARE impliquées dans l'exocytose ou les protéines membranaires associées aux cascades de signalisation cellulaire (Allen *et al*, 2007 ; Gil *et al*, 2005 ; Salaün *et al*, 2004 ; Lang, 2007).

Pour illustrer l'importance du DHA à ce niveau, citons les travaux de l'équipe de Kim (Kim *et al*, 2010) qui ont montré que le DHA favorise l'accumulation de phosphatidylsérine (PS) au niveau des membranes, ce qui aurait un rôle neuroprotecteur en inhibant l'apoptose

des cellules. En effet, l'accumulation de PS dans les membranes favoriserait la translocation et l'activation des voies Akt, Raf et PKC. Ces voies de signalisation vont alors inhiber la caspase 3, membre de la famille des cysteine proteases impliquées dans les phénomènes d'apoptose.

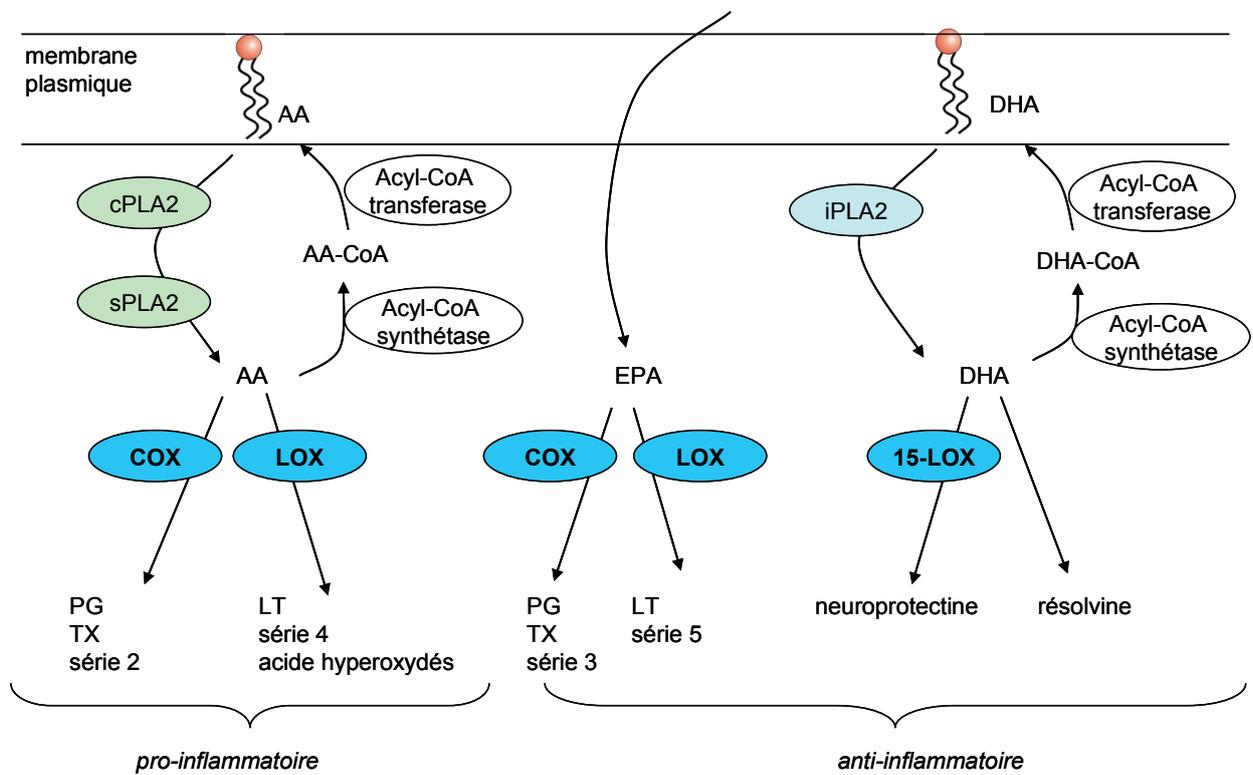
### **III.2 Action des AGPI libres**

#### III.2.1 Libération des AGPI membranaires

Si les AGPI sont d'importants constituants membranaires, ils sont également continuellement libérés des phospholipides membranaires sous l'action des phospholipases A2 (PLA2) (Farooqui et Horrocks, 2006). Différentes isoformes de PLA2 ont été décrites dans le cerveau, parmi lesquelles se trouvent notamment la sPLA2 (secretory PLA2), la cPLA2 (cytosolic PLA2) et la iPLA2 (Ca<sup>2+</sup>-independant PLA2) (Farooqui et Horrocks, 2004 ; Burke et Dennis, 2009 ; Rosa et Rapoport, 2009). Ces différentes isoformes sont caractérisées par leur structure, mais également leurs propriétés enzymatiques, leur spécificité de substrat et leur localisation subcellulaire.

Ainsi, l'isoforme cytosolique Ca<sup>2+</sup>-dépendante cPLA2, répartie uniformément au sein du cerveau, est exprimée aussi bien au niveau des neurones que des astrocytes (Farooqui et Horrocks, 2004) et présente une plus forte affinité pour l'acide arachidonique (Leslie, 2004 ; Shikano *et al*, 1994). L'isoforme Ca<sup>2+</sup>-indépendante est majoritaire au niveau cérébral et semble participer à près de 70% de l'activité PLA2 dans le cerveau, notamment au niveau de l'hypothalamus, de l'hippocampe et du striatum (Yang *et al*, 1999 ; Farooqui et Horrocks, 2004). Le DHA des phospholipides membranaires est principalement hydrolysé par cette isoforme iPLA2 (Strokin *et al*, 2003). La sPLA2, sécrétée en réponse à des stimuli particuliers, ne semble avoir ni spécificité régionale ni spécificité de substrat au niveau cérébral (Farooqui et Horrocks, 2004).

Une fois libres, les AGPI sont pour la majorité réincorporés dans les phospholipides membranaires (Chen *et al*, 2008). Mais ils peuvent également être convertis en médiateurs oxygénés (eicosanoïdes et docosanoïdes principalement), métabolisés via la  $\beta$ -oxydation afin de fournir de l'énergie, réguler l'activité de certaines protéines et l'expression de certains gènes ou diffuser vers le plasma. Dans la suite de l'exposé, seules les actions des AGPI via leurs dérivés oxygénés ou sur la régulation génique seront développées.



**Figure 6 : Synthèse des principaux dérivés oxygénés dans le cerveau (d'après Orr et Bazinet, 2008)**

AA : acide arachidonique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; cPLA2 : phospholipase A2 cytosolique ; sPLA2 : PLA2 sécrétée; iPLA2 PLA2 indépendante du calcium ; PG : prostaglandine ; TX : thromboxanes ; LT ; leucotriènes

### III.2.2 Synthèse de médiateurs oxygénés et inflammation

Les AGPI libres sont les précurseurs de médiateurs oxygénés appelés eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) et docosanoïdes (résolvines et neuroprotectines), qui sont synthétisés respectivement à partir d'AGPI à 20 carbones (EPA ou AA) ou à partir du DHA (Farooqui *et al*, 2007 ; Orr et Bazinet, 2008) (**Figure 6**). Ces dérivés jouent un rôle de messagers cellulaires et sont impliqués notamment dans les processus d'inflammation (Funk, 2001 ; Farooqui et Horrocks, 2006). L'oxygénation des AGPI pour aboutir à la synthèse de ces dérivés est catalysée soit par les lipoxygénases (5, 12, 15-LOX), soit par les cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2). De manière générale, les médiateurs oxygénés générés à partir des AGPI n-6 ont des propriétés opposées à ceux générés à partir des AGPI n-3 ; on attribue davantage une action pro-inflammatoire aux AGPI n-6 et une action anti-inflammatoire aux AGPI n-3 (Layé, 2010).

Parmi les dérivés de l'AA, on trouvera un certain nombre de prostaglandines (PG), de leucotriènes (LT) et d'acides gras hydroperoxydés (HETE, hydroxyeicosatetraenoic) ayant une action pro-inflammatoire. Ainsi, pendant longtemps, l'AA a été considéré uniquement dans son rôle d'initiation et de maintien de l'inflammation. Cependant, la classification est assez délicate car certains composés ont des actions à la fois pro- et anti-inflammatoires (Calder, 2006 ; Serhan et Petasis, 2011). La PGE2 est capable de réguler sa propre production en activant au niveau des fibroblastes la COX et elle induit également la production d'interleukine IL-6 par les macrophages ce qui lui confère des propriétés pro-inflammatoires (Bagga *et al*, 2003). Cependant, elle pourrait également avoir une activité plutôt anti-inflammatoire en inhibant la 5-LOX et donc la production de LT de série 4 et en activant la 15-LOX permettant la production de lipoxines anti-inflammatoires (Calder, 2006).

Les enzymes de conversion des AGPI n-3 et n-6 en dérivés oxygénés étant communes, il existe une certaine compétition entre les différentes voies. Ainsi une supplémentation en huile de poisson riche en AGPI n-3 réduirait la production des dérivés de l'AA tels que la PGE2 (Calder, 2006). En plus de réguler la production de dérivés pro-inflammatoires formés à partir de l'AA, les AGPI n-3 sont à l'origine de dérivés de nature davantage anti-inflammatoire, comme les résolvines de série E et D (formées

respectivement à partir de l'EPA et du DHA) (Arita *et al*, 2005 ; Sun *et al*, 2007 ; Spite *et al*, 2009) et les neuroprotectines issues du DHA (Bazan, 2005).

La neuroprotectine D1 (NPD1), première neuroprotectine décrite, fut identifiée dans le cerveau, la rétine, le foie et les reins (Ariel et Serhan, 2007 ; Bazan, 2005). Elle est synthétisée à partir du DHA grâce à la 15-LOX. Elle constitue un inhibiteur potentiel de l'apoptose induite par un stress oxydatif important et réduirait les processus pro-inflammatoires liée à la voie impliquant COX-2 (Bazan, 2009). De part ses propriétés, la NPD1 jouerait un rôle potentiellement bénéfique dans la maladie d'Alzheimer. Par induction de programmes anti-apoptotiques et neuroprotecteurs, elle réduirait la neurotoxicité liée aux peptides A $\beta$ 42 (Lukiw *et al*, 2005 ; Stark et Bazan, 2011).

### III.2.3 Régulation de la transcription

Les acides gras et leurs métabolites régulent l'expression d'un certain nombre de gènes via des facteurs de transcription tels que les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein), RXR $\alpha$  (retinoid X receptor) ou LXR $\alpha$  (Liver X Receptor) (Guesnet *et al*, 2005 ; Jump *et al*, 2002). Ces effets ont notamment été bien mis en évidence au niveau du foie et du tissu adipeux pour la régulation du métabolisme lipidique (Clarke *et al*, 2001 ; Jump, 2008). Cependant, les AGPI semblent également réguler un certain nombre de gènes impliqués dans les processus de stress oxydatif, signalisation cellulaire ou encore d'apoptose (Lapillone *et al*, 2004).

Cette action des AGPI alimentaires sur l'expression génique est extrêmement rapide (Sampath et Ntambi, 2004) et s'effectue de manière directe par liaisons avec les facteurs de transcription ou de manière indirecte en inhibant la transcription du récepteur ou sa fixation au gène d'intérêt (Sampath et Ntambi, 2004).

En ce qui concerne le système nerveux central, plusieurs études menées chez le rongeur montrent que les AGPI régulent l'expression génique (Barcelo-Coblin *et al*, 2003 ; Kitajka *et al*, 2002 ; Berger *et al*, 2002). Les gènes dont l'expression est modifiée par les apports alimentaires en AGPI n-3 participent pour certains à la plasticité synaptique, à la signalisation cellulaire, à la formation des canaux ioniques ou encore au métabolisme cérébral (Kitajka *et al*, 2002). Par exemple, le DHA semble, via l'activation du facteur de transcription CREB (Cyclic AMP-Dependent Response Element Binding Protein) et la voie des

MAP kinase, réguler la synthèse de BDNF (Brain Derived Neurotrophin Factor), facteur neurotrophique impliqué dans la plasticité cérébrale (Rao *et al*, 2007).

**En résumé,** depuis plusieurs décennies, l'alimentation des populations occidentales se caractérise par un déséquilibre des apports en AGPI n-6 et AGPI n-3, qui se traduit par une réduction de la disponibilité en AGPI-LC n-3 (en particulier DHA) pour les tissus. Le cerveau étant l'un des organes les plus riches en lipides et en AGPI, ce déséquilibre alimentaire soulève la question de l'impact des apports en AGPI n-3 sur le fonctionnement cérébral. En effet, par la modulation des propriétés membranaires, la régulation de l'expression génique ou encore la synthèse de médiateurs oxygénés, les AGPI participent activement au bon fonctionnement du SNC. Dans la suite de l'exposé, nous décrirons le rôle des AGPI dans la régulation d'une structure cérébrale particulière, la synapse tripartite glutamatergique.

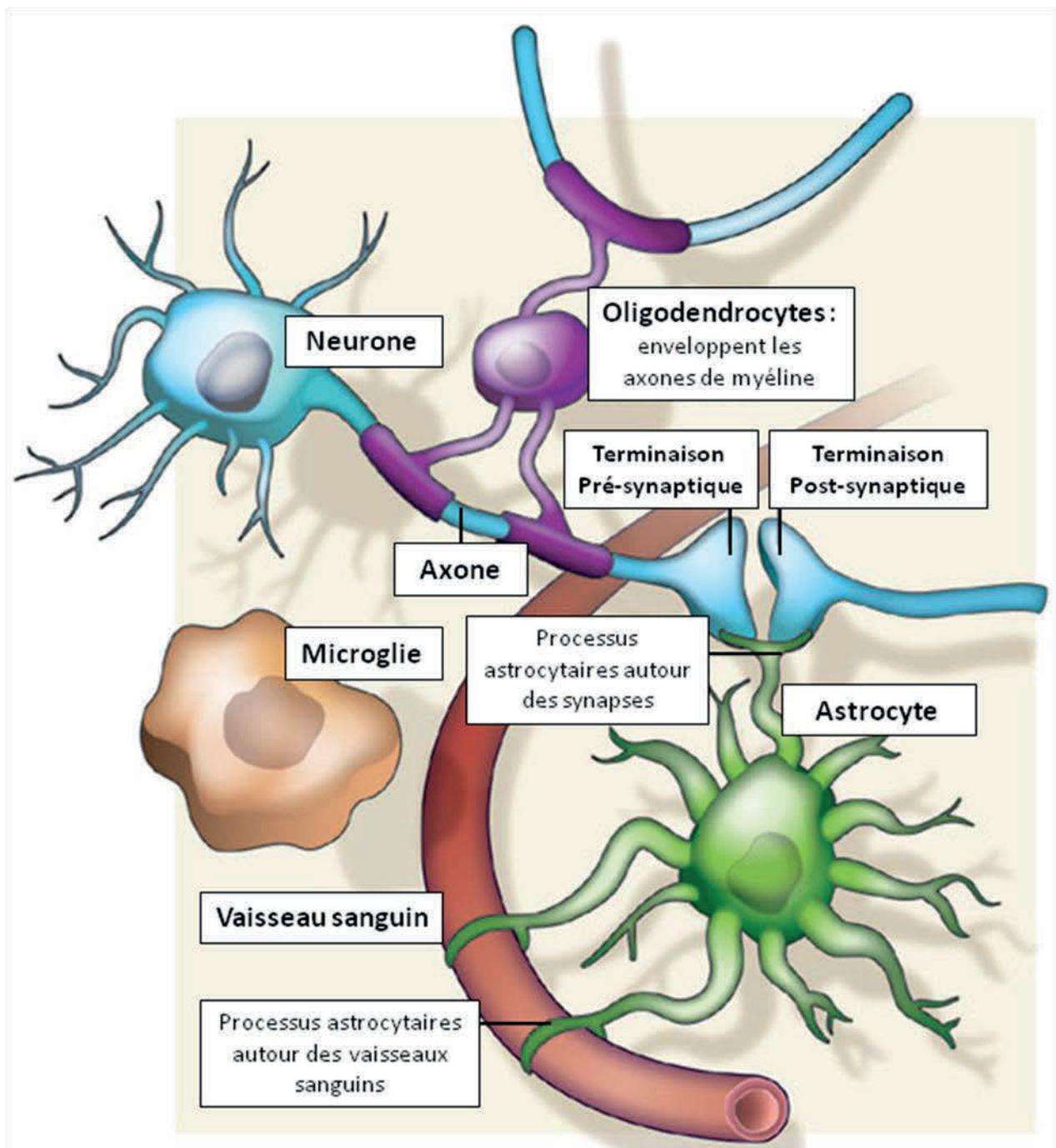


Figure 7 : Présentation des principales cellules gliales (adapté de Allen et Barres, 2009)

## Partie 2 : La synapse tripartite glutamatergique

### I. Présentation de la synapse tripartite glutamatergique

#### *I.1 Généralités*

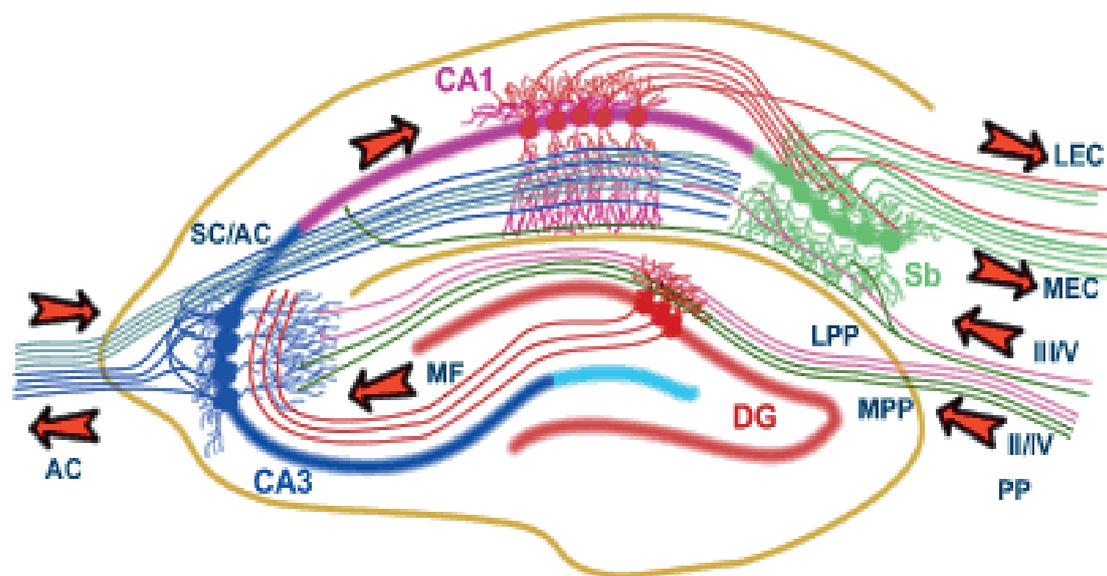
##### I.1.1 Définition

Le terme « synapse tripartite glutamatergique » caractérise l'association physique et fonctionnelle entre les neurones pré- et post-synaptiques et les astrocytes environnants. Ce concept souligne le rôle important joué par les astrocytes dans la régulation de la neurotransmission et dans la physiologie synaptique.

Découvertes en 1824 par Dutrochet, les cellules gliales ont pendant longtemps été considérées uniquement comme une substance connective servant de support physique aux neurones. Ce n'est que dans la 1<sup>e</sup> moitié du XX<sup>e</sup> siècle qu'ont été définis différents types cellulaires au sein de cette neuroglie et qu'on leur a attribué des fonctions supplémentaires. Ainsi au sein du système nerveux central, on distingue 4 types de cellules gliales (Halassa *et al*, 2007 ; Allen et Barres, 2009) (**Figure 7**) :

- Les oligodendrocytes qui synthétisent les gaines de myéline entourant les axones
- Les cellules microgliales qui constituent des cellules immunitaires résidentes du SNC et qui assurent un rôle neuroprotecteur
- Les cellules NG2+ qui ont été découvertes récemment et dont le rôle reste encore peu connu. Elles pourraient notamment constituer des cellules souches multipotentes (Richardson *et al*, 2011).
- Les astrocytes qui nous intéressent plus particulièrement au cours de cette étude.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont mis en évidence que les astrocytes participent à la régulation de la neurotransmission synaptique. D'où l'émergence du concept de synapse « tripartite » (Halassa *et al*, 2007 ; Araque *et al*, 1999). En effet, les astrocytes émettent des prolongements qui vont venir au contact et envelopper les synapses (Ventura and Harris, 1999). Ainsi, un astrocyte peut être couplé à plusieurs neurones et s'associer à plus de 100000 synapses (Halassa *et al*, 2007).



**Figure 8 : Voies hippocampales glutamatergiques**

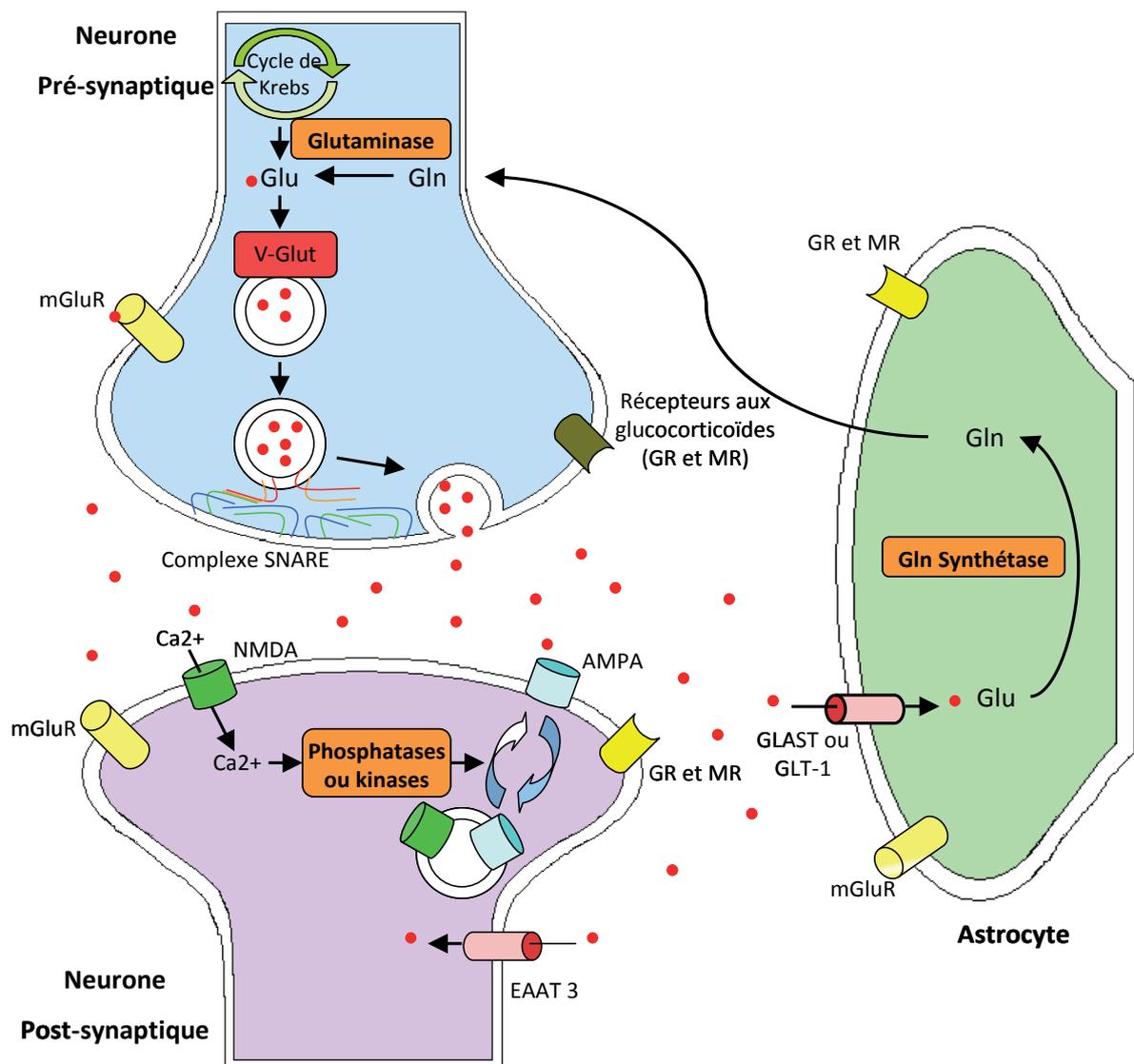
L'hippocampe forme un réseau nerveux uni-directionnel. Des fibres provenant du cortex entorhinal (EC) se projettent vers le gyrus denté (DG) *via* les voie perforantes médiales (MPP) et latérales (LPP). Les cellules granuleuses du gyrus vont émettre des fibres moussues (MF) vers les cellules apicales de la zone CA3. Les cellules de la zone CA3 vont émettre des axones vers les cellules pyramidales de la zone CA1 *via* les voies des collatérales de Schaeffer (SC) et des fibres commissurales (AC). Les neurones de la zone CA1 envoient des axones vers le subiculum (Sb), qui à leur tour, vont renvoyer un signal vers le cortex entorhinal.

### 1.1.2 La neurotransmission glutamatergique dans l'hippocampe

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC des mammifères, représentant 80 à 90 % des synapses cérébrales (Fonnun, 1984 ; Orrego *et al*, 1993 ; Watkins, 2000). La neurotransmission glutamatergique joue un rôle important pour le développement et le bon fonctionnement du système nerveux central. La neurotransmission glutamatergique est fortement impliquée dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, notamment en favorisant le processus de Potentialisation à Long Terme (LTP) (Peng *et al*, 2011 ; Riedel *et al*, 2003). Elle est particulièrement sensible au vieillissement et au stress. Ainsi, il a été montré un certain nombre de modifications de la neurotransmission glutamatergique au cours du vieillissement normal, tel qu'une diminution de la concentration en glutamate, une perturbation des capacités de capture ou encore une forte atténuation du nombre de récepteurs post-synaptiques, principalement ceux de type NMDA (Segovia *et al*, 2001). Le stress, *via* l'action des glucocorticoïdes, module également la neurotransmission glutamatergique de manière différentielle en fonction de la nature du stress. En effet, si un stress aigu aura tendance à activer la neurotransmission glutamatergique (Yuen *et al*, 2009), un stress chronique va, quant à lui, l'inhiber, affectant ainsi les processus de mémorisation (Sandi, 2011).

Les synapses glutamatergiques se retrouvent dans tout le SNC et plus particulièrement au niveau du prosencéphale. On distingue différents types de voies glutamatergiques : les voies corticofuges qui partent du cortex et se projettent soit vers d'autres zones corticales soit sur d'autres structures et les voies intra-hippocampiques (**Figure 8**) (Fagg et Foster, 1983 ; Cotman et Monaghan, 1986). Pour cette étude, seules les voies hippocampiques seront détaillées.

L'hippocampe des Mammifères est une petite structure sous-corticale enroulée sur elle-même. Il est formé de 2 structures en formes de U inversé : le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA). Cette dernière est subdivisée en 3 zones (CA1, CA2, CA3) et se compose principalement de neurones pyramidaux, qui sont des neurones excitateurs glutamatergiques. L'ensemble forme, avec quelques structures parahippocampiques, ce



**Figure 9 : Schéma récapitulatif du cycle du glutamate au sein de la synapse tripartite (adapté de Popoli *et al*, 2011)**

Le glutamate, synthétisé à partir de la glutamine ou d'autres voies telles que le cycle de Krebs, est chargé dans les vésicules pré-synaptiques grâce aux transporteurs vésiculaires du glutamate (V-Glut). Suite à l'arrivée d'un stimulus, les vésicules libèrent leur contenu dans la fente synaptique via un processus nommé exocytose et faisant intervenir les protéines du complexe SNARE. Dans la fente synaptique, le glutamate peut soit se fixer à ces récepteurs spécifiques (mGluR, AMPA, NMDA), soit être capté notamment au niveau des astrocytes grâce à des transporteurs spécifiques (GLAST et GLT-1). Au niveau des astrocytes, le glutamate est converti, sous l'action de la glutamine synthétase, en glutamine qui est renvoyé vers le neurone afin de participer au recyclage du pool de glutamate.

qu'on appelle communément la formation hippocampique ou boucle trisynaptique, qui constitue une boucle unidirectionnelle de circulation pour l'information nerveuse (Amaral *et al*, 2007) (**Figure 8**). De manière schématique, la première partie du circuit est composée de la voie perforante, qui permet l'entrée de l'information en provenance du cortex entorhinal vers le gyrus denté (Witter, 2007 ; Witter *et al*, 2000). Les cellules granuleuses du gyrus denté vont émettre des fibres myélinisées vers les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA3 (Kondo *et al*, 2008 ; Amaral *et al*, 2007). Enfin les axones des cellules de l'aire CA3 se ramifient en 2 pour d'une part former des fibres commissurales allant à l'hippocampe controlatéral et d'autre part des collatérales de Schaeffer qui constituent la 3<sup>e</sup> partie de la boucle et communiquent avec les cellules de l'aire CA1. Ceci constitue la voie principale de la neurotransmission glutamatergique au sein de l'hippocampe, bien que d'autres voies viennent s'y greffer (Amaral et Witter, 1989 ; Witter, 2007 ; Lavenex et Amaral, 2000).

## ***1.2 Le cycle du glutamate dans la synapse***

Dans le contexte de la synapse tripartite, le métabolisme du glutamate se répartit les neurones et les astrocytes (McKenna, 2007) (**Figure 9**).

### **1.2.1 Synthèse et libération du glutamate au niveau du neurone pré-synaptique**

Afin d'assurer la neurotransmission, les terminaisons synaptiques des neurones sont enrichies en mitochondries, principal siège du métabolisme énergétique. C'est au niveau de ces mitochondries présynaptiques qu'est formé le L-glutamate. Le glutamate est synthétisé principalement à partir de 3 voies métaboliques : la dégradation des protéines, la conversion de la glutamine sous l'action de la glutaminase (Kvamme *et al*, 2000 ; Bak *et al*, 2006), et enfin la transamination de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarate issu du cycle de Krebs (Bak *et al*, 2006).

Une fois dans le cytosol de la cellule, le glutamate va être chargé dans des vésicules sous l'action de transporteurs vésiculaires spécifiques. Actuellement, trois types de transporteurs ont été identifiés : V-Glut 1, 2 et 3. Contrairement aux transporteurs V-Glut-1 et 2, le transporteur V-Glut 3 est exprimé principalement par des neurones non glutamatergiques tels que les neurones cholinergiques ou sérotoninergiques (Omote *et al*, 2011 ; Gras *et al*, 2002).

Lorsqu'une dépolarisation présynaptique survient, les vésicules chargées de glutamate déversent leur contenu dans la fente synaptique *via* un processus  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant -l'exocytose-, provoquant une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate pouvant atteindre 1000 fois celle de repos.

### 1.2.2 Capture et recyclage du glutamate

Les cellules du SNC possèdent au niveau de leurs membranes des transporteurs spécifiques du glutamate. Cinq types de transporteurs ont été identifiés. Au niveau des astrocytes, la capture du glutamate s'effectue principalement via les transporteurs GLAST/EATT1 et GLT1/EAAT2. Les neurones possèdent également leurs propres récepteurs, EAAC1/EAAT3, qui sont exprimés en moindres proportions comparées à ceux des cellules gliales (Nieoullon *et al* 2006) Enfin, les transporteurs EAAT4 et EAAT5, contrairement aux autres qui sont ubiquitaires, sont exprimés exclusivement au niveau du cervelet et de la rétine.

Dans le SNC, 90% de la capture du glutamate est effectuée par les astrocytes (Rothstein *et al*, 1996), ce qui traduit l'importance de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie au niveau de la fente synaptique en captant le glutamate en excès. Lors de la neurotransmission, la concentration de glutamate dans la fente s'élève de manière dramatique d'un niveau de base (ou de repos d'environ 25nM) à des niveaux pouvant être toxiques s'ils ne sont pas atténués rapidement (proche de 100  $\mu\text{M}$  à 1mM) (Danbolt 2001). Une fois capté dans les astrocytes, le glutamate peut suivre différentes voies métaboliques, dont les principales sont son entrée dans le cycle de Krebs, fournissant de l'énergie à l'organisme, sa conversion en glutathion pour prévenir du stress oxydatif et son recyclage en glutamine, qui va pouvoir être redistribuée au niveau du neurone présynaptique et alimenter un nouveau pool de neurotransmetteur (Kvamme *et al*, 2001). Le glutamate est converti en association avec de l'ammonium en glutamine sous l'action de la glutamine synthetase (GS), enzyme spécifique des astrocytes dans le SNC (Walton et Dodd, 2007). Cette glutamine est ensuite transférée aux neurones par des systèmes de transports spécifiques (Chaudhry *et al*, 2002) pour être recyclée en glutamate sous l'action de la glutaminase phosphate-dépendante.

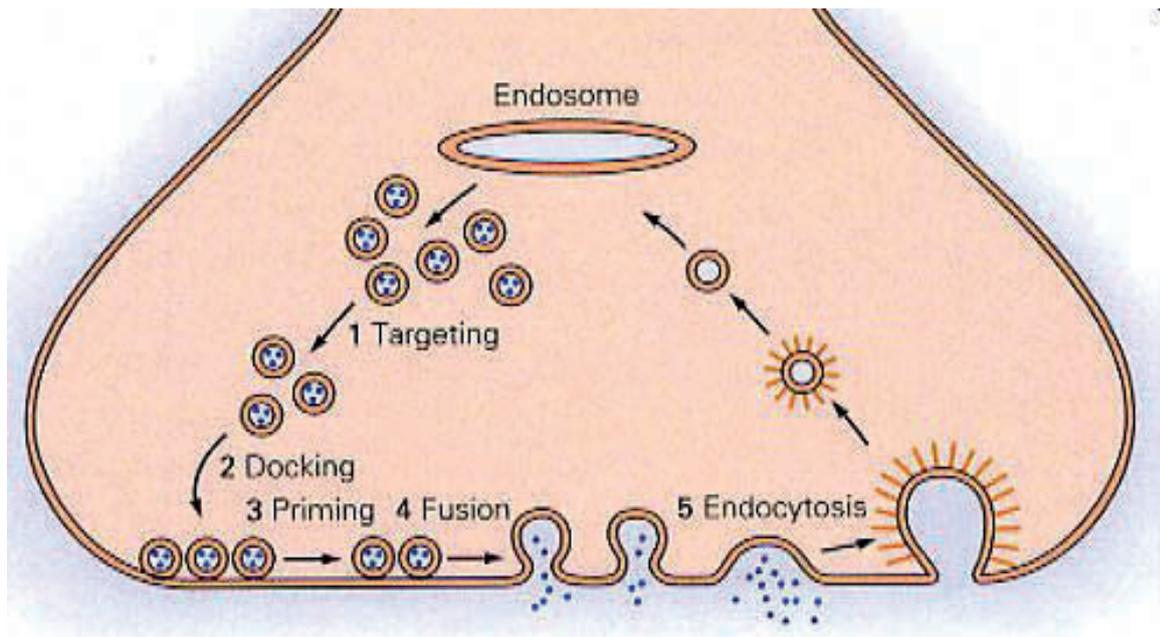
## **II. La neurotransmission glutamatergique : mécanismes neuronaux**

### ***II.1 Mécanismes pré-synaptiques de la neurotransmission***

#### **II.1.1 Transport vésiculaire du glutamate**

Au niveau des extrémités présynaptiques, le chargement des vésicules synaptiques s'effectue principalement *via* les transporteurs V-Glut 1 et 2. Ces transporteurs sont exprimés au niveau des neurones glutamatergiques de manière complémentaire au sein des différentes structures cérébrales. Ainsi V-Glut 1 est davantage exprimé au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet, tandis que V-Glut2 se retrouve principalement au niveau du thalamus, de l'hypothalamus et du tronc cérébral (Fremeau *et al*, 2001 ; Fremeau *et al*, 2004). Cette différenciation de localisation suggère une différenciation fonctionnelle. En effet, les différences régionales d'expression des 2 transporteurs sont corrélées avec la probabilité de libération du neurotransmetteur. Les synapses comme celle de l'hippocampe, ayant une faible probabilité de libération mais à l'inverse un fort potentiel de plasticité à court terme (telle que la facilitation de réponse, appelée Paired-Pulse Facilitation (PPF) lors de stimulations rapprochées), expriment préférentiellement V-Glut 1. A l'inverse, les synapses exprimant VGlut 2, comme les neurones sensoriels du tronc cérébral, présentent une plus forte probabilité de libération du neurotransmetteur mais des propriétés plastiques plus faibles (Fremeau *et al*, 2001 ; Fremeau *et al*, 2004). Les différentes isoformes des transporteurs vésiculaires ayant des propriétés cinétiques et pharmacologiques similaires (Kaneko et Fujiyama, 2002), le lien entre leur expression et les propriétés de libération synaptique fait donc intervenir d'autres mécanismes. Il a été proposé récemment un modèle dans lequel le degré d'interaction entre les différentes isoformes des V-Glut et l'endophiline A1 (protéine impliquée dans les processus d'endocytose et de recyclage des vésicules) pourrait réguler ces propriétés synaptiques (Weston *et al*, 2011).

L'accumulation de neurotransmetteur dans les vésicules synaptiques *via* les V-Glut constitue un transport actif, fortement dépendant du potentiel de membrane et du gradient électrochimique en protons H<sup>+</sup> (Bai *et al*, 2001 ; Juge *et al*, 2006). Elle est également régulée par la présence des ions Cl<sup>-</sup>, activateur allostérique qui pourrait jouer à la fois sur l'activité propre des transporteurs et sur le gradient électrochimique de protons et dont l'action est bloquée par la présence de corps cétoniques (Omote *et al*, 2011 ; Edwards, 2007).



**Figure 10 : Etapes du processus d'exocytose**

L'exocytose, processus permettant la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique s'effectue en 3 étapes clés. Après l'arrivée d'un stimulus, les vésicules sont adressées vers la membrane (Targeting) et s'y amarrent (Docking). Elles vont alors subir une maturation (Priming), qui leur permet de fusionner avec la membrane (Fusion) et de libérer leur contenu dans la fente synaptique. Ce processus est suivi d'une phase d'endocytose permettant le recyclage des vésicules.

### II.1.2 La libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique

La libération de neurotransmetteur par exocytose dans la fente synaptique nécessite de l'ATP et s'effectue en 3 étapes consécutives : (1) les vésicules chargées en neurotransmetteurs viennent s'amarrer à la membrane plasmique (« docking ») au niveau de la zone active, (2) elles subissent une activation (« priming ») qui leur permet d'acquérir leurs propriétés de fusion avec la membrane, (3) suite à l'arrivée de calcium, elles fusionnent avec la membrane et libèrent leur contenu en neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'exocytose est suivie d'une phase d'endocytose, au niveau de la zone périaactive, permettant le recyclage des vésicules (Südhof, 2004 ; Richmond, 2007 ; Rorhough et Broadie, 2005) (**Figure 10**).

La première phase, correspondant à la migration et à l'arrimage des vésicules présynaptiques au niveau de la zone active, permet de définir trois pools différents de vésicules : des vésicules rapidement mobilisables (RRP : Readily Releasable Pool) amarrées à la membrane et prêtes à fusionner, un pool de vésicules recyclées et enfin un pool de réserve (Rizzoli et Betz, 2005). Le pool de vésicules mobilisables conditionne la réponse rapide suite à l'arrivée d'une stimulation, tandis que les autres pools interviennent lors de stimulations prolongées, lorsque le premier stock de vésicules mobilisables est épuisé. La libération des neurotransmetteurs des vésicules synaptiques dans l'espace extracellulaire est  $Ca^{2+}$ -dépendante et peut s'effectuer selon différents modes (Pang et Südhof, 2010) :

- Une libération spontanée ou basale indépendante de l'arrivée de potentiel d'action, qui serait liée aux concentrations calciques de repos et/ou aux stocks intracellulaires de calcium.
- Une libération stimulée synchrone qui a lieu instantanément lors de l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de l'extrémité présynaptique (Katz, 1969). Le potentiel d'action va entraîner l'ouverture de canaux calciques et permettre un influx calcique transitoire responsable de l'exocytose des vésicules présynaptiques.
- Une libération stimulée asynchrone qui est légèrement décalée par rapport à l'arrivée du potentiel d'action et qui est le plus souvent négligeable comparée à la libération stimulée synchrone.

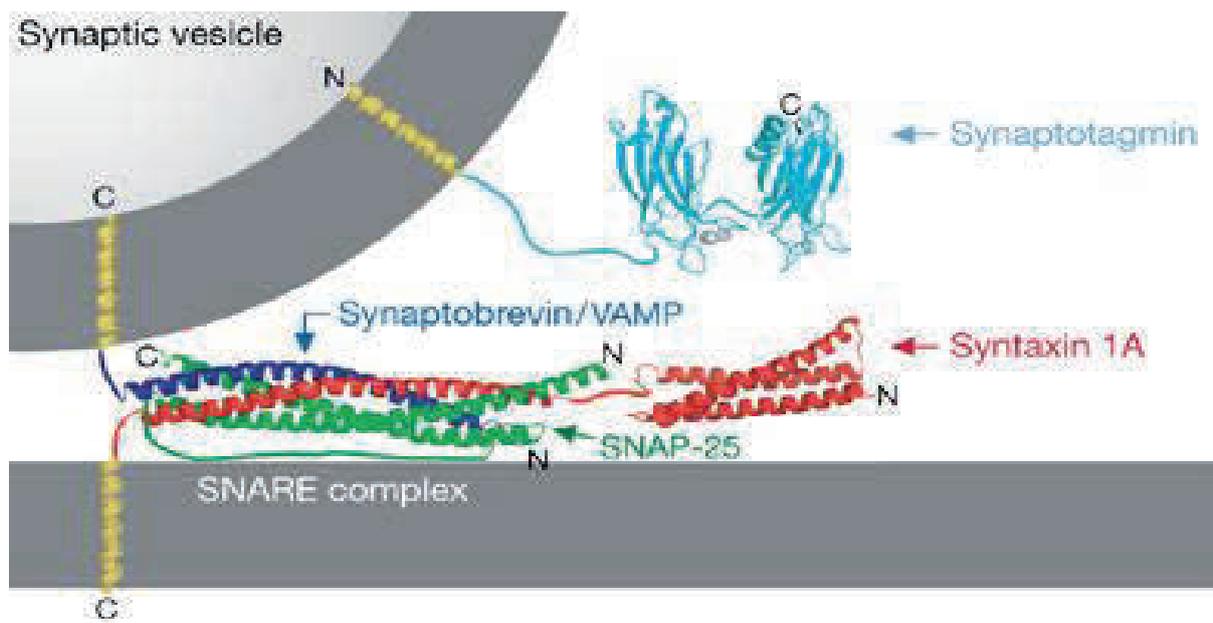


Figure 11 : Formation du complexe SNARE (Carr et Munson, 2007)

La zone active des membranes présynaptiques est une zone hautement spécialisée dont l'architecture est organisée de manière à faciliter l'arrimage et l'exocytose des vésicules (Zhai et Bellen, 2004). Elle est constituée d'un segment de membrane plasmique riche en canaux calciques voltage-dépendant (Robitaille *et al*, 1990 ; Kawasaki *et al*, 2004) et d'une zone dense en électrons révélant un réseau dense et ramifié de filaments d'actine sur lesquels sont fixées un grand nombre de vésicules (Zhai et Bellen, 2004 ; Dresbach *et al*, 2001 ; Südhof, 2004). La colocalisation entre les canaux calciques et les zones de libération de neurotransmetteurs suggère que ces phénomènes sont intimement liés. Ainsi, la probabilité de libération de neurotransmetteur est liée à la distance séparant les canaux calciques et les vésicules au niveau de la zone active (Bennett *et al*, 2000). Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, le délai entre l'entrée de  $Ca^{2+}$  et la libération de neurotransmetteurs est de l'ordre de 0,2 ms (Stanley, 1997).

La libération du neurotransmetteur au niveau de la zone active nécessite la fusion des vésicules avec la membrane plasmique présynaptique. Cette étape fait intervenir le complexe protéique SNARE (**Figure 11**), site de fixation du NSF (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive Factor) et des SNAPs (Soluble NSF Accessory Protein). Ce complexe est constitué de protéines de la membrane plasmique neuronale (syntaxine et SNAP 25 (synaptosomal-associated protein 25kDa) et de la membrane vésiculaire (synaptobrevine ou VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein)). Celles-ci possèdent un motif commun spécifique en hélice  $\alpha$  (motifs SNARE) qui va permettre leur association en un complexe très stable, aboutissant à l'arrimage puis à la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Richmond, 2007 ; Südhof, 2004 ; Südhof et Rothman, 2009). Ce processus est complexe et fait intervenir différents autres partenaires telles que les protéines SM (Sec1/Munc-18 like) qui collaborent étroitement avec le complexe SNARE pour réguler la fusion des vésicules à la membrane, la synaptotagmine qui détecte les variations de  $Ca^{2+}$  ou encore les protéines Rab et RIM qui participent à l'amarrage des vésicules à la membrane (Südhof, 2004 ; Carr et Rizo, 2010 ; Südhof et Rothman, 2009).

### II.1.3 Régulation des phénomènes présynaptiques par les AGPI

Les lipides membranaires (phospholipides et sphingolipides), en général, sont connus pour leur rôle joué dans l'exocytose, le trafic vésiculaire et l'endocytose (Rorhbough et Broadie, 2005). Cependant, le rôle spécifique des différents types d'acides gras est moins

connu et si l'action directe de certains acides gras, comme la palmitoylation (fixation d'un acide palmitique C 16:0 sur des protéines, telles que SNAP 25 et VAMP-2, afin d'en réguler l'activité), sur les processus d'exocytose a été bien décrite (Davlevtov *et al*, 2007), ce n'est que plus récemment que l'on a commencé à s'intéresser au rôle joué par les AGPI, tels que le DHA ou l'AA.

Des études ont montré l'implication des AGPI n-6 et n-3 dans le stockage vésiculaire et la libération de neurotransmetteurs, notamment au niveau de la transmission monoaminergique (Chalon, 2006). Les travaux de l'équipe de S. Chalon ont notamment montré qu'une déficience en AGPI n-3 réduirait le pool de vésicules présynaptiques disponibles, modulerait l'expression des transporteurs vésiculaires et ainsi modifierait les paramètres de libération de la dopamine et de la sérotonine (Zimmer *et al*, 2000 ; Zimmer *et al*, 2002 ; Kudas *et al*, 2004). Cependant, si l'implication des AGPI dans la libération de neurotransmetteur est certaine, les mécanismes d'action impliqués restent encore peu connus.

Des études suggèrent que les AGPI pourraient moduler la libération présynaptique des neurotransmetteurs *via* la régulation de la formation du complexe SNARE, indispensable à l'exocytose des vésicules. Une étude menée chez le rat a montré qu'une déficience alimentaire en AGPI n-3 est associée à une augmentation de la formation du complexe SNARE dans l'hippocampe, sans modulation de l'expression des différentes protéines impliquées dans sa formation (Pongrac *et al*, 2007). Ceci pourrait refléter soit un problème de désassemblage, soit un trafic vésiculaire présynaptique plus intense. On sait également que les protéines SM régulent les phénomènes d'exocytose. Elles agiraient notamment en se fixant aux syntaxines (1 ou 3 essentiellement), les bloquant ainsi dans une conformation empêchant la formation ultérieure d'un complexe SNARE (Perez-Branguli *et al*, 2002). L'AA est capable de lever cette inhibition en se fixant à son tour à ce complexe Munc18-Syntaxine (Rickman et Davlevtov, 2005 ; Connell *et al*, 2007 ; Latham *et al*, 2007). Un modèle similaire de régulation par le DHA a été montré autour de la protéine Syntaxine 3 (Darios et Davlevtov, 2006).

Un autre mécanisme d'action possible des AGPI sur les phénomènes présynaptiques serait la régulation du recyclage vésiculaire. Des études menées sur le nématode

*Caenorhabditis elegans* fat-3 (déficient en AGPI-LC) ont permis de mettre en évidence un rôle central des AGPI et en particulier de l'AA dans les phénomènes d'exocytose (Marza *et al*, 2008). Ainsi, si la production et le transport des vésicules présynaptiques s'effectuent de manière normale chez ce nématode, le recyclage des vésicules est défectueux et aboutit à l'internalisation de vésicules anormalement larges. Ce défaut dans le recyclage, corrigé en présence d'AA, semble lié au rôle joué par les AGPI-LC sur la localisation de la synaptojanin au niveau des sites de libérations des neurotransmetteurs (Marza *et al*, 2008).

Enfin, les AGPI, en particulier l'AA, jouent un rôle important dans la régulation des canaux ioniques voltage-dépendant (Boland et Drzewiecki, 2008 ; Meves, 2008). Cette action peut se faire soit de manière directe, soit via leurs dérivés tels que les prostaglandines ou encore les endocannabinoïdes.

## ***II.2 Récepteurs post-synaptiques et plasticité cérébrale***

### **II.2.1 Récepteurs post-synaptiques du glutamate**

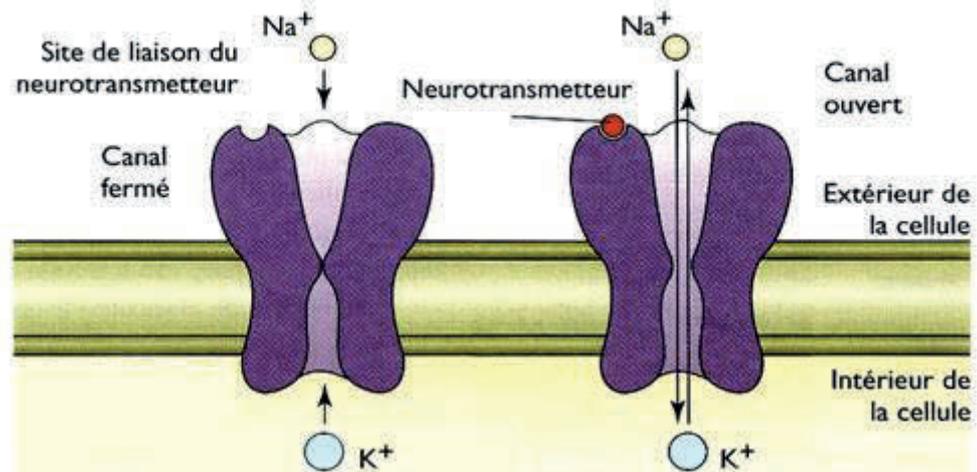
Il existe deux principaux types de récepteurs au glutamate : les récepteurs ionotropiques qui consistent en des canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques qui sont couplés à des protéines G (**Figure 12**).

#### **A-LES RECEPTEURS IONOTROPIQUES**

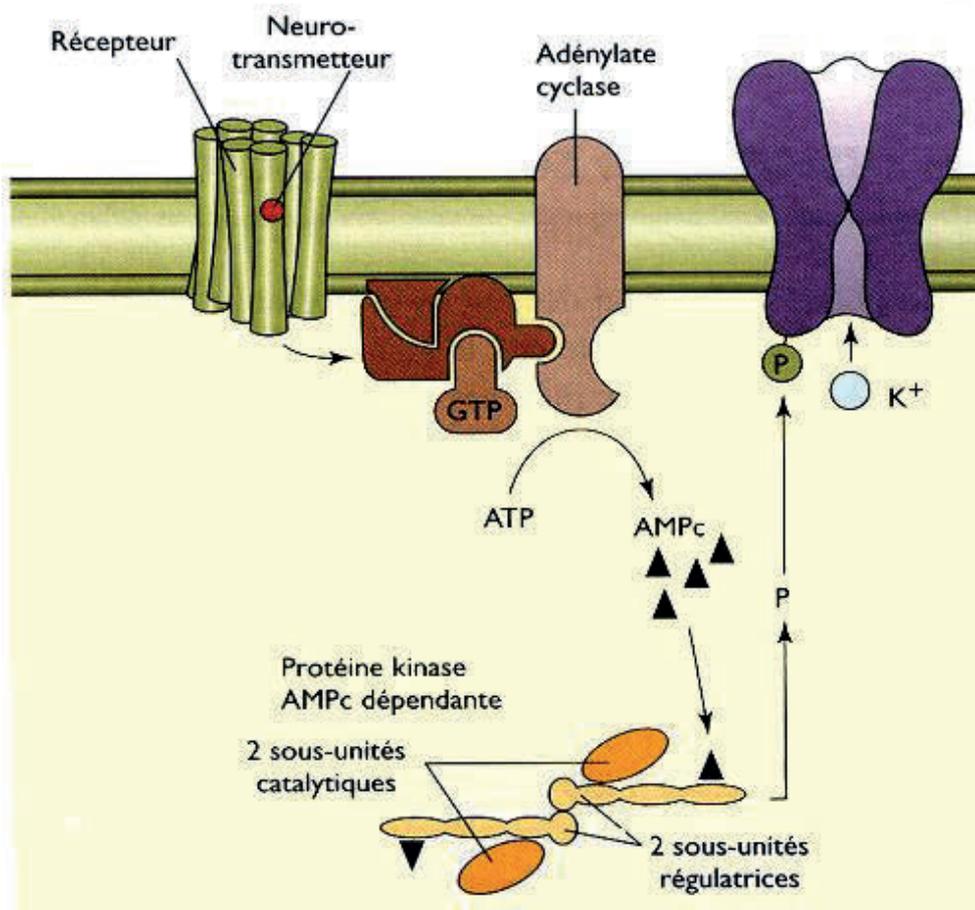
Les récepteurs ionotropiques assurent une neurotransmission rapide. Il en existe 3 types principaux dont le nom est déterminé par leur principal agoniste : les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), les récepteurs kainate (KA) et les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) (Walton et Dodd, 2007).

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs tétramériques composés principalement des sous-unités NR1 et NR2 (A, B, C, D). Récemment, un 3<sup>e</sup> type de sous-unités, les NR3 (A et B), a été décrit. La forte variété de sous-unités de ces récepteurs leur confère une importante hétérogénéité de structure, associée à une certaine hétérogénéité de fonction (Paoletti, 2011). Cependant, ils possèdent également un certain nombre de propriétés communes. Ils possèdent un site de fixation au glutamate ainsi qu'un site allostérique, dit « site glycine ». Leur activation nécessite donc la fixation de L-glutamate, mais également celle d'un co-agoniste au niveau du site glycine. La D-sérine, synthétisée au niveau des

## RÉCEPTEUR IONOTROPIQUE



## RÉCEPTEUR MÉTABOTROPIQUE



**Figure 12 : Principe général d'action des récepteurs ionotropiques et métabotropiques**

Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques, qui, une fois activé par l'arrivée du neurotransmetteur, s'ouvre afin de permettre des flux ioniques au travers de la membrane. Les récepteurs métabotropiques sont quant à eux couplés à des protéines G ; ainsi, leur activation engendre la synthèse de messagers secondaires.

astrocytes grâce à la sérine racémase, constitue un des principaux co-agonistes endogènes de ces récepteurs. Ainsi, des expériences utilisant la D-amino acid oxydase (DAAO), qui dégrade spécifiquement la D-sérine, ont montré une sévère altération de l'activité des récepteurs NMDA (Mothet *et al*, 2000 ; Shleper *et al*, 2005 ; Panatier *et al* 2006). Perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et aux cations monovalents (Magleby, 2004), les récepteurs NMDA possèdent 2 autres sites de régulation de leur activité : un site cationique, sur lequel se fixe un bouchon de  $\text{Mg}^{2+}$  extracellulaire bloquant l'activation des récepteurs (Nowak *et al*, 1984) et un site de liaison aux médicaments psychotropes, appelé site PCP. Au potentiel de repos du neurone (entre -60 et -70mV), la liaison du glutamate sur le récepteur NMDA ne permet pas d'activer l'entrée d'ions par le canal qui est bloqué par le magnésium. Ce bouchon de magnésium nécessite une dépolarisation suffisante, suite à l'activation préalable des récepteurs AMPA et kainate, pour sauter et permettre l'activation des récepteurs NMDA (Nowak *et al*, 1984). Le blocage par le magnésium confère donc au récepteur NMDA ses propriétés de dépendance vis-à-vis du potentiel membranaire. De par leur mécanisme d'action, ces récepteurs sont fortement impliqués dans la plasticité cérébrale et en particulier dans le phénomène de LTP (Potentialisation à Long Terme) (Walton et Dodd, 2007).

Les récepteurs AMPA sont des complexes tétramériques formés de l'association des sous-unités GluR1-4 (Palmer *et al*, 2005). La description de la structure anatomique complète d'un récepteur AMPA homotétramérique a été réalisée récemment (Sobolevski *et al*, 2009). Ils forment des canaux ioniques, qui, suite à la fixation de glutamate, permettent l'entrée de cations, notamment de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (Walton et Dodd, 2007). Contrairement aux récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA ne nécessitent pour être activés que la fixation de glutamate et ont une cinétique d'activation et de désactivation extrêmement rapide, de l'ordre de la milliseconde (Hansen *et al*, 2007). De par cette rapidité de réponse, ils sont responsables de la majorité de la neurotransmission glutamatergique rapide. Leur fonction est fortement régulée par la composition de leurs sous-unités qui possèdent des propriétés spécifiques, des modifications telles que la glycosylation ou la phosphorylation de leurs sous-unités ou encore des interactions protéines-protéines (Palmer *et al*, 2005). L'endocytose, l'exocytose et le recyclage, ainsi que la phosphorylation des récepteurs AMPA sont des processus complexes finement régulés qui interviennent dans la régulation de la plasticité synaptique comme nous le décrirons par la suite (Palmer *et al*, 2005 ; Shepherd et Huganir,

2007). De plus, bien que la majorité des récepteurs comportent des sous-unités GluR2, il existe une population de récepteurs AMPA ne contenant pas cette sous-unité et cette particularité morphologique leur confère une perméabilité spécifique aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollman *et al*, 1991). Cette perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait notamment leur conférer un rôle dans la plasticité synaptique non-NMDA dépendante (Asrar *et al*, 2009).

Enfin, le dernier type de récepteurs ionotropiques au glutamate est constitué par les récepteurs kainate. Contrairement aux récepteurs NMDA et AMPA, ce type de récepteur a fait l'objet de peu d'études jusqu'alors, bien qu'il semble jouer un rôle important dans la neurotransmission et la plasticité synaptique (Bloss et Hunter, 2010). Ils seraient impliqués dans la régulation de la libération de neurotransmetteurs, notamment en inhibant cette dernière au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (Schmitz *et al*, 2001 ; Rodriguez-Moreno et Sihra, 2011).

## **B- LES RECEPTEURS METABOTROPIQUES**

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs) sont composés de 7 domaines transmembranaires et couplés à des protéines G. Ils assurent une réponse plus lente de l'information nerveuse. On distingue 8 mGluRs différents répartis en 3 familles : le groupe I comptant les mGluRs 1 et 5, le groupe II comprenant les mGluRs 2 et 3 et enfin le groupe III constitué des mGluRs 4, 6, 7 et 8 (Walton et Dodd, 2007). Bien qu'on retrouve les 3 groupes de récepteurs métabotropiques à tous les niveaux de la synapse, le groupe I est préférentiellement post-synaptique, le groupe II est surtout extrasynaptique tandis que le groupe III est davantage pré-synaptique (Wieronska *et al*, 2009). Récepteurs homodimériques (Kunishima *et al*, 2000), ils nécessitent la fixation de glutamate sur leurs 2 sites de fixation pour une complète activité (Kniazeff *et al*, 2004). Répartis dans tout le SNC, ils sont très présents au niveau des structures limbiques (Palucha et Pilc, 2007). Ils semblent également impliqués dans la régulation de la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs et dans les phénomènes de plasticité synaptique, tels que la LTP et la LTD, associées aux capacités de mémorisation et d'apprentissage des individus (Gladding *et al*, 2009 ; Anwyl, 2009 ; Niswender et Conn, 2010).

Le groupe I des mGluRs est classiquement couplé à la phospholipase C. Il active ainsi l'hydrolyse des phosphatidylinositides et la génération de diacylglycérol et d'IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-

triphosphate), qui respectivement active la phosphokinase C (PKC) et mobilise le stock de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Cependant, il est de plus en plus reconnu que le groupe I des mGluRs serait impliqué dans l'activation d'autres voies telles que celles de la phospholipase D (PLD), des phospholipases A2 (PLA2) et des MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular receptor kinase) (Hermanns et Challiss, 2001 ; Niswender et Conn, 2010).

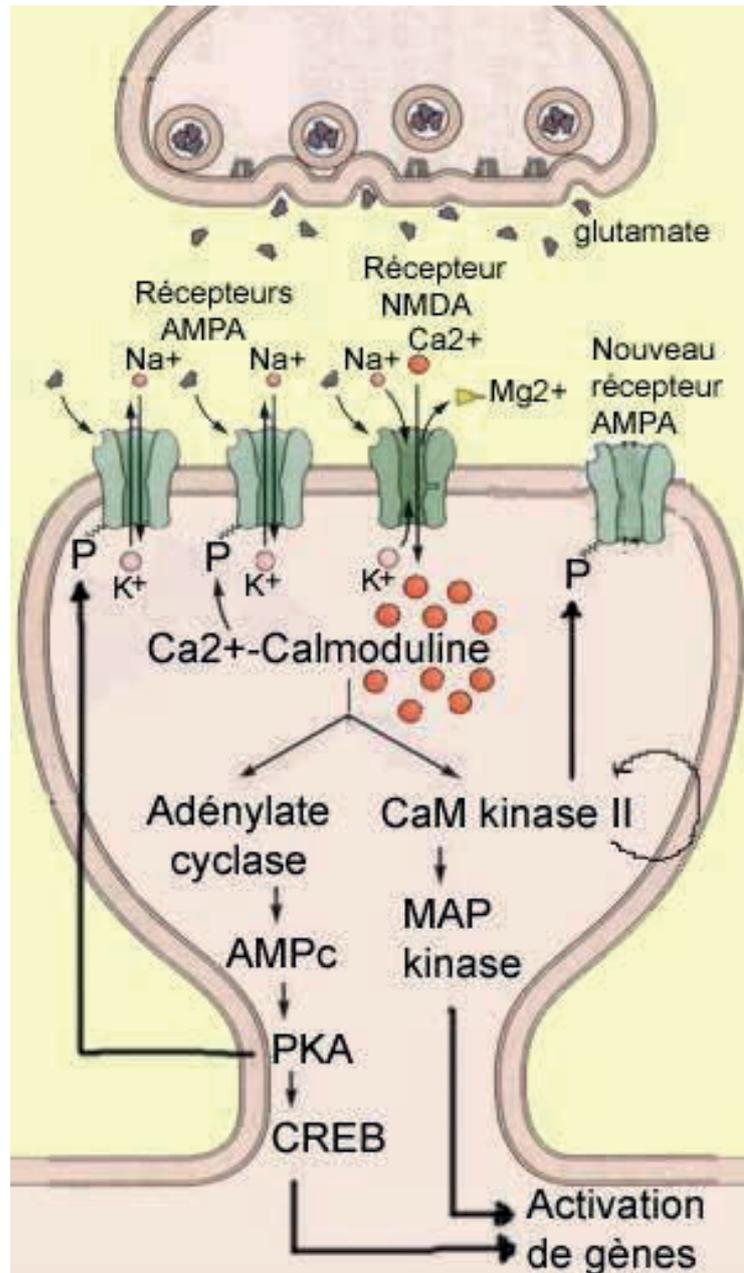
Les groupes II et III des mGluRs sont, quant à eux, couplés à l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase et régulent l'activité des canaux ioniques. Bien que, comme pour le groupe I des mGluRs, ils semblent associés à d'autres voies métaboliques, notamment la voie des MAPK et du PI3-kinase (phosphatidyl inositol 3-kinase) (Niswender et Conn, 2010). Le récepteur mGluR7, du groupe III des mGluRs, est fortement exprimé dans le cerveau des Mammifères. Il présente une affinité au glutamate relativement faible, suggérant qu'il n'est activé que dans des situations d'excès de glutamate afin de réduire la libération pré-synaptique. Des expérimentations sur souris KO (mGluR7<sup>-/-</sup>) ont montré un rôle de ce récepteur dans les processus d'apprentissage, de cognition et de mémorisation ainsi que dans les troubles liés à l'anxiété ou au stress (O'Connor *et al*, 2010).

### II.2.2 Plasticité synaptique

Principalement décrite au niveau de l'hippocampe et du cortex, la plasticité synaptique est une caractéristique des synapses glutamatergiques, qui joue un rôle important dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. Il s'agit d'une modification durable de l'efficacité de la transmission synaptique suivant une modification de l'activité synaptique. On distingue 2 grands types de plasticité, la LTP (Potentialisation à long terme) et la LTD (Dépression à long terme) (Citri et Malenka, 2008).

#### **A- POTENTIALISATION A LONG TERME (LTP)**

La LTP, décrite pour la première fois dans les années 70 par l'équipe de Bliss et Lomo (Bliss et Lomo, 1970 ; Bliss et Lomo, 1973), correspond à une augmentation à long terme de la transmission synaptique suivant une stimulation brève à haute fréquence (Bennett, 2000).



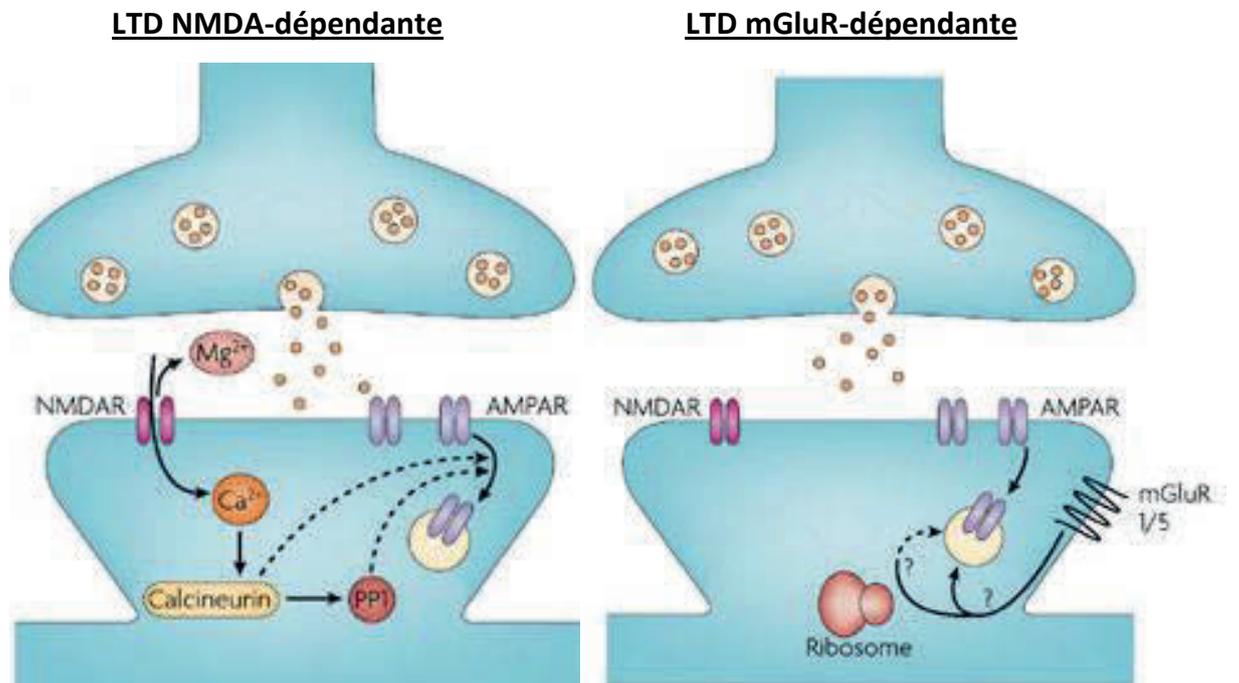
**Figure 13 : Mécanismes impliqués dans le processus de LTP NMDA-dépendante**

Les stimulations utilisées induisent une dépolarisation post-synaptique suffisante pour faire sauter le bouchon magnésium qui bloque les récepteurs NMDA et ainsi permettre leur activation et l'entrée massive de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. Cette entrée de calcium va stimuler les voies de signalisation type kinases (CamKII, adénylate cyclase). (<http://lecerveau.mcgill.ca/>)

La forme la plus décrite de LTP est dépendante de l'activation des récepteurs NMDA (**Figure 13**). Ainsi, Collingridge *et al* (1983) ont montré que l'utilisation d'un antagoniste spécifique des NMDA, DL-2-amino-5-phosphonoralenatate (APV), bloque l'induction de la LTP. Lors d'une LTP, la stimulation est assez intense pour générer une dépolarisation suffisante pour faire sauter le bouchon de magnésium qui bloque les récepteurs NMDA. Ces derniers, activés par le glutamate, peuvent alors s'ouvrir et permettre une forte entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de l'extrémité post-synaptique, indispensable à l'induction d'une LTP (Bennett, 2000). L'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  est indispensable à l'induction de la LTP, comme l'ont montré des expériences utilisant des chélateurs du calcium (Lynch *et al*, 1983) et va activer la voie des protéines kinases impliquées dans le maintien de la LTP.

La protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante II (CaMKII) est sensible à cette élévation de calcium dans la cellule et va initier une cascade de réactions permettant de potentialiser la réponse synaptique (Lisman *et al*, 2002 ; Lisman *et al*, 2003). Cette protéine va notamment permettre la phosphorylation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA membranaires, ce qui va renforcer leur activité de canaux, ainsi que l'incorporation dans les membranes de nouveaux récepteurs AMPA. Ainsi, la potentialisation de la réponse synaptique résulte au niveau post-synaptique à la fois d'une augmentation du nombre de récepteurs et d'une potentialisation de leur activité (Lisman *et al*, 2002 ; Malenka, 2003 ; Sheng et Lee, 2003 ; Lucchesi *et al*, 2011). De plus, la protéine CaMKII va interagir avec d'autres protéines membranaires, et en particulier les récepteurs NMDA. Sa fixation à la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA, associée à sa capacité d'autophosphorylation est notamment indispensable à l'induction et au maintien de la LTP pendant plusieurs heures (Lucchesi *et al*, 2011 ; Sanhueza *et al*, 2011).

L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  va également activer la protéine adénylate cyclase  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline dépendante (Lisman *et al*, 2003). Cette enzyme va permettre la production du second messenger AMPc qui, à son tour, va catalyser l'activité de la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation de certaines protéines clés par la PKA va, tout comme la voie de la CaMKII, réguler un certain nombre de processus impliqués dans la plasticité synaptique, telle que la transcription génique, le trafic et l'expression à la membrane des récepteurs du glutamate (AMPA et NMDA), ainsi que leur efficacité (Abel et Nguyen, 2008 ; Nguyen et Woo, 2003).



**Figure 14 : Mécanismes impliqués dans les processus de LTD NMDA- et mGluR-dépendante (adapté de Kauer et Malenka, 2007)**

On distingue 2 formes de LTD : l'une faisant appel à l'activation des récepteurs NMDA et l'autre à celle des récepteurs mGluR et plus particulièrement mGluR1 et mGluR5. Si les mécanismes de la LTD NMDA-dépendante (activation des voies de signalisation de type phosphatases) sont davantage décrits que ceux impliqués dans la LTD mGluR-dépendante, le processus de LTD se finalise dans les 2 cas par une internalisation des récepteurs AMPA post-synaptiques.

Des études suggèrent qu'à cette composante post-synaptique rapide de la LTP, s'ajoute une composante pré-synaptique plus lente (Bayazitov *et al*, 2007 ; Lisman et Raghavachari, 2006 ; Nicholl et Schmitz, 2005). Suite à l'activation post-synaptique, un signal rétrograde vers l'extrémité pré-synaptique permettrait ainsi de potentialiser la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. Cependant, la nature de ce messenger rétrograde et son mode d'action reste à ce jour inconnu. Quelques études suggèrent un rôle des récepteurs kainate dans cette composante pré-synaptique de la LTP (Schmitz *et al*, 2001 ; Bortolotto *et al*, 2003 ; Lauri *et al*, 2007).

Dans certains cas particuliers, la LTP n'est pas NMDA-dépendante. C'est le cas par exemple des synapses entre les fibres moussues et les dendrites du champ CA3 de l'hippocampe (Monaghan *et al*, 1983). Il a notamment été montré l'implication des récepteurs métabotropiques au glutamate, principalement mGluR1 et mGluR5, dans certaines formes de LTP (Anwyl, 2009) ou encore des récepteurs AMPA perméables aux cations  $Ca^{2+}$  (Asrar *et al*, 2009).

## **B- DEPRESSION A LONG TERME (LTD)**

A l'inverse de la LTP, la LTD, décrite pour la première fois par l'équipe de Lynch (Barrionuevo *et al*, 1980), correspond à une diminution à long terme de la transmission synaptique suivant une stimulation prolongée à basse fréquence. Dans la région CA1 de l'hippocampe, on distingue 2 formes principales de LTD : NMDA-dépendante ou mGluR-dépendante (**Figure 14**). D'autres formes de LTD faisant intervenir les endocannabinoïdes ou les récepteurs à la dopamine existent également, mais sont minoritaires au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (Anwyl, 2006) et ne seront pas décrites dans cette étude.

La première forme est liée à l'activation des récepteurs NMDA (Dudek et Bear, 1992). A l'inverse de la LTP qui induit l'activation des voies kinases, la LTD NMDA-dépendante est associée à une faible entrée de  $Ca^{2+}$  *via* les récepteurs NMDA dans la cellule post-synaptique et à l'activation des voies phosphatases, comme la phosphatase calcium/calmodulin-dépendante calcineurine (ou phosphatase AB) et PP1 (Santos *et al*, 2009 ; Citri et Malenka, 2008). On observe notamment une déphosphorylation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA (Lee *et al*, 2000), aboutissant à une réduction de leur activité. Cette déphosphorylation des récepteurs est accompagnée d'une endocytose des récepteurs

AMPA, notamment via les protéines clathrine et dynamine (Beattie *et al*, 2000 ; Brown *et al*, 2005 ; Santos *et al*, 2009 ; Kessels et Malinow, 2009).

La deuxième forme de LTD au niveau de la région CA1 de l'hippocampe est engendrée par l'activation des récepteurs mGluRs du groupe I (mGluR 1 et 5), suite à des stimulations électriques à basses fréquences (Lüscher et Huber, 2010 ; Gladding *et al*, 2009 ; Bellone *et al*, 2008). Cette forme de LTD mGluR-dépendante semble faire intervenir un certain nombre de protéines telles que des phosphatases et des kinases (Rush *et al*, 2002 ; Gallagher *et al*, 2004 ; Moulton *et al*, 2006 ; Citri et Malenka, 2008 ; Gladding *et al*, 2009). Les mécanismes d'action de ces différentes enzymes dans l'induction et le maintien de cette forme de LTD restent à déterminer. Cependant, comme pour la forme NMDA-dépendante, on observe une déphosphorylation et une endocytose des récepteurs AMPA de la membrane post-synaptique (Snyder *et al*, 2001 ; Zhang *et al*, 2008).

Ainsi, quelle que soit la voie utilisée pour son initiation, la LTD résulte en la déphosphorylation et l'endocytose des récepteurs AMPA et donc en une réduction à long-terme de leur expression au niveau de la membrane post-synaptique au niveau du CA1 de l'hippocampe. Les processus de maintien à long-terme de la LTD ont été peu étudiés jusqu'à présent.

### II.2.3 Modulation de la plasticité cérébrale par les AGPI

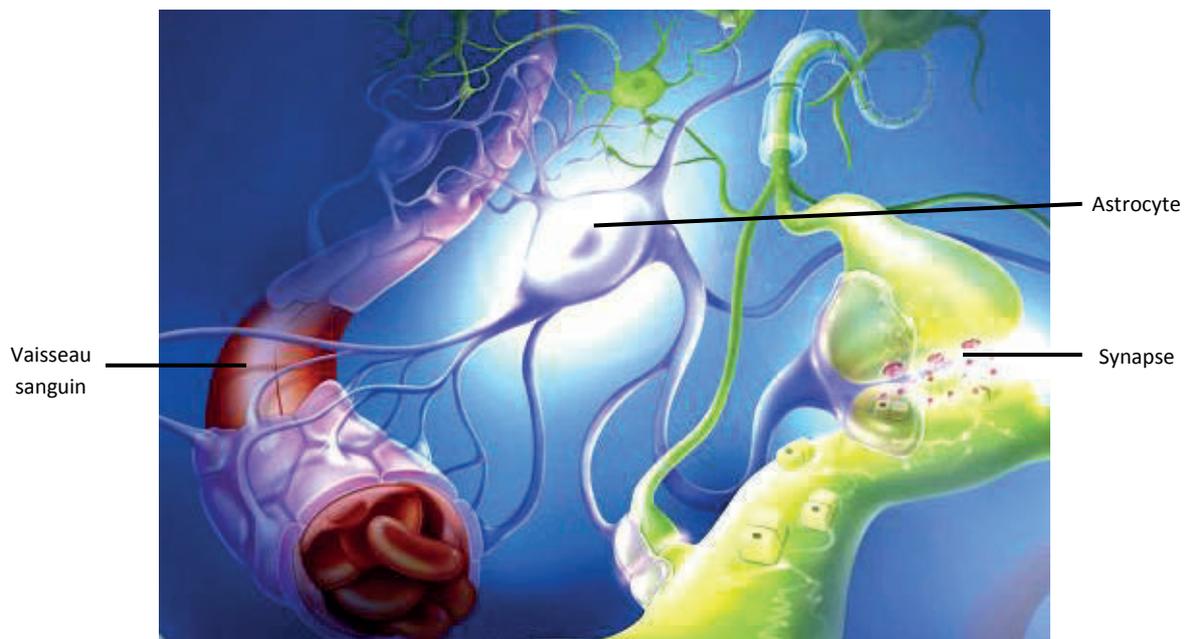
De nombreuses études sous-tendent l'idée que les AGPI n-3 jouent un rôle dans le développement et le maintien des capacités d'apprentissage et de mémorisation, notamment en favorisant les phénomènes de plasticité synaptique (Su, 2010).

Les études sur des modèles rongeurs se sont intéressées aux modulations du comportement par le statut en AGPI n-3 des animaux. (Fedorova *et al*, 2006). La déficience en AGPI n-3 est ainsi associée à des troubles du comportement chez les rongeurs et notamment à une diminution des capacités d'apprentissage spatial (Moriguchi *et al*, 2000 ; Xiao *et al*, 2006 ; Fedorova *et al*, 2007 ; Lim *et al*, 2005 ; Fedorova *et al*, 2009), alors que cet effet est partiellement annulé lorsque le statut en AGPI n-3 des animaux est rétabli suite à une supplémentation alimentaire (Moriguchi et Salem, 2003 ; Chung *et al*, 2008). Chez l'Humain, des études cliniques ont été réalisées à différents stades de la vie. Bien que les résultats soient encore controversés, le statut cérébral en AGPI n-3 des individus semble

jouer un rôle dans le développement des capacités cognitives (Ryan *et al*, 2010 ; Makrides *et al*, 2011 ; Kidd, 2007 ; Boucher *et al*, 2011), et dans leur maintien tout au long de la vie (Kidd, 2007 ; Karr *et al*, 2011).

Ces modulations des capacités d'apprentissage des individus par le statut en AGPI n-3 sont associées à des modifications des propriétés de plasticité synaptique (Su, 2010). Une déficience chronique en DHA se traduit par l'inhibition de l'induction de LTP au niveau de l'hippocampe chez des souris, associée à une réduction de l'expression des protéines synapsines et des sous-unités des récepteurs NMDA (Cao *et al*, 2009) ou à un retard de l'apparition de ces protéines au cours du développement (Moreira *et al*, 2010). A l'inverse, lors d'une supplémentation en AGPI n-3, l'augmentation des capacités cognitives chez le rongeur est associée à une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans les processus de plasticité synaptique, telles que la synapsine I, la syntaxine, CamKII, CREB ou encore des sous-unités des récepteurs NMDA ; cet effet est d'autant plus renforcé lorsque le régime alimentaire est associé à une activité physique (Wu *et al*, 2008 ; Chytrova *et al*, 2010). Les AGPI n-3 participeraient ainsi à l'induction et au maintien de la LTP (Kawashima *et al*, 2010 ; Fujita *et al*, 2001).

Au cours du vieillissement, on observe une diminution des capacités cognitives des individus, associée à une réduction de la proportion cérébrale du DHA (Delion *et al*, 1997 ; Giusto *et al*, 2002 ; Whelan, 2008). Le vieillissement physiologique ou pathologique (type maladie d'Alzheimer ou de Parkinson) constitue un champ d'étude très exploité pour apprécier l'impact des AGPI n-3 sur les fonctions cognitives et sur la plasticité synaptique. Il a ainsi été montré chez des rongeurs âgés, qu'une supplémentation en AGPI n-3 pouvait restaurer, partiellement ou totalement, les capacités cognitives, ainsi que l'expression de marqueurs de la plasticité synaptique, tels que la CamKII, les sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA, aussi bien en condition physiologique (Dyall *et al*, 2007 ; Van Gelder *et al*, 2007 ; Martin *et al*, 2002), qu'en condition pathologique (Calon *et al*, 2005 ; Hashimoto *et al*, 2009 ; Hashimoto *et al*, 2002 ; Boudrault *et al*, 2009 ; Kotani *et al*, 2006). Cependant, les résultats restent, à ce jour, assez disparates et certaines études n'ont pas permis de confirmer cet effet bénéfique des AGPI n-3 sur le déclin cognitif et le développement de maladies neurodégénératives (Fotuhi *et al*, 2009 ; Arendash *et al*, 2007 ; Van de Rest *et al*, 2008). Le rôle des AGPI n-3 est donc complexe et dépend fortement du



**Figure 15 : Représentation schématique du réseau astrocytaire**

Les astrocytes sont des cellules gliales étoilées. Leurs prolongements leur permettent d'être en contact avec les vaisseaux sanguins, avec les synapses, ainsi qu'avec d'autres astrocytes.

modèle utilisé, du stade d'avancement du déclin cognitif et/ou de la pathologie, ainsi que du type de supplémentation.

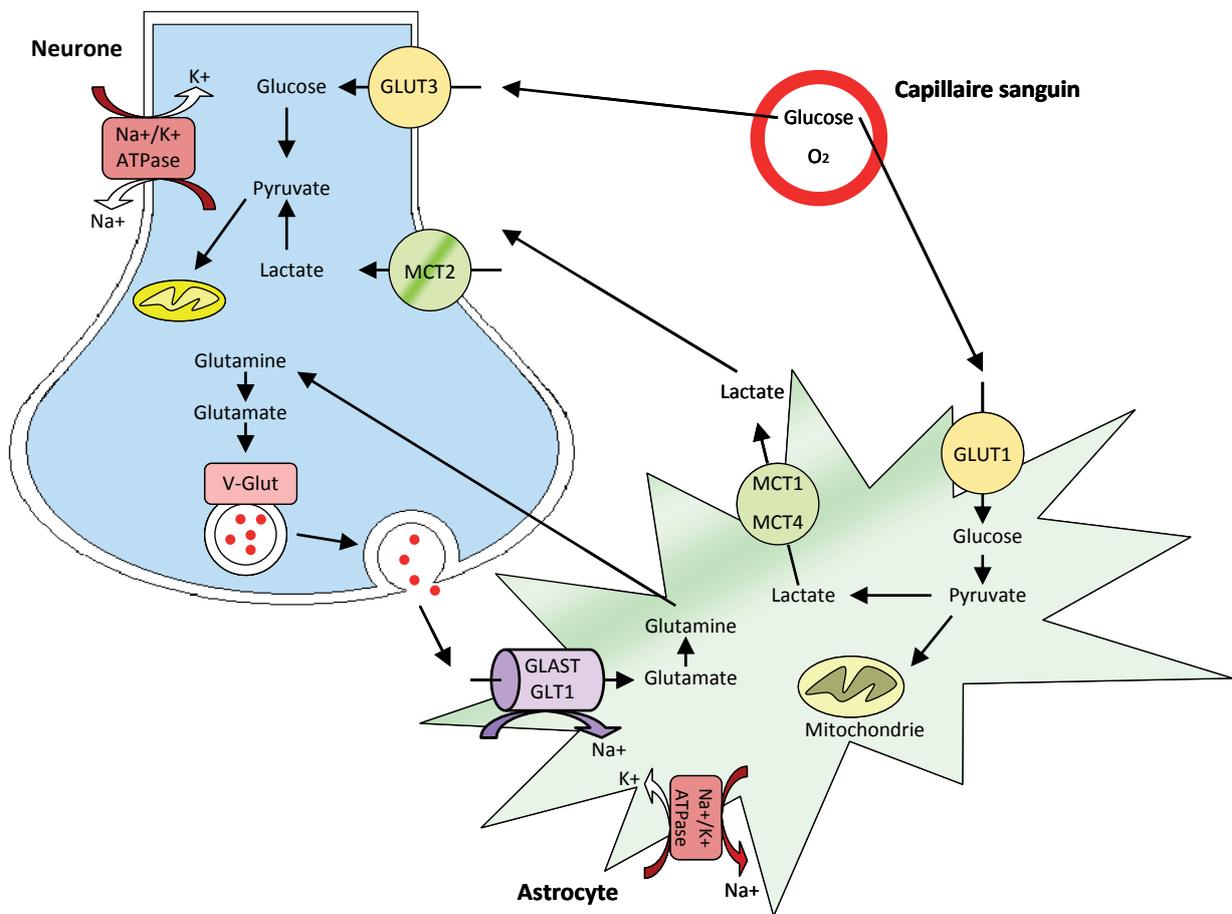
### **III. La régulation astrocytaire de la neurotransmission glutamatergique**

#### ***III.1 Le réseau astrocytaire : définition et fonctions***

##### ***III.1.1 Généralités sur les astrocytes***

Au niveau du SNC, les astrocytes constituent la population de cellules non neuronales la plus représentée. Leur nombre augmente avec le degré de phylogénie et la complexité cérébrale. Ainsi, chez l'Humain, les astrocytes sont même prédominants comparés à la population neuronale, et on dénombre 1,4 astrocytes par neurone au niveau du cortex (Nedergaard *et al*, 2003). De fortes variations en fonction de la structure cérébrale sont à noter. Chez le rat, près de la moitié des synapses sont associées à des prolongements astrocytaires, au niveau de l'hippocampe (Ventura et Harris, 1999), tandis que cette proportion peut atteindre 90% au niveau du cervelet (Grosche *et al*, 1999 ; Xu-Friedman *et al*, 2001).

Cellules gliales de forme étoilée (**Figure 15**), les astrocytes ont la particularité d'avoir peu de zone de recouvrement entre eux et il est donc possible de définir, pour chaque astrocyte, un « territoire anatomique », pouvant recouvrir près de  $10^5$  synapses chez le rongeur (Halassa *et al*, 2007 ; Bushong *et al*, 2002) et plus d'un million chez l'Humain (Oberheim *et al*, 2006). Le corps cellulaire et les prolongements majeurs des astrocytes sont enrichis en GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), protéine des filaments intermédiaires caractéristique des astrocytes (Eng *et al*, 1971 ; Bignami *et al*, 1972). Cependant, tous les astrocytes ne sont pas GFAP-positifs et à l'inverse, on peut retrouver la GFAP dans d'autres types cellulaires, en particulier les cellules souches neurales, les cellules de Schwann ou les cellules gliales entériques (Sofroniew et Vinters, 2010 ; Liu *et al*, 2006 ; Kimelberg, 2004 ; Middeldorp et Hol, 2011). Ainsi, la caractérisation des astrocytes en immunohistochimie utilise, en parallèle de la GFAP, d'autres marqueurs tels que les transporteurs astrocytaires du glutamate (GLAST et GLT-1), la protéine S100 $\beta$ , la vimentine ou encore la glutamine synthase qui convertit le glutamate capté par les astrocytes en glutamine (Wang et Bordey, 2008 ; Sofroniew et Vinters, 2010).



**Figure 16 : Schéma simplifié du couplage neuro-métabolique entre neurones et astrocytes (adapté de Pellerin *et al*, 2007)**

L'entrée de Na<sup>+</sup> dans l'astrocyte généré par le captage du glutamate extracellulaire entraîne l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase et donc la consommation d'ATP. Ceci provoque un appel de glucose depuis la circulation sanguine *via* le transporteur GLUT1. Ce glucose va être métabolisé en pyruvate *via* la glycolyse, afin d'une part fournir l'énergie nécessaire à l'astrocyte en entrant dans le cycle de Krebs et d'autre part de produire du lactate qui sera ensuite acheminer par des transporteurs spécifiques MCT 1,4 et 2 vers le neurone. Au niveau du neurone, le lactate sera transformé en pyruvate et pourra ainsi servir de substrat métabolique.

Les astrocytes sont extrêmement plastiques et sont capables d'émettre et de rétracter rapidement de fins prolongements (Hirrlinger *et al*, 2004 ; Reichenbach *et al*, 2010) dont les terminaisons vont se placer notamment au contact des synapses et des vaisseaux sanguins (**Figure 15**). Ne contenant ni microtubules, ni filaments intermédiaires, ces prolongements se caractérisent par la présence d'eitrine et des récepteurs métabotropiques du glutamate de type mGluR3 et mGluR5, ainsi que de protéines caractéristiques du fonctionnement astrocytaires telles que la glutamine synthetase et les transporteurs du glutamate GLAST et GLT-1 (Derouiche, 2004 ; Reisenbach *et al*, 2010 ; Laviaille *et al*, 2011). La libération de glutamate suite à l'activation synaptique stimulerait les récepteurs mGluRs des prolongements astrocytaires, afin de réguler leur élongation et rétraction grâce à des processus faisant intervenir les protéines actine et eitrine (Laviaille *et al*, 2011).

Les astrocytes sont organisés en un réseau astrocytaire. Ils sont reliés entre eux grâce à des jonctions communicantes, qui permettent l'échange d'informations entre les cellules en fonction des signaux intra- et extra-cellulaires (Giaume *et al*, 2010). Ces jonctions constituent des canaux entre cellules adjacentes formés par l'alignement de 2 héli-canaux comportant chacun 6 unités de connexines dont les principales sont les connexines 43 et 30. Ces canaux permettent l'échange, entre cellules, d'ions, mais également de petites molécules comme le glucose et ses métabolites (Rouach *et al*, 2008 ; Rouach *et al*, 2002). Cette organisation spécifique des astrocytes en réseau est indispensable à leur fonctionnalité et plus globalement à la régulation de la neurotransmission et de la plasticité synaptique (Pannasch *et al*, 2011).

### III.1.2 Principales fonctions astrocytaires

Les astrocytes sont indispensables au fonctionnement du système nerveux et participent à un grand nombre de régulations qui ont été bien étudiées et décrites (Sofroniew et Vinters, 2010 ; Wang et Bordey, 2008 ; Kimelberg et Nedergaard, 2010).

#### **A- SUPPORT METABOLIQUE**

De par leur position intermédiaire entre les neurones et le système vasculaire, l'un des premiers rôles définis des astrocytes fut celui de support métabolique aux neurones (**Figure 16**).

Le degré d'activité synaptique serait transmis *via* les astrocytes au système vasculaire afin de réguler le débit sanguin localement et permettre de fournir *via* les astrocytes les nutriments et l'oxygène nécessaires en fonction du besoin (Halassa *et al*, 2007 ; Zonta *et al*, 2003 ; Iadecola *et al*, 2007 ; Koehler *et al*, 2009). Les astrocytes sont notamment capables de libérer un certain nombre de substances vaso-actives, tel le monoxyde d'azote, de l'ATP ou des produits dérivés de l'action des cyclo- et épo- xygénases (Carmignoto et Gomez-Gonzelo, 2010 ; Koehler *et al*, 2009). Parmi ces derniers, on trouve notamment un certain nombre de dérivés de l'acide arachidonique, comme les acides epoxyeicosatrienoïques (EETs) (Amruthesh *et al*, 1993 ; Alkayed *et al*, 1997 ; Shi *et al*, 2008), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Amruthesh *et al*, 1993 ; Zonta *et al*, 2003) ou l'acide 20-hydroxyeicosatetraenoïque (20-HETE) (Amruthesh *et al*, 1993 ; Mulligan et MacVicar, 2004 ; Metea et Newman, 2006).

Le couplage neuro-métabolique, lien entre l'activité synaptique et l'utilisation de glucose, nécessite l'intervention des astrocytes, comme il l'a été décrit au niveau des synapses glutamatergiques (Magistretti, 2009). L'activation neuronale induit la libération, dans la fente synaptique, de glutamate, qui va être activement capté par les astrocytes, *via* des transporteurs spécifiques (GLAST et GLT-1). L'entrée de glutamate dans la cellule utilise un système de co-transport avec les ions Na<sup>+</sup>, engendrant une augmentation de la concentration intracellulaire de Na<sup>+</sup> et ainsi l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Cette activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase va stimuler la glycolyse aérobie au niveau de l'astrocyte, c'est-à-dire la conversion de glucose en lactate en présence d'oxygène (Pellerin et Magistretti, 1996). Le lactate produit est libéré de l'astrocyte et pourra être capté par le neurone pour servir de substrat métabolique *via* sa conversion en pyruvate et son entrée dans le cycle de Krebs (Pellerin *et al*, 1998 ; Pellerin *et al*, 2007).

## **B- MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE CÉRÉBRALE**

Les astrocytes participent au maintien de l'homéostasie cérébrale, notamment concernant les fluides, les ions et le pH (Simard et Nedergaard, 2004).

Les prolongements astrocytaires au niveau des vaisseaux sanguins sont riches en aquaporine 4 (AQP4), canal membranaire permettant le passage de l'eau entre les vaisseaux sanguins et le cerveau (Nielsen *et al*, 1997 ; Amiry-Moghaddam *et al*, 2003).

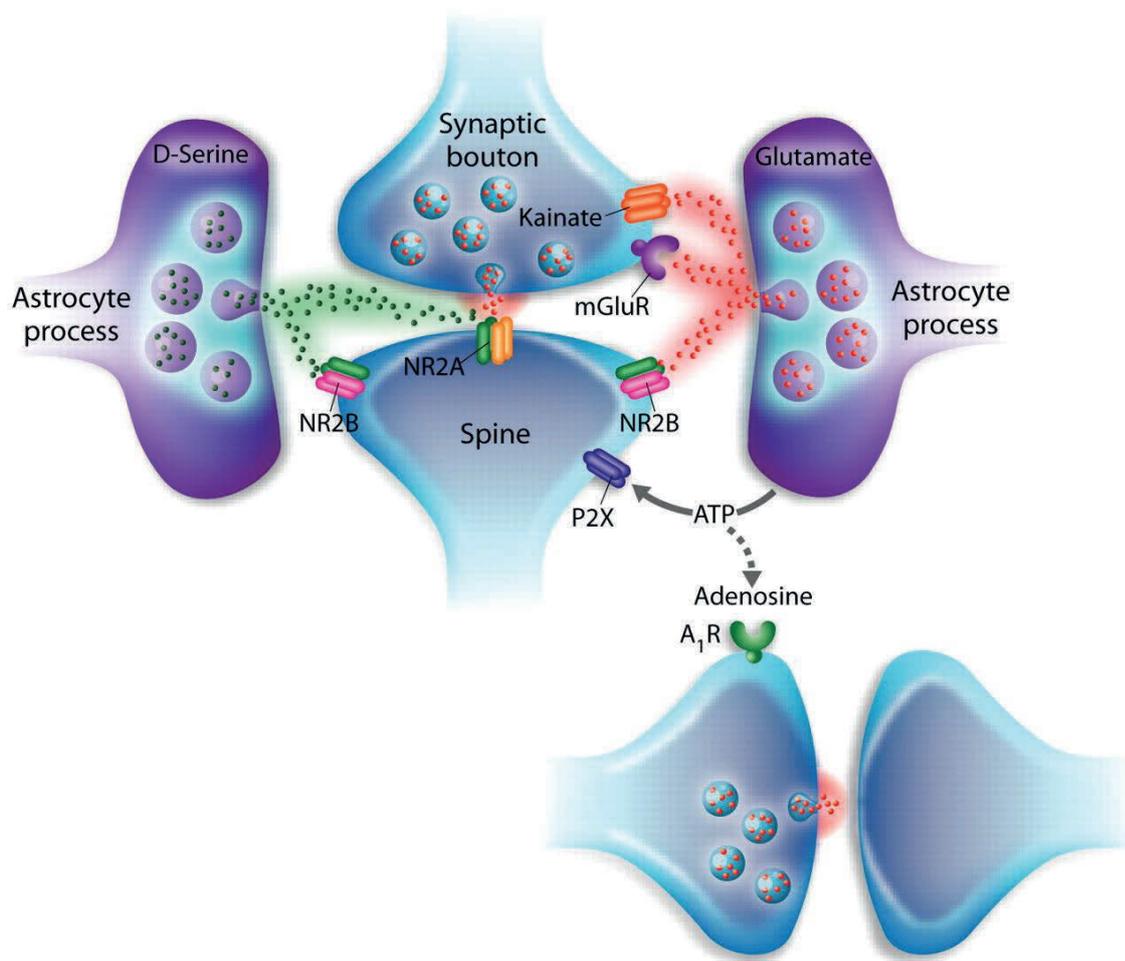
Lorsqu'ils sont activés, les neurones libèrent des ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire, qui en excès, peuvent être toxiques en induisant une hyperexcitabilité neuronale (Kreisman et Smith, 1993). De plus, le gradient ionique, tel que celui en ions  $K^+$ , joue un rôle dans la régulation du volume cellulaire (Lang, 2007). Il est donc important de maintenir les concentrations extracellulaires en ions  $K^+$ . Riches en transporteurs d'ions potassiques  $K^+$ , les astrocytes peuvent capter le potassium extracellulaire et jouent ainsi un rôle important dans l'homéostasie potassique (Walz, 2000).

Enfin, les astrocytes jouent un rôle clé dans la régulation du pH au niveau cérébral (Obara *et al*, 2008). En effet, les membranes astrocytaires disposent d'un certain nombre de transporteurs de protons, tels que des transporteurs du bicarbonate, des transporteurs de l'acide monocarboxylique ou encore les ATPases. Ces transporteurs, couplés à l'action de l'enzyme anhydrase carbonique qui convertit de manière réversible une molécule de  $CO_2$  en un proton et un bicarbonate, permettent aux astrocytes de participer activement à la régulation du pH cérébral.

### **C- CAPTURE DU GLUTAMATE**

La capture de neurotransmetteurs, tels que le GABA ou le glutamate, par les astrocytes est une de leurs fonctions la plus détaillée et la mieux établie dans la littérature. Nous ne discuterons ici que de leur capacité à capturer le glutamate, qui constitue, comme nous l'avons décrit précédemment, une part du cycle glutamate-glutamine.

Ainsi, les astrocytes participent à environ 90% de l'élimination du glutamate extracellulaire et à son recyclage vers le neurone. Cette capture s'effectue principalement *via* 2 transporteurs spécifiques, GLAST (ou EAAT1) et GLT-1 (ou EAAT2) (Danbolt, 2001), co-exprimés à la surface astrocytaire, mais dont la concentration au sein du SNC présente des spécificités régionales. Ainsi, GLAST constitue le principal transporteur de glutamate au niveau du cervelet, de la rétine et de l'oreille interne, tandis que GLT-1 est abondant au niveau du pro-encéphale et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe (Danbolt, 2001). Leur mode de fonctionnement est globalement similaire. La capture du glutamate est un processus électrogénique (Brew et Attwell, 1987). Le transport d'une molécule de glutamate s'accompagne de l'entrée dans la cellule de 3  $Na^+$  et de 1  $H^+$ , ainsi que de la sortie



**Figure 17 : La gliotransmission (Haydon et Carmignoto, 2006)**

Les astrocytes sont capables de synthétiser et de libérer un certain nombre de molécules, appelés gliotransmetteurs, qui vont participer à la régulation de la neurotransmission. Ainsi, ils libèrent du glutamate qui va agir aux niveaux pré- et post-synaptique afin de promouvoir la synchronisation neuronale, de l'ATP qui peut agir à la fois sur la synapse environnante ou bien à distance après hydrolyse en adénosine, et la D-sérine qui, en tant que principal co-agoniste des récepteurs NMDA, participe à la régulation de la plasticité synaptique.

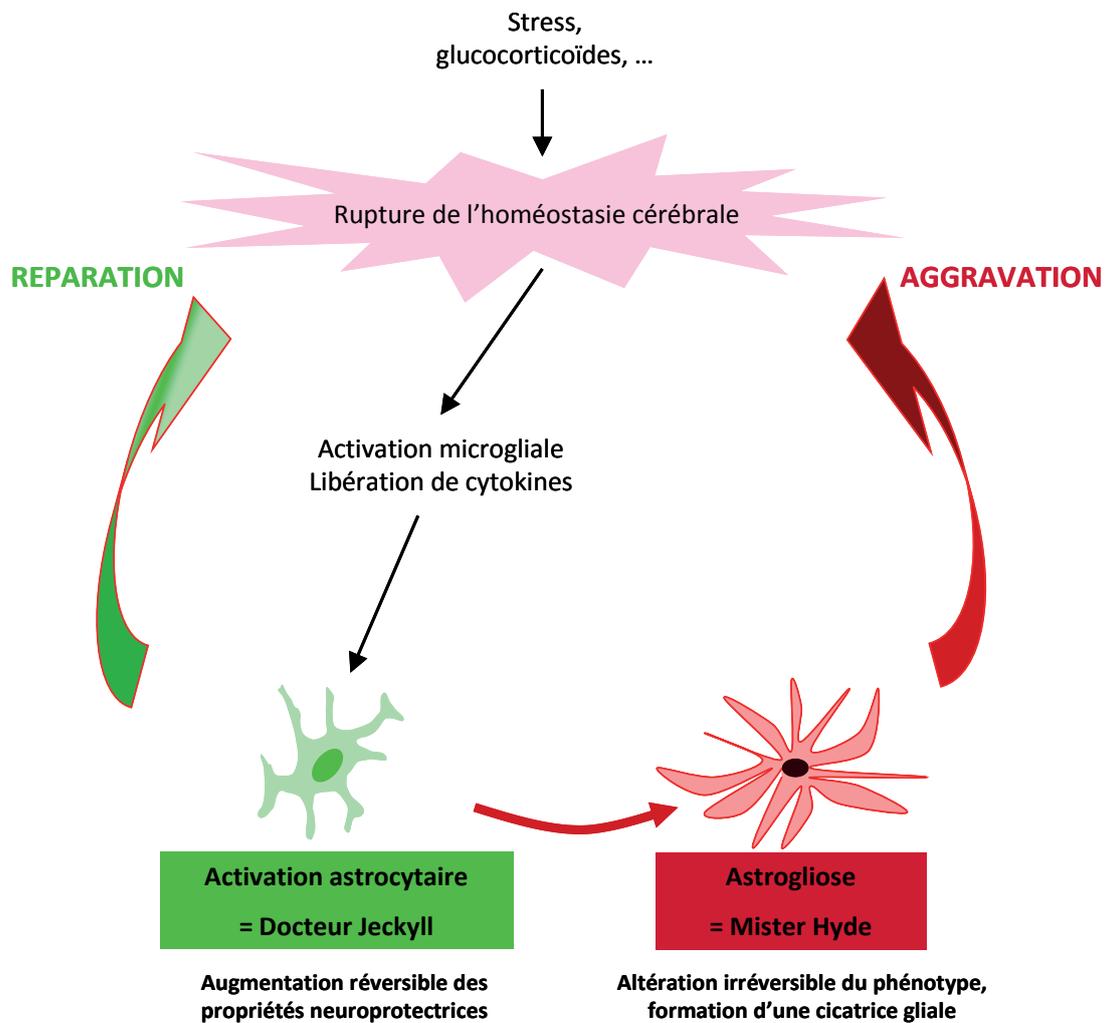
d'un  $K^+$  (Zerangue et Kavanaugh, 1996 ; Levy *et al*, 1998) et fait intervenir un couplage direct des transporteurs avec les pompes  $Na^+/K^+$  ATPases membranaires (Rose *et al*, 2009).

Cette fonction astrocytaire permet d'optimiser le ratio signal/bruit pour la neurotransmission glutamatergique et est d'autant plus importante, que, en excès, le glutamate constitue une potentielle neurotoxine. Ce phénomène, pour la première fois décrit dans les années 50 au niveau de la rétine (Lucas et Newhouse, 1957), a été confirmé et qualifié d'« excitotoxicité » par l'équipe de Olney *et al* (1969). Ainsi, une concentration excessive de glutamate dans la fente synaptique va aboutir à la sur-stimulation des récepteurs post-synaptiques du glutamate et en particulier des récepteurs NMDA. L'influx excessif d'ions  $Ca^{2+}$  et  $Na^+$  qui en résulte, associé à des mouvements passifs d'eau et d'ions  $Cl^-$  va engendrer une augmentation du volume cellulaire et un certain nombre de dysfonctionnement métabolique, aboutissant à la mort neuronale (Lau et Tymianski, 2010 ; Wang et Qin, 2010 ; Szydłowska et Tymianski, 2010 ; Sattler et Tymianski, 2000 ; Sattler et Tymianski, 2001). Comme il n'existe pas d'enzymes de dégradation du glutamate au niveau des synapses du SNC, la capture du glutamate par les cellules environnantes constitue donc un processus indispensable pour prévenir ces phénomènes d'excitotoxicité. Ainsi, l'inhibition des transporteurs du glutamate entraîne une hyperactivation post-synaptique et constitue un modèle de neurotoxicité (Rothstein *et al*, 1993 ; Tong et Jahr, 1994 ; Rothstein *et al*, 1996 ; Tanaka *et al*, 1997).

#### **D- LIBERATION DE GLIOTRANSMETTEURS ET ROLE DANS LA PLASTICITE SYNAPTIQUE**

Suite à l'arrivée de signaux calciques, les astrocytes sont capables de synthétiser, stocker et libérer un certain nombre de gliotransmetteurs (glutamate, ATP, GABA, adénosine ou encore D-sérine) qui participent à la régulation de la neurotransmission (Halassa *et al*, 2007 ; Parpura et Zorec, 2010 ; Perea et Araque, 2010) (**Figure 17**). Par exemple, la libération de glutamate par les astrocytes participe à la synchronisation des neurones. En effet, des études ont montré que le glutamate astrocytaire permet de synchroniser l'activation d'ensembles de neurones pyramidaux dans un espace d'environ 100  $\mu m$  (Angulo *et al*, 2004 ; Carmignoto et Fellin, 2006 ; Fellin *et al*, 2004).

La L-sérine est convertie en D-sérine grâce à la sérine racémase, enzyme présente dans les astrocytes (Wolosker *et al*, 1999). En tant que principal co-agoniste endogène des



**Figure 18 : Le double jeu des astrocytes**

Lors de l'altération de l'homéostasie cérébrale, suite, par exemple à un stress, l'activation microgliale va permettre l'activation astrocytaire. Les astrocytes vont alors augmenter leurs capacités neuroprotectrices, favorisant les processus de réparation ; c'est le côté Docteur Jekyll. Cependant, si l'altération est trop intense ou trop prolongée, l'activation astrocytaire évolue vers l'astrogliose, qui constitue une altération irréversible du phénotype astrocytaire. Les astrocytes perdent leur fonction protectrice, favorisant l'aggravation de l'altération homéostasique ; c'est le côté Mister Hyde.

récepteurs NMDA, la D-sérine libérée par les astrocytes participe à l'activation de ces derniers (Oliet et Mothet, 2009). Comme nous l'avons décrit précédemment, les récepteurs NMDA sont fortement impliqués dans la plasticité synaptique, notamment la LTP et la LTD. Ainsi, plusieurs études se sont intéressées au rôle joué par la D-sérine sur l'induction de la LTP. L'utilisation d'enzymes, telles que la D-Amino Acid Oxydase (DAO), qui dégradent la D-Sérine, a permis de démontrer son implication dans l'induction de la LTP sur des cultures cellulaires, mais également sur des tranches d'hippocampe et d'hypothalamus (Yang *et al*, 2003 ; Panatier *et al*, 2006 ; Henneberger *et al*, 2010)

### III.1.3 Le double jeu des astrocytes : Docteur Jekyll et Mister Hyde (Figure 18)

Lors d'une altération de l'homéostasie cérébrale, l'activation de la microglie va aboutir à la libération d'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires, qui vont à leur tour activer les astrocytes. Les astrocytes activés vont alors stimuler leurs fonctions, s'adaptant ainsi à la nécessité d'une régulation accrue de l'activité synaptique et permettant la restauration de l'homéostasie du milieu extracellulaire. C'est le côté Docteur Jekyll des astrocytes (Morale *et al*, 2006). Les astrocytes ont alors un rôle neuroprotecteur, en exerçant les fonctions précédemment décrites.

Cependant, lorsque l'altération de l'homéostasie est trop intense ou trop prolongée, l'activation astrocytaire évolue vers une modification irréversible du phénotype, conduisant au phénomène d'astrogliose (Sofroniew, 2009). C'est le côté Mister Hyde des astrocytes (Morale *et al*, 2006). Les astrocytes réactifs présentent une hypertrophie marquée de leur corps cellulaire et prolongements principaux, caractérisée par l'augmentation de l'expression de la GFAP et de la vimentine, protéines du cytosquelette astrocytaire pouvant ainsi servir de marqueurs de l'astrogliose (Yang *et al*, 1994 ; Sofroniew, 2009 ; Sofroniew et Vinters, 2010). De plus, lors de l'astrogliose, les astrocytes présentent une perte de leurs fonctions régulatrices et une réduction de leurs facultés neuroprotectrices, ce qui aboutit à une accentuation des altérations de l'homéostasie et des dommages neuronaux. Les astrocytes réactifs produisent notamment des cytokines pro-inflammatoires, des espèces réactives oxygénées ou nitrogénées ou encore du glutamate pouvant contribuer à l'excitotoxicité (Heneka *et al*, 2010 ; Sofroniew, 2009). De plus, la perturbation du transport d'eau par les aquaporines peut engendrer un œdème cérébral (Zador *et al*, 2009).

Dans les cas les plus sévères, l'astrogliose permet la formation d'une cicatrice gliale (Sofroniew, 2009), qui empêche la régénération des axones endommagés (Silver et Milller, 2004). Des modèles de souris transgéniques ont permis de montrer le rôle neuroprotecteur de ces cicatrices gliales qui permettent d'isoler les tissus endommagés des tissus sains et ainsi de limiter la propagation de l'inflammation (Faulkner *et al*, 2004 ; Voskuhl *et al*, 2009 ; Sofroniew, 2009).

La réactivité astrocytaire est un phénomène complexe, pouvant avoir des effets bénéfiques et des effets délétères en fonction de la nature et de la durée de l'atteinte, mais également de sa localisation et de sa nature. Un dysfonctionnement de la balance entre les effets protecteurs et les effets délétères des astrocytes est impliqué dans un certain nombre de pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Heneka *et al*, 2010 ; Halassa *et al*, 2007 ; Rossi et Volterra, 2009).

### **III.2 Rôle des AGPI dans le fonctionnement astrocytaire**

Peu d'études se sont intéressées à l'impact des AGPI sur le fonctionnement astrocytaire jusqu'à présent. Cependant, ce sujet est d'un grand intérêt, lorsque l'on sait que l'activation astrocytaire induit la libération de DHA et d'AA par la PLA<sub>2</sub> des membranes astrocytaires (Strokin *et al*, 2003 ; Strokin *et al*, 2004 ; Stella *et al*, 1994).

Un effet signal inhibiteur du DHA sur la capture de glutamate par les astrocytes a été montré sur culture primaire d'astrocytes, ainsi que sur suspensions cellulaires de cortex (Grintal *et al*, 2009). Il a également été montré un effet inhibiteur de l'AA sur la capture de glutamate sur différents modèles (Volterra *et al*, 1992 ; Volterra *et al*, 1994 ; Lundy et McBean, 1996). De plus, des études sur des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK) transfectées ont montré que le DHA inhibe la capture de glutamate par les transporteurs GLAST et à l'inverse stimule la capture par les transporteurs GLT-1 (Berry *et al*, 2005). Ainsi, les AGPI pourraient participer à la régulation de la capture du glutamate par les astrocytes selon plusieurs mécanismes, faisant intervenir différentes voies de signalisation comme celle de la CamKII, la PKA, la PKC et les flux calciques (Berry *et al*, 2005). Les AGPI semblent par ailleurs réguler les oscillations calciques au niveau des astrocytes (Sergeeva *et al*, 2005).

L'équilibre membranaire en DHA/AA des astrocytes participerait au couplage entre les cellules, notamment *via* les Connexines 43 (Champeil-Potokar *et al*, 2006), ainsi qu'à la

maturation et à la différenciation des astrocytes en culture (Joardar *et al*, 2006 ; Joardar et Das, 2007).

Bien que les études sur l'impact des AGPI n-3 sur le fonctionnement astrocytaire restent, à ce jour, peu nombreuses et assez disparates, elles semblent souligner néanmoins un rôle complexe de ces AGPI dans la régulation de la fonction astrocytaire.

**En résumé**, la synapse tripartite glutamatergique, composée des neurones pré- et post-synaptiques, et des astrocytes, joue un rôle important pour le bon fonctionnement du SNC. Plus particulièrement au niveau de l'hippocampe, elle participe activement aux processus de mémorisation et d'apprentissage, notamment via les phénomènes de LTP et LTD. Les études menées jusqu'alors ont permis de mettre en évidence un rôle des AGPI n-3 dans la régulation de cette synapse, aussi bien au niveau neuronal qu'astrocytaire. Le fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique est fortement sensible aux altérations de l'homéostasie cérébrale, telles celles induites par le stress. Dans la dernière partie de cette introduction, nous détaillerons donc les processus impliqués dans la réponse au stress ainsi que leurs répercussions sur le fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique.



## Partie 3 : Le stress chronique

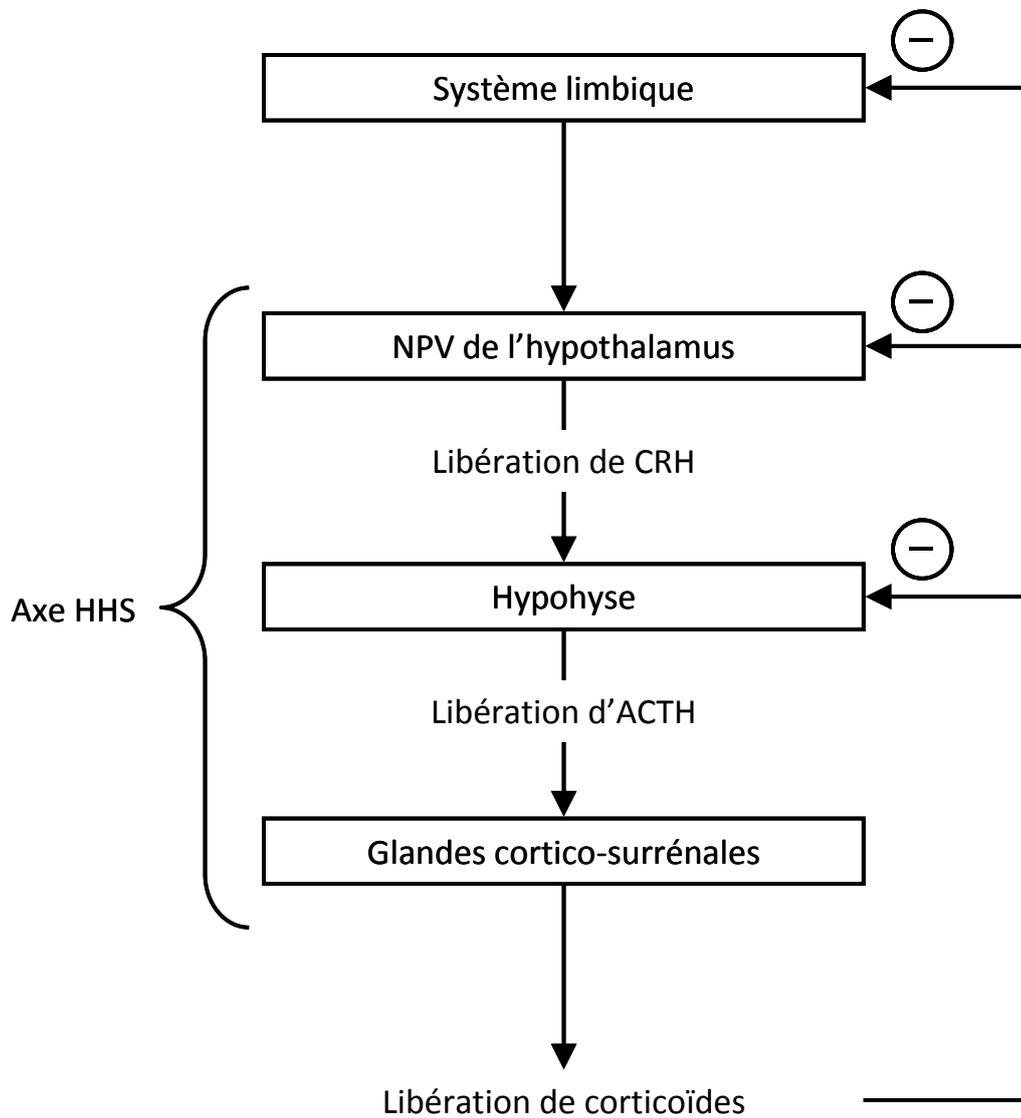
### I. La réponse au stress : Définitions et description des différents acteurs

#### *1.1 Définition et description de la réponse au stress*

Le concept de « stress » a, depuis sa première description par Selye (1936 et 1956), toujours été débattu car il constitue une notion relativement difficile à définir. Il est communément admis qu'un facteur de stress constitue une perturbation s'appliquant à l'organisme visant à modifier son homéostasie et ainsi, que la réponse au stress est l'ensemble des réactions comportementales et physiologiques visant à maintenir ou rétablir cette homéostasie (Chrousos, 2009).

La réponse au stress fait intervenir le SNC, en facilitant les réactions d'alerte, de cognition et de vigilance, en inhibant les fonctions végétatives et en activant les systèmes de régulation de l'axe corticotrope, axe neuroendocrinien formé de l'association de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et du système limbique fortement impliqué dans la réponse au stress. Elle va également engendrer un certain nombre de modifications au niveau périphérique, notamment en favorisant l'oxygénation et la nutrition des organes clés de la coordination de la réponse au stress (cerveau, cœur et muscles squelettiques) (Chrousos, 2009).

La réponse au stress s'adapte en fonction du type, de l'intensité et de la durée du stimulus, ainsi que de sa prédictibilité et sa contrôlabilité (Chrousos, 2009 ; Koolhaas *et al*, 2011). Elle est bénéfique, en permettant le retour à l'homéostasie et dans certain cas améliorer les capacités d'adaptation de celle-ci afin de mieux réagir lors d'une prochaine atteinte. Mais lorsqu'elle devient trop intense ou prolongée, en réponse à un stress de type chronique, elle peut devenir nuisible pour l'organisme (Chrousos, 2009; Koolhaas *et al*, 2011 ; McEwen, 1998). Le système de réponse au stress a une activité circadienne basale et une activité stimulée lors de l'arrivée d'un agent stressant. Il joue donc un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme et son dysfonctionnement peut aboutir à des perturbations importantes de la croissance, du développement, du comportement ou encore du métabolisme (Chrousos, 2009 ; Koolhaas *et al*, 2011).



**Figure 19 : Axe corticotrope**

HHS : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien ; PVN : Noyau ParaVentriculaire ; CRH : Corticotropin-Releasing Hormone ; ACTH : Adreno-CorticoTrophin Hormone

## ***1.2 Les différents circuits impliqués***

Suite à un stimulus stressant, l'organisme développe une réponse « adaptative », décrite initialement comme le « syndrome général d'adaptation » (Selye, 1936). Les deux principaux acteurs de cette réponse au stress sont d'une part le système nerveux sympathique et d'autre part l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) (Tsigos et Chrousos, 2002). De plus, de part son rôle central dans le maintien de l'homéostasie et dans la réponse au stress, ce système est finement régulé, notamment grâce à l'intervention du système limbique (Ulrich-Lai et Herman, 2009 ; Jankord et Herman, 2008) ; l'association entre l'axe HHS et le système limbique forme l'axe corticotrope (**Figure 19**). Dans cette partie, nous décrirons de manière succincte les processus impliqués.

### ***1.2.1 La réponse d'urgence : le système nerveux sympathique***

Le système nerveux sympathique innerve des organes tels que les muscles lisses des vaisseaux, le cœur, les muscles squelettiques, les reins, l'intestin, ... L'innervation sympathique des organes périphériques fait intervenir deux neurones : un neurone pré-ganglionnaire dont le corps cellulaire est situé dans la moelle épinière et un neurone post-ganglionnaire dont le corps cellulaire est situé dans les ganglions et qui va innover à son tour les organes périphériques.

Sous l'effet du stress, le système nerveux sympathique permet une réponse rapide de l'organisme, qui prépare l'individu à la fuite ou la lutte (Ulrich-Lai et Herman, 2009). Il stimule notamment la libération par les glandes médullosurrénales de catécholamines : adrénaline et noradrénaline. Ces deux molécules ont une action périphérique, notamment en régulant le système cardiovasculaire, et jouent également un rôle au niveau cérébral. Ainsi, en stimulant les récepteurs adrénérgiques de l'amygdale, elles participent à l'encodage et à la mémorisation d'informations relatives aux émotions (McGaugh et Roozendaal, 2002 ; Cahill *et al*, 1994 ; Lupien *et al*, 2007)

### ***1.2.2 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS)***

L'axe HHS regroupe les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), l'hypophyse et les glandes surréniennes. Suite à l'arrivée d'un stimulus, les PVN de

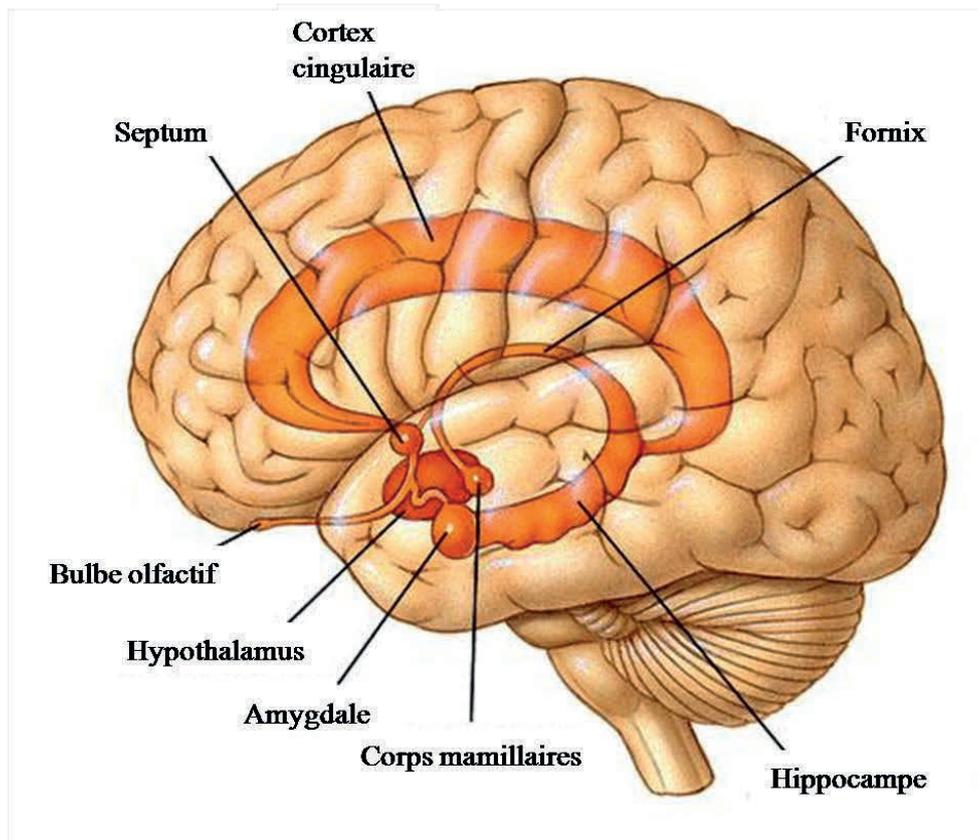


Figure 20 : Structures du système limbique

l'hypothalamus secrète un peptide de 41 acides aminés, la CRH (Corticotropin Releasing Hormone) (Vale *et al*, 1981), qui va agir, en synergie avec la vasopressine, pour stimuler la libération d'ACTH (Adreno-Cortico-Trophin Hormone) par l'hypophyse (Tsigos et Chrousos, 2002). L'ACTH ainsi libérée dans la circulation va réguler la sécrétion, par les glandes surrénales, des glucocorticoïdes, principaux effecteurs et marqueurs de la réponse au stress. Les glucocorticoïdes régulent notamment l'activité de l'axe HHS par rétrocontrôle négatif, afin de réguler leur propres concentrations (Keller-Wood et Dallman, 1984). Ce rétrocontrôle par les glucocorticoïdes peut être rapide, en agissant, par exemple, directement sur l'hypothalamus *via* des récepteurs encore méconnus (Di *et al*, 2003) ou bien plus lent, en faisant intervenir notamment leur interaction avec leurs récepteurs spécifiques GR et MR au niveau du système limbique (Herman *et al*, 2005 ; Jankord et Herman, 2008).

En condition basale, l'axe HHS est régulé de manière pulsatile en fonction du cycle circadien, avec notamment un pic de l'activité en début de la phase active (Chung *et al*, 2011 ; Lupien *et al*, 2007 ; Papadimitriou et Priftis, 2009). L'arrivée d'un agent stressant engendre une activation intense de cet axe, aboutissant à une augmentation de la libération des hormones du stress, notamment des glucocorticoïdes.

### 1.2.3 La régulation de la réponse au stress par le système limbique

Le système limbique, ensemble de structures cérébrales impliquées notamment dans la formation de la mémoire, les émotions et le comportement, participe activement à la régulation de la réponse au stress (Ulrich-Lai et Herman, 2009 ; Jankord et Herman, 2008) (**Figure 20**). L'amygdale, l'hippocampe, ainsi que le cortex préfrontal ont notamment été décrits comme modulant l'activation du système nerveux sympathique et/ou de l'axe HHS au cours de la réponse au stress. Ainsi, d'une manière générale, mais non exclusive, l'hippocampe et le cortex préfrontal participent au rétrocontrôle négatif de l'axe HHS via les glucocorticoïdes, tandis que l'amygdale a une action stimulatrice sur la sécrétion de glucocorticoïdes (Herman *et al*, 2005). Dans la suite de l'exposé, nous ne traiterons que du rôle de l'hippocampe.

L'hippocampe exerce une action inhibitrice sur l'axe HHS (Ulrich-Lai et Herman, 2009 ; Jankord et Herman, 2008 ; Jacobson et Sapolsky, 1991). Ainsi, des lésions de l'hippocampe engendrent une élévation des concentrations de glucocorticoïdes dans la circulation (Knigge,

1961 ; Fendler *et al*, 1961). A l'inverse, une stimulation de l'hippocampe engendre une inhibition de l'activité de l'axe HHS, notamment en réduisant la sécrétion d'ACTH et de glucocorticoïdes (Feldman et Weidenfeld, 2001 ; Casady et Taylor, 1976). Grâce à la présence de nombreux récepteurs aux corticoïdes, l'hippocampe peut ainsi moduler l'activité de l'axe HHS au cours du cycle circadien (Buchanan *et al*, 2004 ; Fischette *et al*, 1980) et en condition de stress (Buchanan *et al*, 2009 ; Khalili-Mahani *et al*, 2010 ; Herman *et al*, 1998 ; Herman *et al*, 1995) et participe donc au rétrocontrôle négatif de l'axe HHS (Jacobson et Sapolsky, 1991 ; Herman *et al*, 2005 ; Jankord et Herman, 2008).

La régulation de l'axe HHS par l'hippocampe fait intervenir une structure particulière, le subiculum (Herman et Mueller, 2006). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'intégration du stress sont complexes et dépendent fortement du contexte environnemental, du stimulus ainsi que des prédispositions individuelles de chacun.

### **1.3 Les glucocorticoïdes (GCs)**

Les glucocorticoïdes (dont le représentant principal est le cortisol chez l'humain et la corticostérone chez les rongeurs) constituent les principales hormones de la réponse au stress et jouent un rôle important dans le contrôle et la régulation de cette réponse. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la synthèse au niveau des glandes surrénales et la libération dans la circulation sanguine sont stimulées par l'arrivée d'ACTH. Ils font partie des hormones dites stéroïdiennes et sont formés d'un noyau prégnane sur lequel vient se greffer un certain nombre de fonctions chimiques (cétones, hydroxy-, fluor, ...) spécifiques à chaque molécule.

Au niveau des organes et plus particulièrement du cerveau, ils exercent leur action via 2 types de récepteurs : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). En effet, liposolubles, ils peuvent aisément traverser la barrière hémato-encéphalique et atteindre le cerveau (Lupien *et al*, 2007).

Dans cette partie de l'exposé, nous décrivons dans un premier temps la fonction et la régulation de leurs récepteurs GR et MR au niveau cérébral. Puis nous nous intéresserons à leurs mécanismes d'action, plus particulièrement au niveau du SNC.

### 1.2.1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau cérébral

Les GCs exercent leur action *via* deux types de récepteurs, les GR et les MR. Ces deux types de récepteurs sont, au niveau du SNC, exprimés aussi bien par les cellules neuronales, que par les cellules gliales (Bohn *et al*, 1991 ; Bohn *et al*, 1994 ; Cintra *et al*, 1994). Ils peuvent être co-localisés au sein d'une même cellule, notamment au niveau des neurones pyramidaux de la zone CA1 de l'hippocampe (Han *et al*, 2005). Ils diffèrent par leur affinité au ligand, leur rôle dans la régulation de l'axe HHS, ainsi que leur distribution au niveau du SNC.

Les MR sont impliqués dans l'action « basale » des GCs en condition physiologique et présentent une affinité pour leur ligand 6 à 10 fois supérieure que les GR (Lupien *et al*, 2007 ; Reul et de Kloet, 1985). On les retrouve au niveau de l'hypothalamus et de l'amygdale, mais ils sont surtout présents au niveau de l'hippocampe. Les GRs, quant à eux, participent au rétrocontrôle négatif de l'axe HHS par les GCs et à la consolidation de la mémoire d'évènements stressants lors d'une activation par le stress et lors du pic de sécrétion durant le cycle circadien ; les récepteurs MR sont alors saturés et malgré leur plus faible affinité pour le ligand, les GRs sont activés (Lupien *et al*, 2007 ; Reul et de Kloet, 1985). On les retrouve notamment au niveau de l'hippocampe, du cortex préfrontal et de l'amygdale.

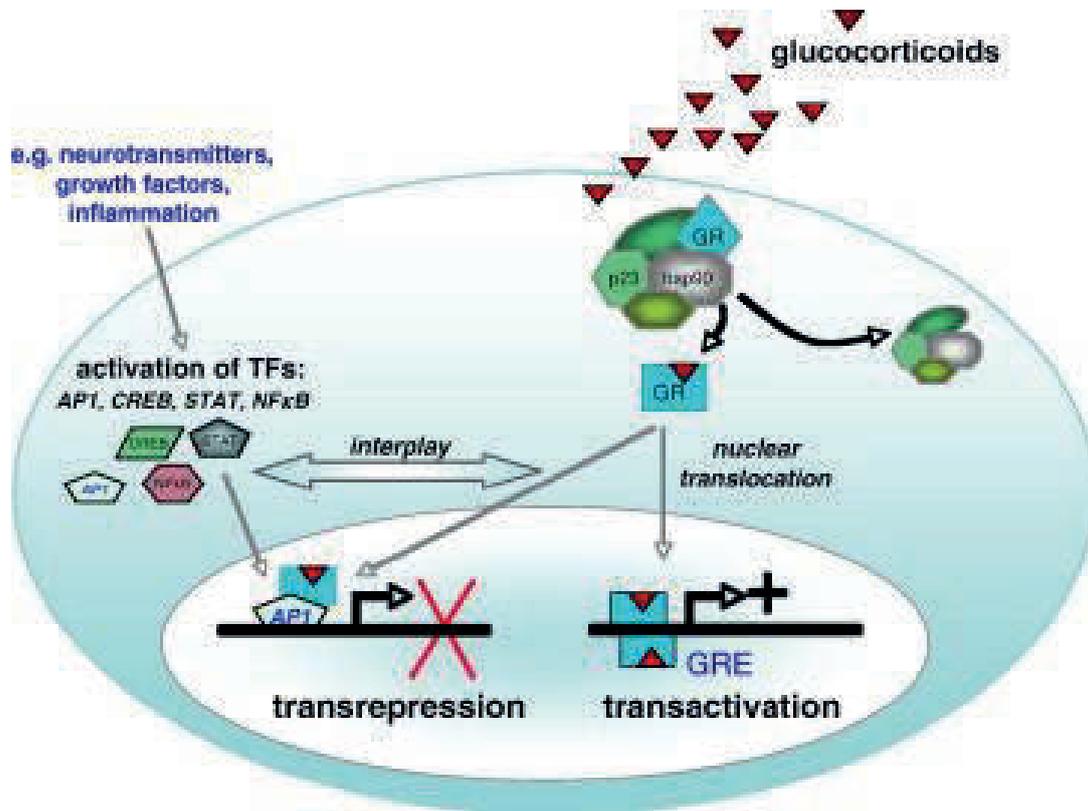
### 1.2.2 Deux modes d'action complémentaires

#### **A- REPONSE LENTE FAISANT INTERVENIR DES PHENOMENES GENOMIQUES**

Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont d'importants régulateurs de la transcription génique. Cette action est lente, puisqu'elle intervient 15 à 30 minutes après l'activation du récepteur et peut persister d'une heure à plusieurs jours en fonction de la durée et de l'intensité du signal (Datson *et al*, 2008). Suite à leur activation par la fixation du ligand, les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR) migrent vers le noyau, où ils vont participer à la régulation de la transcription génique, soit directement en se fixant à des sites spécifiques de l'ADN, soit indirectement en interagissant avec d'autres facteurs de transcription.

Le premier mode d'action fait intervenir la formation d'homo-dimères, qui vont se lier à des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs) sur l'ADN dans la région des

promoteurs des gènes-cibles. En interagissant avec la machinerie générale de transcription, ce processus va permettre le plus souvent d'activer la transcription de gènes cibles.



**Figure 21 : Action génomique lente des glucocorticoïdes (Datson *et al*, 2008)**

Les glucocorticoïdes exercent leur action génomique *via* 2 mécanismes distincts : l'un faisant intervenir les Eléments de Réponse aux glucocorticoïdes (GREs) et l'autre qui implique l'interaction des récepteurs aux glucocorticoïdes avec d'autres facteurs de transcription.

Cependant, dans certains cas, ce mécanisme peut aboutir à la répression de certains gènes. C'est le cas, par exemple, dans le rétrocontrôle négatif par les glucocorticoïdes de l'axe HHS (Dostert et Heinzl, 2004 ; Datson *et al*, 2008), notamment pour l'inhibition de la sécrétion de CRH par l'hypothalamus (Kageyama et Suda, 2009 ; Itoi *et al*, 2004 ; Aguilera *et al*, 2007) ou d'ACTH par l'hypophyse (Drouin *et al*, 1993 ; Nakai *et al*, 1991). En situation de stress, on assiste parfois dans certaines régions cérébrales telles que l'hippocampe, à une hétérodimérisation des récepteurs, permettant de diversifier et de réguler plus finement l'action des glucocorticoïdes sur la transcription génique (Nishi et Kawata, 2006) (**Figure 21**).

Le deuxième mode d'action consiste en une interaction du récepteur monomérique avec d'autres facteurs de transcription, tels que CREB (cAMP Response Element Binding) (Grossmann *et al*, 2010 ; Föcking *et al*, 2003), NFκB (nuclear factor-kappa B) (Ray et Prefontaine, 1994 ; Kye *et al*, 2007 ; Tahera *et al*, 2006) ou l'AP1 (Activated Protein 1) (Xu *et al*, 2001 ; Autellitano, 1994) (**Figure 21**).

Les glucocorticoïdes *via* leurs récepteurs MR et GR sont ainsi capables de moduler la transcription de gènes impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires, tels que le métabolisme énergétique, la structure neuronale, le métabolisme des neurotransmetteurs, le cycle vésiculaire ou l'adhésion cellulaire (Datson *et al*, 2008) qui sont autant d'éléments intervenants dans la réponse au stress et dans le rétablissement de l'homéostasie.

## **B- REPONSE RAPIDE NON GENOMIQUE**

Si l'implication des glucocorticoïdes dans les effets prolongés du stress est bien établie, ils sembleraient également intervenir dans un certain nombre de réponses rapides de l'organisme face au stress (Groeneweg *et al*, 2011 ; de Kloet *et al*, 2008 ; Evanson *et al*, 2010 ; Haller *et al*, 2008). Nous discuterons en particulier des implications au niveau de l'hippocampe de cette régulation rapide par les glucocorticoïdes.

Dans les minutes suivant l'élévation de glucocorticoïdes suite à un stress, l'hippocampe présente une augmentation de la fréquence des mPPSE (potentiel post-synaptique excitateur miniature, reflétant l'activité basale spontanée des synapses), sans modulation de leur amplitude (Karst *et al*, 2005 ; Pasricha *et al*, 2011 ; Qiu *et al*, 2010 ; Olijslagers *et al*, 2008). Cela se traduit par une augmentation de la libération pré-synaptique de glutamate. De plus, les glucocorticoïdes modulent également rapidement la diffusion

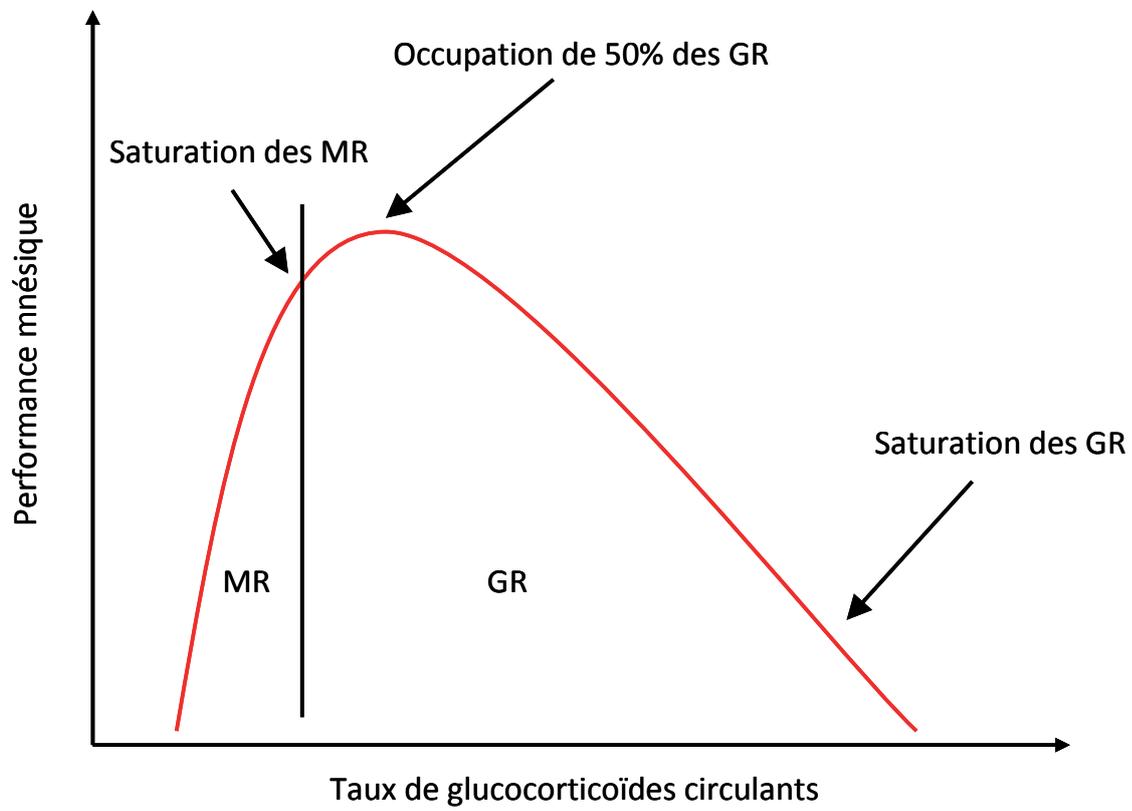


Figure 22 : Action des glucocorticoïdes selon une courbe en U-inversé (adapté de Lupien *et al*, 2007)

latérale des récepteurs AMPA dans les membranes (Groc *et al*, 2008). L'utilisation d'antagonistes des différents récepteurs, ainsi que de modèles de souris KO a permis de mettre en évidence le rôle privilégié joué par les récepteurs MR membranaires pré- et post-synaptiques dans cette action rapide des glucocorticoïdes.

Les récepteurs MR ne sont pas les seuls acteurs de cette régulation rapide qui intervient dans les minutes suivant l'exposition au stress. Les GR participeraient également, notamment en favorisant la génération de nouvelles dendrites aux niveaux des neurones pyramidaux de la zone CA1 de l'hippocampe (Komatsukazi *et al*, 2005). Ces récepteurs aux glucocorticoïdes impliqués dans les réponses rapides seraient situés au niveau des membranes neuronales (Groeneweg *et al*, 2011), contrairement aux récepteurs impliqués dans les réponses génomiques. Cependant, un certain nombre d'effets rapides des glucocorticoïdes, tels que la modulation de la LTP ou encore de la neurotoxicité, ne semblent pas influencés par ces 2 types de récepteurs, suggérant l'existence d'un autre récepteur aux glucocorticoïdes, encore inconnu à ce jour (Xiao *et al*, 2010 ; Wiegert *et al*, 2006).

#### ***1.4 Modèle de stress chronique***

##### ***1.4.1 Spécificité du stress chronique versus le stress aigu***

On distingue 2 types de stress : le stress aigu, qui correspond à un état transitoire et unique de l'élévation de la concentration de glucocorticoïdes et le stress chronique qui est, quant à lui, un état prolongé et persistant.

Les glucocorticoïdes exercent leurs effets selon une courbe en U inversée (Chrousos, 2009 ; Mateo, 2008 ; Lupien *et al*, 2007 ; Salehi *et al*, 2010) (**Figure 22**). En condition basale, le niveau de glucocorticoïdes est faible ; leur action passe alors uniquement par l'activation des récepteurs MR. Lors d'un stress, la concentration de glucocorticoïdes augmente, aboutissant à la saturation des récepteurs MRs et à l'activation progressive des récepteurs GRs. Dans le cas où la stimulation est modérée et transitoire, les taux de corticoïdes retournent à un niveau de base et le stress a un effet bénéfique d'adaptation, en permettant notamment de favoriser les fonctions associées à l'hippocampe, telles que l'apprentissage ou la mémorisation. A l'inverse, lorsque la stimulation devient trop intense ou trop prolongée, le stress a alors un effet délétère et l'organisme perd toutes ces capacités d'adaptation. Lors d'un stress chronique, on observe un certain nombre de modifications

physiques et métaboliques de l'axe HHS. Une exposition prolongée à un stress engendre ainsi une hypertrophie de la glande surrénale en réponse à l'hyperstimulation de l'axe et l'élévation durable des taux de corticoïdes (Ulrich-Lai *et al*, 2006), une augmentation de l'activité basale de l'axe (Albeck *et al*, 1997) et une diminution de l'efficacité de la régulation par rétrocontrôle négatif par réduction de la densité et de l'activité des récepteurs MR et GR (Mizoguchi *et al*, 2003).

Cependant, l'impact d'un stress dépend en grande partie du type et de la durée de la stimulation appliquée, ainsi que de l'individu sur laquelle il est appliqué. Ainsi, si un stress chronique peut avoir des conséquences irréversibles au cours de la période périnatale, les effets d'un stress chronique subi à l'âge adulte est le plus souvent réversible après disparition du stimulus stressant (Lupien *et al*, 2009).

#### 1.4.1 Modèle du stress chronique de contention

Il existe de nombreux modèles de stress chronique ; deux des modèles les plus utilisés sont le stress d'immobilisation et le stress de contention (Jaggi *et al*, 2011 ; Buynitsky et Mostofsky, 2009). Le stress d'immobilisation constitue un stress essentiellement physique, au cours duquel l'animal est attaché par ses membres et qui est donc dans l'incapacité totale de bouger. Le stress de contention constitue un stress physique mais également psychologique, basé sur la prise de conscience de l'impossibilité pour les animaux de s'échapper de l'espace restreint dans lequel ils sont confinés.

Le stress chronique de contention consiste à placer de manière répétée et prolongée les animaux dans des espaces restreints, ne leur permettant pas ni de bouger, ni de s'alimenter. De nombreux protocoles existent, différant par leur durée, leur fréquence, ou leur intensité (Buynitsky et Mostofsky, 2009). Cependant, tous sont considérés comme de bons modèles de stress, de part leur capacité à moduler la concentration sanguine en hormones du stress (ACTH et corticostérone) (Gray *et al*, 2010 ; Bauer *et al*, 2001 ; Kittraki *et al*, 2004). Parmi les protocoles de stress chronique de contention existants, l'un des plus utilisés consiste à placer les animaux en contention pendant 6h par jour, pendant 21 jours consécutifs. Ce type de stress est reconnu pour moduler les propriétés cérébrales et comportementales des animaux, comme nous le décrirons plus tard (Buynitsky et

Mostofsky, 2009), notamment en favorisant les comportements anxieux et agressifs des individus et en altérant leurs capacités d'apprentissage et de mémorisation.

## **II. Impact d'un stress chronique sur le comportement animal et le fonctionnement cérébral**

Le cerveau constitue une cible privilégiée du stress et des hormones impliquées. L'hippocampe, de part sa position centrale dans la réponse au stress, y est particulièrement sensible et de nombreuses études se sont intéressées à sa modulation par des agents stressants afin de mieux appréhender leur impact sur le comportement animal et le fonctionnement cérébral (McEwen, 2007). Cette partie de l'exposé vise à présenter les modulations du fonctionnement cérébral, plus particulièrement au niveau de l'hippocampe.

### ***II.1 Modulation des paramètres de la neurotransmission glutamatergique***

Le stress chronique, *via* l'action des glucocorticoïdes, module la neurotransmission glutamatergique, notamment en agissant sur la morphologie neuronale et sur la libération pré-synaptique de glutamate, ainsi que sur la régulation des récepteurs du glutamate et de la plasticité synaptique (Popoli *et al*, 2011 ; Chaouloff et Groc, 2011).

#### **II.1.1 Modulation structurale des neurones**

L'action des hormones du stress sur le fonctionnement cérébral implique un remodelage de la structure des neurones, notamment au niveau de l'hippocampe (McEwen, 2007). Des études ont ainsi montré une réduction significative de son volume chez le rongeur suite à un protocole de stress chronique de contention (Lee *et al*, 2009 ; Pham *et al*, 2003) ou un stress chronique psychosocial (Ohl *et al*, 2000 ; Czeh *et al*, 2001). Il a été montré une réduction du nombre et de la longueur des dendrites au niveau de la zone CA3 de l'hippocampe, suite à un stress chronique de contention (McLaughlin *et al*, 2007 ; Stewart *et al*, 2005 ; Magarinos et McEwen, 1995 ; Watanabe *et al*, 1992 ; Orłowski *et al*, 2011 ; Ramkumar *et al*, 2008), ainsi qu'une diminution du nombre de synapses dans cette zone (Sandi *et al*, 2003). Les mécanismes impliqués sont complexes. Ils font intervenir la régulation par les glucocorticoïdes de la neurotransmission glutamatergique et GABAergique. Mais il semble également que des monoamines tels que la sérotonine, ainsi

que des facteurs de croissance, tels que le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) soient impliqués (Conrad, 2006 ; McEwen, 2007).

Au niveau de la zone CA1, les effets d'un stress chronique sont contradictoires. Ainsi, certaines études suggèrent qu'un stress chronique de contention induit une réorganisation synaptique, notamment avec une augmentation de la zone de densité post-synaptique (Donohue *et al*, 2006) et du nombre de fibres nerveuses (Orlowski *et al*, 2011). Cependant, il a également été reporté une rétraction dendritique suite à ce type de stress (Pawlak *et al*, 2005), mais également dans d'autres paradigmes, tel qu'un stress chronique imprédictible, basé sur l'enchaînement de sessions de stress variés (injection d'une solution saline hypertonique, mise en contention, placement sur une plateforme en mouvement, mise en présence d'autres congénères dans un espace restreint...) (Sousa *et al*, 2000).

#### II.1.2 Modulation de la libération pré-synaptique de glutamate

Le stress modulant la structure des neurones, un certain nombre d'études se sont intéressées à l'influence qu'il pouvait avoir sur les propriétés neuronales et notamment sur les capacités de libération de neurotransmetteurs.

Au niveau pré-synaptique, des études *in vivo* menées sur le modèle de stress chronique de contention ont montré, dans l'hippocampe, une réorganisation du pool vésiculaire au niveau des extrémités pré-synaptiques. Le stress induit ainsi une densification des vésicules et leur accumulation au niveau de la zone active (Magarinos *et al*, 1997). Dès lors, un certain nombre d'études utilisant le même paradigme de stress ont cherché à comprendre l'impact du stress sur le phénomène d'exocytose de neurotransmetteurs. Si aucune modulation de l'expression des protéines syntaxine, SNAP-25, synaptophysine, synaptotagmine ou encore synapsine dans l'hippocampe n'a été mise en évidence, l'expression génique et protéique de la protéine VAMP2, impliquée dans la formation du complexe SNARE, est augmentée suite au stress (Gao *et al*, 2006 ; Müller *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent donc un impact de la contention répétée sur le cycle vésiculaire pré-synaptique ; cependant, les mécanismes impliqués restent encore méconnus.

Ces modulations de l'expression des protéines impliquées dans l'exocytose sont associées à des modulations de la libération de neurotransmetteurs. Une augmentation de la libération spontanée, ainsi que de la libération stimulée de glutamate a été mesurée sur

des préparations de synaptosomes de rongeurs après un stress chronique de contention (Satoh *et al*, 2011 ; Fontella *et al*, 2004) ou après une administration chronique de corticostérone (Hunter *et al*, 2009 ; Wang *et al*, 2009). Cet effet est accompagné d'une diminution de l'expression des récepteurs GR (Wang *et al*, 2009).

### II.1.3 Modulation de la plasticité synaptique

Le stress, *via* les glucocorticoïdes, module la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Cette régulation notamment des phénomènes de LTP ou LTD par le stress est complexe et varie selon la région de l'hippocampe considérée, les protéines impliquées, ainsi que l'intensité et la durée du stress (Maggio et Segal, 2010 ; Kim et Diamond, 2002).

Dans le cas d'un stress chronique, des études ont montré une inhibition de la LTP dans différentes zones de l'hippocampe (CA1, CA3 et gyrus denté) après contention (Pavlidis *et al*, 2002), stress chronique imprédictible (Alfarez *et al*, 2003) ou encore injection chronique de corticostérone (Pavlidis *et al*, 1993). L'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs GR inhibe ces effets, suggérant ainsi leur activation et leur rôle dans l'inhibition de la LTP au cours d'un stress chronique (Krugers *et al*, 2006). Cette modulation de la LTP a également été retrouvée sur des modèles utilisant des tranches d'hippocampe de souris traitées à la corticostérone (Wiegert *et al*, 2005 ; Krugers *et al*, 2005). Cependant, il semblerait que la LTP NMDA-dépendante soit spécifiquement altérée, tandis que d'autres formes de LTP, notamment celle impliquant des canaux calciques voltage dépendants, pourrait être stimulée (Krugers *et al*, 2005).

Cette modulation de la plasticité par le stress semble également impliquer les récepteurs AMPA. En effet, des études sur culture cellulaire de neurones d'hippocampe ont montré un effet stimulateur de la corticostérone sur l'expression et la diffusion des récepteurs AMPA et plus particulièrement de la sous-unité GluR2 (Martin *et al*, 2009 ; Groc *et al*, 2008). Ces mécanismes auraient comme conséquence de modifier le seuil d'excitabilité des cellules et ainsi d'inhiber la LTP. De plus, en favorisant l'endocytose des récepteurs AMPA, la corticostérone stimulerait à l'inverse les processus de LTD. Chez le rongeur, une augmentation de l'amplitude de la LTD a été retrouvée suite à un stress chronique psychosocial (Tran *et al*, 2011) ou imprédictible (Holderbach *et al*, 2007).

## ***II.2 Impact du stress sur la régulation astrocytaire de la neurotransmission glutamatergique***

Le stress chronique semble également avoir des effets importants sur la morphologie, le métabolisme et les fonctions astrocytaires, notamment celles impliquées dans la régulation de la neurotransmission glutamatergique (Popoli *et al*, 2011 ; Jauregui-Huerta *et al*, 2010).

### **II.2.1 Modulation structurale des astrocytes**

L'administration chronique de corticostérone chez le rat engendre une réduction de l'expression de GFAP, principal marqueur astrocytaire, au niveau de l'hippocampe, alors qu'une adrénalectomie, empêchant toute libération de corticostérone, augmente son expression (O'Callaghan *et al*, 1989 ; O'Callaghan *et al*, 1991 ; Nichols *et al*, 1990). Des résultats similaires sont observés dans des modèles de stress chronique imprédictible (Liu *et al*, 2011). Cependant, des études récentes en immunohistochimie suggèrent un effet dose-dépendant stimulateur du stress sur le nombre d'astrocytes au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (Bridges *et al*, 2008), ainsi que sur la quantité de GFAP et de vimentine exprimée au niveau de l'hippocampe entier (Jang *et al*, 2008). Une telle augmentation, caractéristique de l'activation astrocytaire, est également retrouvée sur des modèles de culture primaire d'astrocytes issus de cortex de rat, aussi bien d'un point de vue génique que protéique alors que cet effet est inhibé en condition de co-culture avec des neurones (Rozovsky *et al*, 1995). Ainsi, le stress, *via* les glucocorticoïdes, exerce un effet complexe sur l'expression de la protéine astrocytaire GFAP. Cet effet serait fortement dépendant du type de stress, ainsi que de la zone cérébrale considérée.

### **II.2.2 Modulation des capacités de capture et recyclage du glutamate**

Peu d'études se sont intéressées jusqu'alors à l'impact d'un stress chronique sur les capacités de capture du glutamate par les astrocytes. Une étude menée *in vitro* montre un effet dose- et temps-dépendant des glucocorticoïdes sur l'expression du transporteur astrocytaire du glutamate GLT-1 sur des cultures primaires d'astrocytes corticaux. La dexaméthasone (hormone de synthèse), ainsi que la corticostérone semblent en stimuler l'expression protéique et ainsi la capture de glutamate, sans modification de l'expression du

transporteur GLAST (Zschocke *et al*, 2005). Ces effets ont été retrouvés *in vivo* au niveau de l'hippocampe de rats soumis à un stress chronique de contention (Reagan *et al*, 2004).

L'impact des glucocorticoïdes sur la capacité de capture de glutamate par les astrocytes est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la protéine astrocytaire glutamine synthétase, responsable de la conversion du glutamate en glutamine (Vardimon *et al*, 1999 ; Vardimon, 2000). Ces études suggèrent que le stress stimule la régulation astrocytaire du cycle du glutamate.

### ***II.3 Modifications comportementales***

Toutes ces modifications de structure et de fonctionnement du SNC induites par le stress chronique ont des répercussions sur l'expression du comportement animal (McEwen, 2007). Cependant, les résultats sont assez hétérogènes, en fonction du protocole de stress utilisé, de l'espèce et de l'âge des individus étudiés ou encore de la période de la journée considérée (Bowman, 2005 ; Huynh *et al*, 2011). Dans cette partie, seuls les résultats obtenus sur des modèles de stress chronique de contention chez des rats mâles seront présentés.

#### **II.3.1 Modulation de la locomotion**

Les résultats obtenus sur l'étude des capacités motrices et la locomotion sont assez divergents. Si certaines études suggèrent une réduction de l'activité motrice des animaux suite à un stress chronique de contention (Huynh *et al*, 2011 ; Cruz *et al*, 2012 ; Marin *et al*, 2007 ; Beck et Luine, 2002 ; Bowman *et al*, 2009), d'autres ne montrent aucune modification de la locomotion dans un test d'openfield (Trofimiuk et Braszko, 2011 ; Gregus *et al*, 2005). Ces résultats apparemment contradictoires sont liés notamment à l'intervalle entre la dernière session de stress et la réalisation du test comportemental. Ainsi, dans des études utilisant des protocoles de stress chronique identiques, une réduction de la locomotion dans un test d'openfield est notée dans les 24h après la dernière exposition au stress (Cruz *et al*, 2012), tandis qu'aucun effet n'est observé 72h après (Lepsch *et al*, 2005), suggérant un effet transitoire.

Des études suggèrent une action synergique des 2 types de récepteurs GR et MR dans les altérations motrices liées à un stress chronique de contention (Jadavji *et al*, 2011).

En effet, l'administration orale d'antagonistes des récepteurs MR ou GR permet de prévenir l'altération des capacités motrices induite par la contention ou l'injection chronique de corticostérone.

### II.3.2 Modulation de la réponse émotionnelle

Les études concernant l'impact d'un stress chronique sur la réponse émotionnelle présentent également des résultats assez divergents.

Certains travaux suggèrent que le stress chronique renforce les phénomènes d'anxiété et d'agressivité. Ainsi, les rongeurs explorent moins le centre d'un openfield, considéré comme anxiogène (Beck et Luine, 2002 ; Huynh *et al*, 2011), et les bras ouverts d'un labyrinthe en croix surélevé (Huynh *et al*, 2011 ; Bowman *et al*, 2009) après un stress chronique de contention. Par ailleurs, dans un test de conditionnement de peur, le stress chronique de contention altère la phase d'extinction de la peur conditionnée (Beck et Luine, 2002 ; Sandi *et al*, 2001 ; Miracle *et al*, 2006 ; Baran *et al*, 2009 ; Wilber *et al*, 2011). Enfin, certaines études suggèrent également une augmentation des comportements agressifs qui se manifestent par une augmentation des morsures, des coups, des comportements dominants et des poursuites entre animaux d'une même cage suite au protocole de stress (Wood *et al*, 2003).

Il ressort que l'anxiété et l'agressivité des animaux sont régulées par différents facteurs environnementaux ou individuels. Les effets du stress chronique sont ainsi renforcés chez des individus âgés comparés à des adultes (Shoji et Mizoguchi, 2010), ainsi que chez des individus ayant subi un stress préalable durant la période périnatale (Eiland et McEwen, 2010). De plus, les effets d'un stress chronique de contention sur la réponse émotionnelle des animaux varient en fonction du sexe de l'individu, du type de test comportemental utilisé et de la période du cycle circadien (Huynh *et al*, 2011). Ainsi, chez les rongeurs, les mâles semblent plus sensibles au stress que les femelles. De plus, l'impact d'un stress chronique sur les comportements anxieux est davantage marqué en période nocturne, période d'activité des rongeurs, tandis que l'incidence des comportements dépressifs, tels qu'une réduction de la préférence au sucrose ou une augmentation de l'immobilité dans un test de porsolt, est plutôt accentuée en période diurne.

Cependant, d'autres études n'ont mis aucun effet du stress chronique en évidence sur le comportement anxieux et/ou agressif des animaux (Trofimiuk et Braszko, 2011 ; Shoji et Mizoguchi, 2010 ; Eiland et McEwen, 2010 ; Gregus *et al*, 2005).

### II.3.3 Modulation des capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiale

Le stress module les capacités d'apprentissage et de mémorisation des individus (Conrad, 2010). Chez le rongeur, il a ainsi été décrit une altération de l'acquisition et de la rétention d'apprentissage spatial suite à un stress chronique de contention dans différents tests, tels que le labyrinthe spatial de Barnes (Trofimiuk et Braszko, 2011), le labyrinthe en Y ou en T (McLaughlin *et al*, 2007 ; Conrad *et al*, 2003 ; Ramkumar *et al*, 2008), la piscine de Morris (Sandi *et al*, 2003), le labyrinthe radiaire (Srikumar *et al*, 2007 ; Srikumar *et al*, 2006 ; Veena *et al*, 2009). Dans ces tests, les animaux stressés font davantage d'erreurs et nécessitent un temps d'apprentissage plus important. Ces troubles d'apprentissage/mémoire spatiale sont à mettre en lien avec les altérations spécifiques de l'hippocampe dont dépendent largement ces tâches comportementales (Martin et Clark, 2007 ; Kenney et Gould, 2008 ; Vann et Albasser, 2011).

Cependant, ces effets peuvent être modulés en fonction des conditions de test. Ainsi, l'altération induite par le stress des capacités d'apprentissage dans le labyrinthe en Y n'est plus observée lorsque le délai entre l'habituation et le test est réduit à 1 minute, comparé à 4h (Kleen *et al*, 2006 ; Wright et Conrad, 2008) ou lorsque l'apprentissage se déroule en condition indicée (Wright et Conrad, 2005). Ce dernier résultat montre que le stress chronique altère spécifiquement l'apprentissage spatial, puisque lorsque l'utilisation d'autres systèmes de mémorisation est permise par l'introduction d'indices visuels, l'apprentissage n'est plus altéré. Il a également été mis en évidence des effets contradictoires selon la durée du stress de contention (6h/jour). En effet, si le stress est effectué pendant 13 jours, il peut, sur des rats adultes, être bénéfique et augmenter les performances sur le labyrinthe radiaire. A l'inverse, si le stress perdure pendant 21 jours, il devient alors délétère (Bowman, 2005). Ces résultats semblent refléter les effets selon une courbe en U inversée des glucocorticoïdes. Lors d'un stress de 13 jours, les systèmes d'adaptation sont stimulés favorisant l'apprentissage et la mémorisation. Lorsque le stress perdure pendant 21 jours, l'organisme n'arrive plus à s'adapter et les glucocorticoïdes ont alors un effet délétère sur les capacités d'apprentissage des individus.

### **III. Rôle protecteur des AGPI face aux altérations cérébrales liées au stress chronique**

Les AGPI, de part leur position centrale au niveau des membranes cérébrales et leurs propriétés, sont indispensables au bon développement et fonctionnement du SNC. Un déséquilibre de la composition lipidique cérébrale semble impliqué dans l'apparition et le développement de certaines neuropathologies, en particulier les troubles anxieux et la dépression (PÉrica et Delas, 2011 ; Ross, 2009 ; Freeman et Rapaport, 2011). Ces maladies ayant été reportées comme étant en lien avec le statut de stress des individus, plusieurs études récentes, dont les résultats seront décrits dans cette partie, se sont intéressées au rôle des AGPI dans la réponse au stress (Pervanidou et Chrousos, 2011).

#### ***III.1 Les endocannabinoïdes***

Les endocannabinoïdes (eCBs), molécules lipophiles dérivées de l'acide arachidonique, jouent un rôle important dans la régulation de la réponse au stress (Gorzalka *et al*, 2008 ; Steiner et Wotjak, 2008 ; Finn, 2010). Les 2 principaux eCBs sont le N-arachidonyléthanolamine (AEA) et le 2-arachidonylglycerol (2-AG). Ils exerceraient un effet inhibiteur sur l'activation et la régulation de l'axe HHS suite au stress et seraient eux-mêmes régulés par le stress (Patel *et al*, 2004 ; Cota *et al*, 2007 ; Rademacher et Hillard, 2007).

Ces 2 eCBs semblent être différemment régulés en fonction du type de stress et de la structure cérébrale étudiée. Ainsi, des études ont montré, au niveau des structures limbiques (hippocampe, amygdale et cortex préfrontal), une réduction de la concentration en AEA, accompagnée d'une augmentation de celle en 2-AG suite à un stress chronique, tandis que le processus inverse est observé au niveau du striatum (Rademacher *et al*, 2008 ; Bowles *et al*, 2011 ; Hill *et al*, 2005 ; Patel *et al*, 2009 ; Patel *et al*, 2005). Cependant, ces résultats dépendent du protocole de stress utilisé et aucune modulation du contenu en AEA et 2-AG de l'hippocampe n'est décrite suite à des injections chroniques de corticostérone pendant 21 jours (Hill *et al*, 2008).

Les régulations du contenu en eCBs par le stress chronique sont accompagnées d'une diminution de la densité du site de fixation des récepteurs CB1, le principal récepteur des eCBs au niveau du SNC (Bowles *et al*, 2011 ; Hill *et al*, 2008 ; Reich *et al*, 2009). Cette réduction de densité est associée à une diminution de l'expression protéique de CB1 (Hill *et*

*al*, 2008 ; Reich *et al*, 2009), sans modification de l'expression génique (Bowles *et al*, 2011), suggérant un impact du stress sur le catabolisme du récepteur.

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs CB1 a permis de mettre en évidence le rôle des eCBs dans les phénomènes d'accoutumance à un stress chronique répété (Patel *et al*, 2005 ; Patel et Hillard, 2008 ; Finn, 2010).

### **III.2 Les AGPI n-3**

De nombreuses études ont suggéré un rôle bénéfique des AGPI n-3 dans les maladies psychologiques, tels que la dépression ou les troubles de l'anxiété, qui sont décrites comme pouvant être liées au stress (Ross, 2009 ; Liperoti *et al*, 2009). Cela soulève la question du rôle joué par ces AGPI n-3 dans la réponse au stress chronique.

Des études menées sur des modèles de stress de contention chez le rongeur ont montré qu'une supplémentation en huile de poisson riche en AGPI n-3 permettait de prévenir les altérations comportementales. Ainsi, les AGPI n-3 permettraient de restaurer les capacités cognitives des animaux dans des tests tels que le labyrinthe de Barnes (Trofimiuk et Braszko, 2011) ou la piscine de Morris (Ferraz *et al*, 2011). Ils préviendraient également les effets anxiogènes du stress sur un labyrinthe en croix surélevé, en relation avec une réduction du pic de corticostérone induit par le stress (Ferraz *et al*, 2011). L'effet bénéfique des AGPI n-3, et plus particulièrement du DHA, est retrouvé lorsque le stress est mimé par l'injection intra-cérébro-ventriculaire de CRH (Takeuchi *et al*, 2003). A l'inverse, une déficience en AGPI n-3 semble accentuer les effets du stress et augmenter la vulnérabilité des individus, lorsque le stress est appliqué à l'âge adulte (Takeuchi *et al*, 2003) ou bien à la période post-natale par séparation maternelle (Mathieu *et al*, 2008 ; Mathieu *et al*, 2011).

**En résumé**, le stress chronique, *via* l'action des glucocorticoïdes, altère le fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique, ce qui a des répercussions sur le comportement animal, en particulier sur les capacités d'apprentissage. Les données de la littérature, bien que disparates, suggèrent un rôle des AGPI n-3 dans la prévention de ces altérations.



# Objectifs



L'objectif de ce travail de recherche est de caractériser l'impact des apports alimentaires en AGPI n-3 dans la régulation de la réponse à un stress chronique, en s'intéressant tout particulièrement au fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique. Notre hypothèse de départ est qu'un apport adéquat, voire enrichi, en AGPI-LC n-3 favorise les processus endogènes de résistance au stress et que leur déficit renforce la sensibilité des individus aux événements stressants. Afin de répondre à notre hypothèse, deux approches complémentaires sont développées :

- une approche *in vivo* visant à évaluer la réponse à un stress chronique de contention chez le rat recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3
- une approche *in vitro* visant à caractériser la réponse au stress des différents partenaires cellulaires de la synapse tripartite glutamatergique : neurones et astrocytes

Ces deux approches complémentaires visent à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la régulation par le stress chronique du fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique en fonction du statut lipidique cérébral des membranes cellulaires.

L'approche *in vivo* s'appuie sur un modèle de manipulation nutritionnelle chez le rat, bien caractérisé au laboratoire. En modifiant les apports alimentaires en AGPI n-3 (régimes déficient ou équilibré ou enrichi en AGPI-LC) des rats à partir de leur conception (*via* l'alimentation maternelle) jusqu'à l'âge adulte (6 mois), il est possible de moduler la composition lipidique membranaire en AGPI au niveau cérébral. Ainsi, comparativement à des rats équilibrés, le rapport membranaire AGPI n-6/AGPI n-3 des membranes cérébrales est fortement augmenté chez les rats déficients en AGPI n-3 et à l'inverse réduit chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3. L'impact d'un stress chronique de contention (6h/jour pendant 21 jours) administré à l'âge adulte (6 mois) est alors caractérisé dans les 3 lots alimentaires.

Dans un premier temps, l'impact du stress est évalué par le suivi de la croissance pondérale des rats, le dosage de la concentration plasmatique de corticostérone (principale hormone glucocorticoïde du stress chez le rat) et l'expression génique et protéique cérébrale des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR) par lesquels la corticostérone exerce son

action. La réponse comportementale des rats est ensuite évaluée autour de 3 axes particuliers, connus pour être modulés à la fois par les apports en AGPI n-3 et par le stress chronique : l'activité locomotrice, la réponse émotionnelle et les capacités d'apprentissage.

Dans un deuxième temps, une approche électrophysiologique nous permet d'étudier plus spécifiquement la régulation de la synapse glutamatergique au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Les paramètres synaptiques de base (efficacité synaptique et libération de neurotransmetteur) et la plasticité synaptique (LTP et LTD) sont caractérisés sur des tranches d'hippocampe. Ces résultats sont complétés par l'analyse de l'expression génique et protéique d'un certain nombre de marqueurs de la synapse tripartite glutamatergique, mais également du métabolisme lipidique.

Cette approche *in vivo* est originale par le fait qu'elle constitue une étude transversale, allant des paramètres comportementaux à l'expression génique de marqueurs, de l'interaction entre 2 paramètres environnementaux : les apports alimentaires en AGPI n-3 et le stress chronique de contention.

L'approche *in vitro* a pour objectif de compléter l'approche *in vivo* en étudiant l'implication des différents partenaires de la synapse tripartite : les neurones et les astrocytes.

Tout d'abord, afin de compléter les données obtenues *in vivo* sur les paramètres électrophysiologiques, les mécanismes de libération de neurotransmetteur sont appréhendés sur un modèle cellulaire de lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y. Ces cellules présentent les caractéristiques de cellules neuronales et disposent des machineries protéiques et chimiques nécessaires à la synthèse, la capture et la libération de noradrénaline. Elles constituent donc un modèle valide pour l'étude des paramètres de la neurotransmission. Trois types de libération sont caractérisés : la libération basale qui mime la libération spontanée de neurotransmetteurs, la libération stimulée au KCl 105mM qui nécessite l'activation des canaux voltage-dépendants et la libération stimulée au Carbachol 1mM qui permet l'activation des récepteurs muscariniques. Dans un premier temps, l'impact des AGPI membranaires sur les paramètres de captage et de libération de

noradrénaline est testé sur des cellules supplémentées en AGPI (DHA ou AA) à des concentrations croissantes. Dans un deuxième temps, l'effet d'une incubation des cellules pendant 1h ou 24h avec de l'hydrocortisone est évalué en fonction du statut en AGPI des membranes cellulaires (supplémentation du milieu de culture en DHA ou d'AA). L'hydrocortisone est utilisée pour évaluer l'impact des glucocorticoïdes associés au stress, en situation aiguë (1h) ou chronique (24h).

Les astrocytes sont des partenaires cellulaires indissociables des neurones au sein de la synapse tripartite glutamatergique et jouent un rôle important dans la régulation de la neurotransmission. L'impact du stress chronique sur le fonctionnement cérébral pourrait, ainsi, en partie être lié à une modulation des fonctions astrocytaires. Afin de vérifier cette hypothèse, deux propriétés clés des astrocytes, la plasticité morphologique (caractérisée notamment par la capacité d'émission et de rétraction de fins filopodes qui vont se placer au contact des synapses) et la capacité de capture du glutamate, essentielle au maintien de l'homéostasie de la synapse glutamatergique, sont évaluées sur des cultures primaires d'astrocytes issus du cortex de rats nouveaux nés. Les astrocytes sont supplémentés en AGPI ( $\emptyset$ , DHA ou AA) puis exposés ou non à la corticostérone. La localisation et l'expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes, GR et MR sont également analysées afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des astrocytes à la corticostérone.



## Matériel et Méthodes

Nutriments (g/kg de régime)	Régime Equilibré	Régime Carencé	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 dont :	66	68	68
• Huile Oléisol-	26,8	68	45,8
• Huile de colza	39,2	-	-
• Huile de thon	-	-	22,2
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Composition du mélange minéral (g/100g) : CaHPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O : 38 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 24 ; CaCO<sub>3</sub> : 18 ; NaCl : 6,9 ; MgO : 2 ; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O : 9 ; FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O : 0,86 ; ZnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O : 0,5 ; MnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O : 0,5 ; CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O : 0,1 ; NaF : 0,08 ; CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-12H<sub>2</sub>O : 0,05 ; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>24</sub>-4H<sub>2</sub>O : 0,002 ; KI : 0,004 ; CoCO<sub>3</sub> : 0,002 ; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> : 0,002. Origine des huiles : Mélange oléisol-tournesol et huile de colza, Lesieur ; Huile de Thon, Polaris (Quimper).

Tableau 2 : Composition des régimes en macronutriments

Acides gras (% AG totaux)	Régime Equilibré	Régime Carencé	Régime Supplémenté
16 : 0	4,7	4,5	9,2
18 : 0	1,8	2,5	3
<b>AG saturés totaux</b>	<b>7,3</b>	<b>7,8</b>	<b>14,9</b>
18 : 1 n-9	61,3	67,2	52,3
18 : 1 n-7	3,3	2,2	2,7
<b>AG monoinsaturés totaux</b>	<b>65,6</b>	<b>69,8</b>	<b>58,3</b>
18 : 2 n-6	22	22,4	15,6
20 : 4 n-6	-	-	0,6
<b>n-6 totaux</b>	<b>22</b>	<b>22,4</b>	<b>16,3</b>
18 : 3 n-3	5,2	0,1	0,2
20 : 5 n-3	-	-	2,3
22 : 6 n-3	-	-	7,4
<b>n-3 totaux</b>	<b>5,2</b>	<b>0,1</b>	<b>10,6</b>
Acides gras (mg/100 g de régime)	Régime Equilibré	Régime Carencé	Régime Supplémenté
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

Tableau 3 : Composition des régimes en acides gras (AG)

## Partie 1 : Caractérisation de la réponse au stress de rats Wistar recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3

### I. Modèle animal

#### *1.1. Conditions d'élevage*

Les rats mâles Wistar utilisés dans cette étude sont élevés dans l'animalerie de l'unité NuReLiCe de Jouy-en-Josas. Les conditions d'élevage et de sacrifice des animaux sont conformes aux directives de la CEE (86/609//CEE). Les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau et sont élevés dans des pièces contrôlées en température (22 +/- 1°C), hygrométrie (50 +/- 10 %) et lumière (alternance lumière/obscurité de 12 heures).

Les rats utilisés sont dits de 1<sup>e</sup> génération. Quinze jours avant l'accouplement, des femelles âgées de 8 semaines sont placées individuellement dans des cages et réparties en 3 groupes en fonction du régime alimentaire qu'elles reçoivent : le régime déficient en AGPI n-3, le régime équilibré en AGPI n-6 et n-3 ou le régime enrichi en AGPI n-3 à longues chaînes. Ces régimes sont administrés aux femelles jusqu'au sevrage de leurs ratons, qui recevront à leur tour le même régime alimentaire que leurs mères. Après la parturition, les portées sont équilibrées à 10 petits par mère et seuls les mâles sont conservés pour l'étude.

#### *1.2. Protocoles alimentaires*

Le **tableau 2** reporte la composition en macronutriments des 3 régimes alimentaires. Ces régimes sont isocaloriques (4050 Kcal/kg) et isolipidiques (7% de lipides), mais ils diffèrent par leur teneur en AGPI n-3 (**Tableau 3**).

Le régime déficient en AGPI n-3 est préparé à partir d'huile d'oléisol-tournesol naturellement dépourvue d'acide  $\alpha$ -linoléique (LNA 18:3 n-3) et d'AGPI-LC n-3. Le régime équilibré en AGPI n-6 et n-3 est constitué d'un mélange d'huile d'oléisol-tournesol et d'huile de colza permettant l'apport d'acide  $\alpha$ -linoléique (LNA 18:3 n-3) ; ce régime apporte des quantités suffisantes en acides linoléique (LA 18:2 n-6) et  $\alpha$ -linoléique (LNA 18:3 n-3) pour couvrir les besoins en AGPI des rats et notamment des nouveaux nés lors de leur développement (Guesnet *et al*, 1997), soit respectivement environ 1300 mg et 300 mg pour 100 g de régime. Enfin, le régime enrichi en AGPI-LC n-3 est obtenu à partir d'un mélange d'huile d'oléisol-tournesol et d'huile de thon permettant d'apporter le précurseur des AGPI

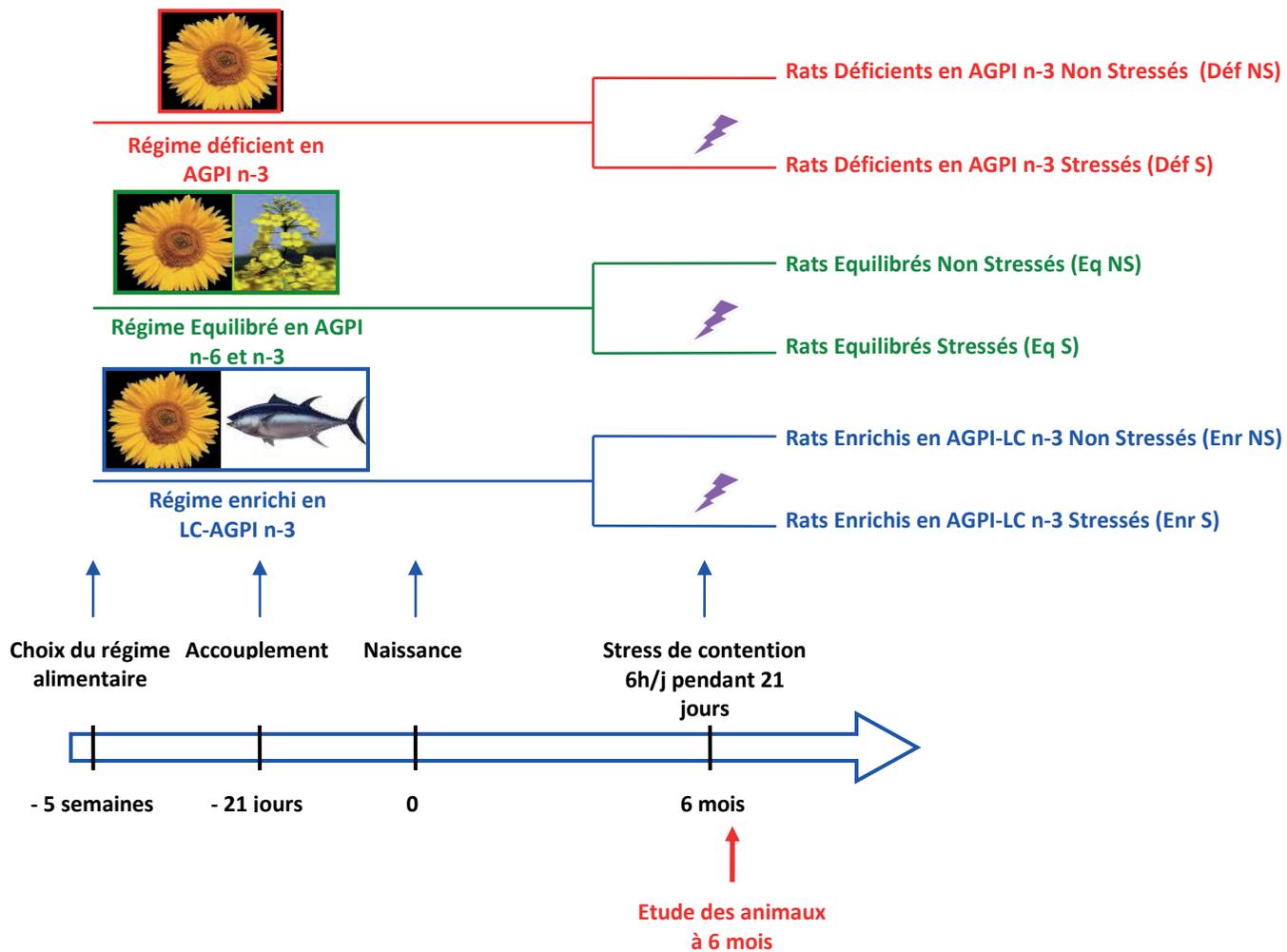


Figure 23 : Schéma récapitulatif des protocoles alimentaires et du protocole de stress

n-3, LNA 18 : 3 n-3, mais aussi des AGPI n-3 à longues chaînes tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 : 5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 : 6 n-3). Ce régime permet ainsi l'apport d'environ 150 mg d'EPA et 450 mg de DHA pour 100 g de régime. Cet apport alimentaire est élevé, constituant 3 fois la quantité nécessaire pour satisfaire les besoins en DHA durant la période périnatale (Alessandri *et al*, 2003).

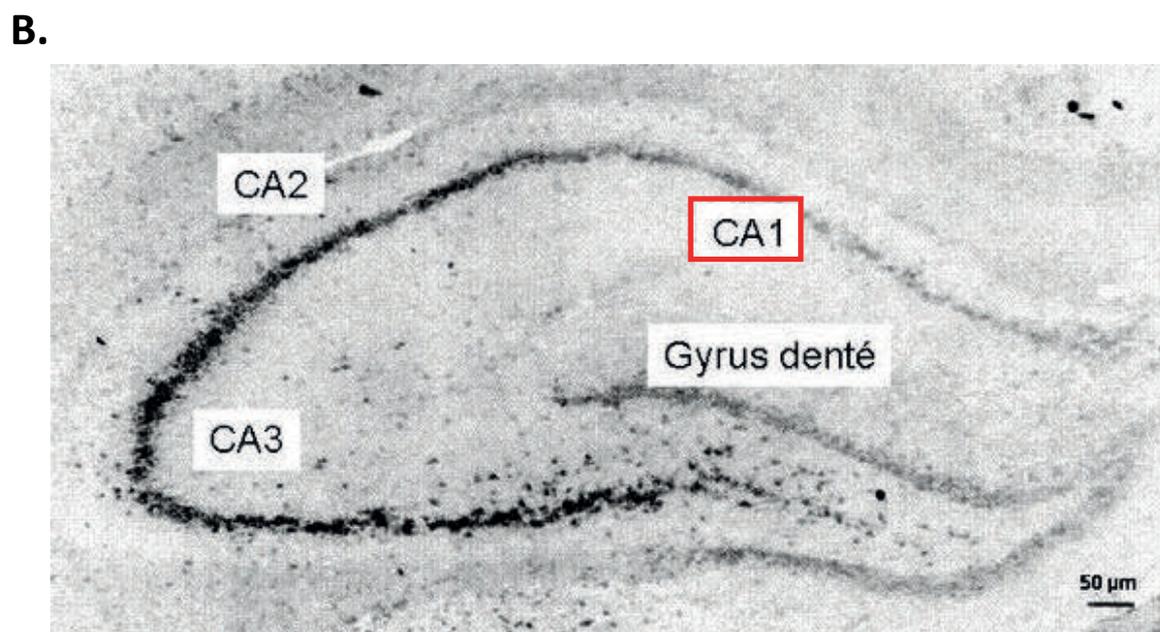
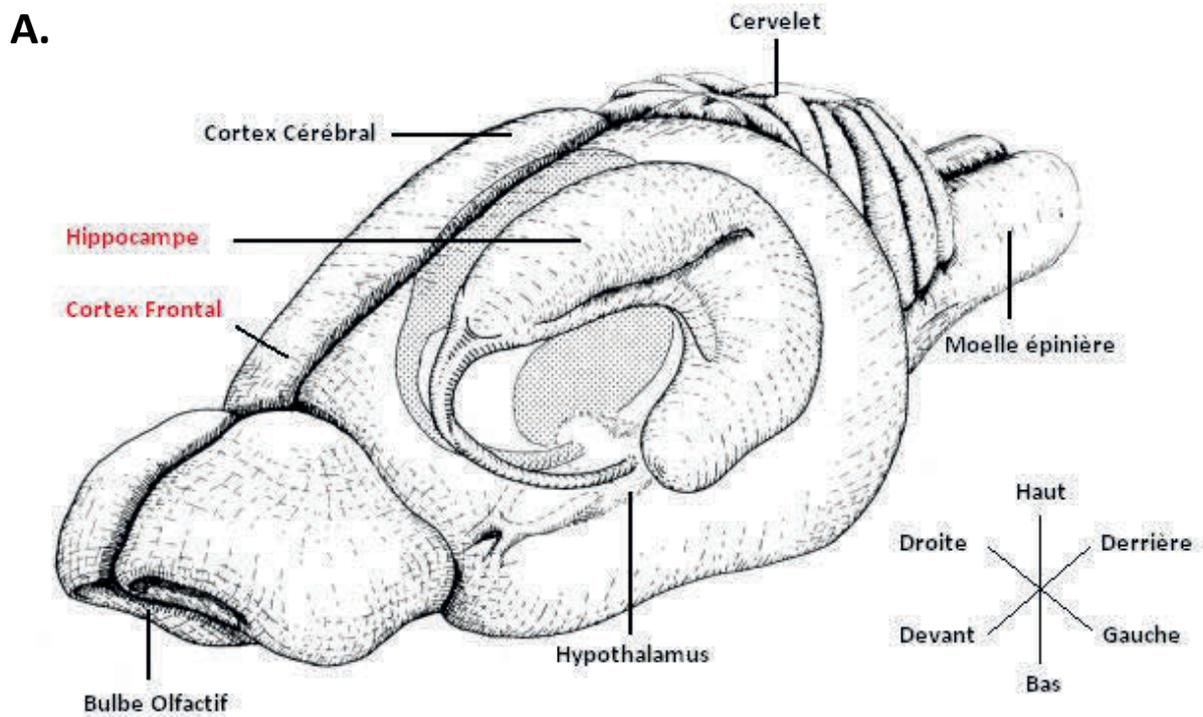
### ***1.3. Protocole de stress de contention***

A l'âge de 6 mois, la moitié des animaux est soumise à un stress de contention. Ces animaux sont, dès le début du stress, élevés dans une pièce séparée des animaux non stressés afin d'éviter toute communication du stress. Les animaux stressés sont placés en contention 6h/jour pendant 21 jours (Sunanda *et al*, 2000 ; Veena *et al*, 2009) hors week-end. Ils sont alors enroulés dans un tube grillagé maintenu par des colliers de serrage. Les rats sont étudiés à l'issue de cette session de stress. En parallèle, les animaux non stressés sont manipulés hebdomadairement.

Les protocoles alimentaires et de stress de contention sont résumés dans la **Figure 23**. Six groupes expérimentaux sont ainsi définis : (1) Déficit en AGPI n-3 non stressés, Déf NS ; (2) Déficit en AGPI n-3 stressés, Déf S ; (3) Équilibrés non stressés, Eq NS ; (4) Équilibrés stressés, Eq S ; (5) Enrichi en AGPI-LC n-3 non stressés, Enr NS ; (6) Enrichi en AGPI-LC n-3 stressés, Enr S.

### ***1.4. Sacrifices des animaux et prélèvements des structures cérébrales***

Les rats sont sacrifiés par décapitation. Les cerveaux sont rapidement isolés de la boîte crânienne et la dissection des différentes structures cérébrales s'effectue sur un lit de glace (4°C environ), afin de limiter la dégradation des tissus. Après élimination des bulbes olfactifs, les deux hémisphères sont scindés puis coupés au premier tiers antérieur, permettant ainsi le prélèvement du cortex frontal. Les hippocampes sont ensuite extraits puis déroulés afin de faire apparaître les différentes couches de l'hippocampe. Le premier tiers supérieur de l'hippocampe, correspondant à la zone CA1, est prélevé (**Figure 24**). Les structures sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.



**Figure 24 : Zones cérébrales d'intérêt pour l'étude**

- A. Schéma général d'un cerveau de rat. Lors de cette étude, nous nous sommes davantage intéressés au cortex frontal et à l'hippocampe
- B. Coupe de l'hippocampe. Au niveau de l'hippocampe, nous nous sommes concentrés sur l'étude d'une zone bien particulière : le CA1. Cette zone, lorsqu'on déroule l'hippocampe, correspond au premier tiers supérieur de la structure

## **II. Mesures de paramètres physiologiques**

### ***II.1. Croissance pondérale et prise alimentaire***

Les rats sont pesés de manière régulière tout au long de leur vie, de la naissance à leur sacrifice. Les pesées sont effectuées hebdomadairement pendant la période de stress de contention et toutes les 2 semaines en dehors de cette dernière.

Les rats sont nourris avec une dose fixe d'aliments chaque jour (20g/animal/jour) et la quantité restante est pesée en fin de semaine. La prise alimentaire est exprimée en gramme moyen de nourriture consommée par jour et par rat pour chaque groupe d'animaux.

### ***II.2. Dosage de la corticostérone plasmatique***

La corticostérone est une hormone du stress chez les rongeurs et constitue un indice endocrinien de la réponse des animaux.

#### **II.2.1 Prélèvements du plasma**

Le sang est prélevé après incision au scalpel de la queue à J0 (concentration basale), J1, J7, J14 et J21 du protocole de stress de contention. Pendant la période de stress, les prélèvements sont effectués à 2 moments de la journée : 30 minutes après la mise en contention et à l'issue des 6h de contention.

Les quelques  $\mu\text{L}$  de sang prélevés sont récoltés dans des tubes contenant 5 $\mu\text{L}$  d'héparine, puis centrifugés pendant 10 min à 3000g à 4°C. Le plasma surnageant est récupéré et stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

#### **II.2.2 Dosage de la concentration plasmatique de corticostérone**

La concentration plasmatique de corticostérone est déterminée par radioimmunomarquage à l'iode  $^{125}\text{I}$  (kit commercial ImmuChem<sup>TM</sup>  $^{125}\text{I}$ , MP Biomedical).

Le principe du dosage repose sur une compétition pour un anticorps anti-corticostérone entre la corticostérone marquée à l'iode  $^{125}\text{I}$  et la corticostérone non marquée du plasma. On mesure alors la fraction de la corticostérone marquée liée à l'anticorps qui diminue exponentiellement avec la concentration de corticostérone plasmatique. A l'aide d'une courbe étalon préétablie, la concentration plasmatique de corticostérone de l'échantillon est alors calculée et exprimée en ng/mL de plasma.

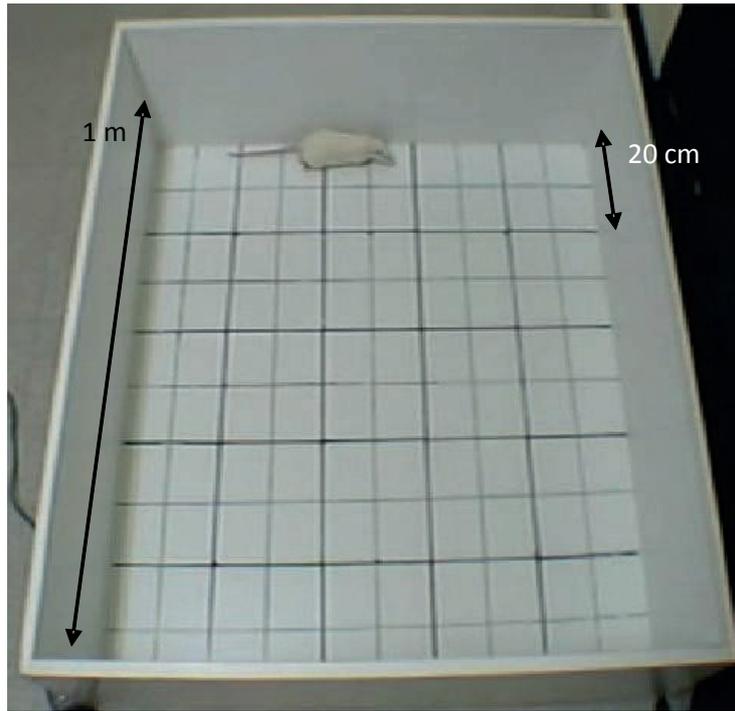


Figure 25 : Dispositif de l'openfield



Figure 26 : Dispositif du test d'actimétrie

Le dosage de corticostérone est effectué sur 10 µL de l'échantillon en duplicata, d'après le protocole du fournisseur.

### **III. Etude comportementale**

L'étude comportementale a été réalisée en collaboration avec Pascale Gisquet et Laure Balasse du CNPS UMR8195 (CNRS, Université Paris-Sud XI, Orsay, France).

#### ***III.1. Mesure de l'activité locomotrice***

##### **III.1.1 Openfield (Figure 25)**

L'openfield est un test permettant d'appréhender le comportement exploratoire et l'activité locomotrice spontanée des animaux. Le dispositif de l'openfield, disposé à même le sol, est constitué d'une boîte carrée de 1 m<sup>2</sup> sans couvercle, de fond blanc, présentant 4 parois verticales de 30 cm de hauteur. Le fond du dispositif est divisé en 25 carrés de taille égale (20 x 20 cm). Les capacités locomotrices et exploratoires des animaux sont appréciées par leurs déplacements et redressements au cours du test.

L'animal est placé dans un coin déterminé du dispositif et peut explorer librement pendant 5 minutes. Le test est enregistré grâce au système de Video-Tracking ANY-maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA) et l'expérimentateur se trouve à l'extérieur de la pièce de test afin de ne pas influencer le comportement du rat. L'openfield est nettoyé à l'eau entre chaque rat afin d'éliminer les odeurs des congénères.

Durant le test, quatre paramètres sont mesurés à l'aide du logiciel ANY-maze™ : (1) l'activité locomotrice mesurée par le nombre de cases traversées (2) l'activité exploratoire, représentée par le nombre de redressements avec ou sans appui sur les parois, (3) l'activité globale correspondant à la somme de l'activité locomotrice et de l'activité exploratoire et (4) le temps de toilettage.

##### **III.1.2 Test d'actimétrie (Figure 26)**

Le test d'actimétrie permet de mesurer la réactivité des animaux à la nouveauté ainsi que leur activité locomotrice. Il consiste en un corridor circulaire (12 cm de largeur, 170 cm de circonférence), délimité par des parois en PVC gris (50 cm de hauteur) et dont le sol est

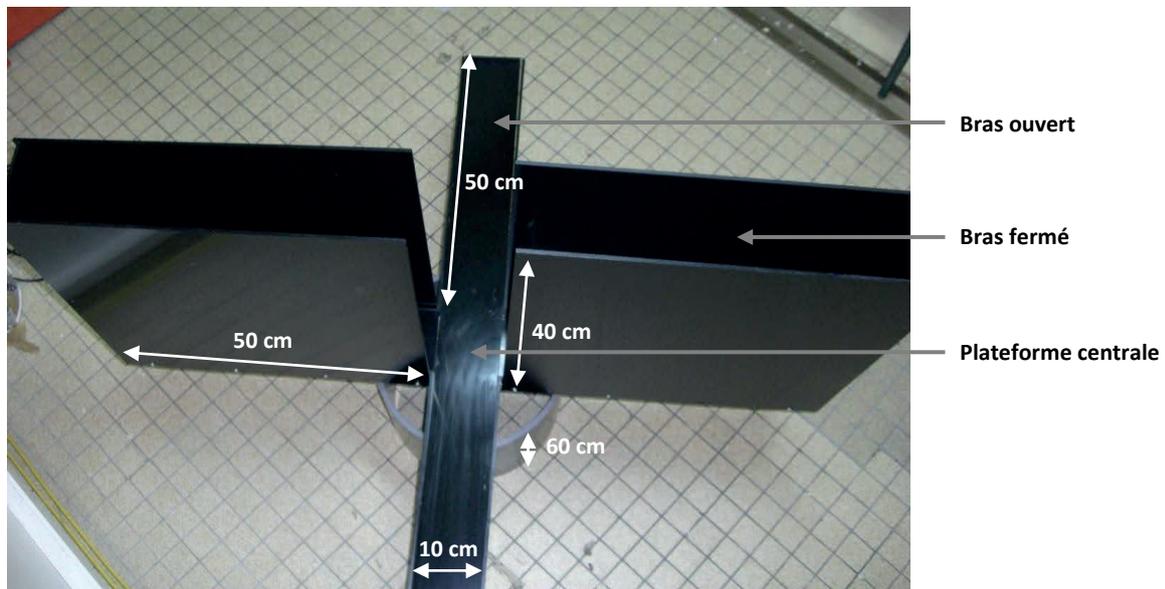


Figure 27 : Dispositif du labyrinthe en croix surélevé

grillagé (Imétronic, Pessac, France) (**Figure 26**). Quatre cellules photosensibles, disposées à 3,5 cm du sol du dispositif et espacées de manière régulière, permettent de mesurer l'activité horizontale des animaux. Chaque interruption du faisceau émis par ces cellules lors du passage de l'animal est détectée et enregistrée via une interface électronique connectée à un ordinateur possédant le logiciel fourni avec le dispositif (Imétronic, Pessac, France). L'activité locomotrice est exprimée en nombre de quarts de tour effectués par l'animal. Le dispositif permet de passer 8 animaux simultanément.

L'animal est placé dans le corridor et testé pendant une période de 1h, durant laquelle il peut explorer librement le dispositif. L'activité est mesurée par tranche de 10 minutes. Entre chaque passage, le dispositif est rincé à l'éthanol afin d'éliminer les odeurs des congénères.

### ***III.2. Réponse émotionnelle***

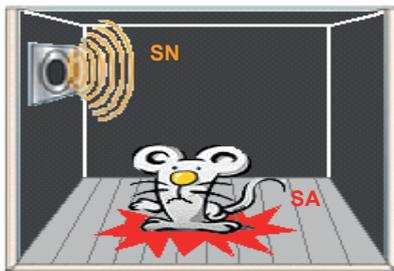
#### ***III.2.1 Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze)***

Le labyrinthe en croix surélevé est un test de comportement communément utilisé afin de quantifier le niveau d'anxiété des animaux (Walf et Frye, 2007). Disposé à 60cm du sol, ce dispositif en PVC noir comprend 2 bras ouverts et 2 bras fermés de taille égale (longueur : 50 cm ; largeur : 10 cm), réunis au niveau d'une plateforme centrale carrée (10 x 10 cm). Les bras fermés disposent de murs noirs de 40 cm de haut. Sur ce dispositif, différentes zones sont définies comme le montre la **Figure 27**. Le temps passé dans les bras ouverts permet de définir le niveau d'anxiété de l'animal, car ce temps est augmenté lors de la prise d'anxiolytique (Walf et Frye, 2007).

L'animal est placé au centre du dispositif face à un bras fermé et peut librement explorer le labyrinthe pendant 5 minutes. Le test est enregistré grâce au système de Video-Tracking ANY-maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA) et l'expérimentateur se trouve à l'extérieur de la pièce de test afin de ne pas influencer le comportement du rat. Entre chaque passage, le dispositif est nettoyé à l'éthanol (70%), afin d'éliminer l'odeur des congénères. Trois paramètres sont relevés à l'aide du logiciel ANY-maze™ : (1) le nombre d'entrées dans les bras fermés, (2) l'intérêt des rats pour les bras ouverts mesurés par le

### CONDITIONNEMENT

Association d'un stimulus neutre (son) à un stimulus aversif (choc électrique)

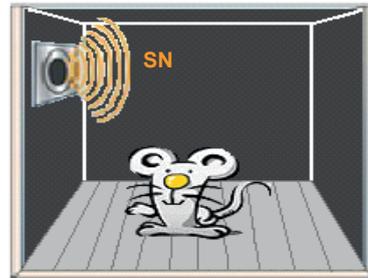


5 SN / SA

24h

### EXTINCTION

Atténuation progressive de la peur conditionnée



15 SN + 10 SN

**Figure 28 : Protocole conditionnement et d'extinction d'une peur conditionnée**

SN : stimulus neutre (son de 80dB, 2kHz, 20sec) ;

SA : stimulus aversif (choc électrique de 0,6 mA, 0,5 sec)

nombre d'entrées dans les bras ouverts par les 2 pattes antérieures, (3) le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts

### III.2.2 Test de préférence au sucrose

Le test de préférence au sucrose permet d'évaluer le statut hédonique des animaux. Le protocole utilisé est une adaptation de celui utilisé par Willner *et al*, (1987). Il consiste à mesurer la consommation d'une solution de sucrose 1%, provoquant un renforcement positif chez le rat (Hajnal *et al*, 2004), suite à un stress de privation d'eau (Vazquez *et al*, 2005).

Placés en cage individuelle, les rats sont habitués à boire dans deux bouteilles d'eau pendant deux jours. Ils sont ensuite privés d'eau pendant 20 heures. A l'issue de ce stress, les animaux ont accès pendant 24 heures à une bouteille d'eau et à une bouteille de sucrose (1%) ; les quantités de fluide consommées sont mesurées en différenciant les 12 premières heures (période jour) et les 12 dernières (période nuit, d'activité des animaux). La préférence au sucrose est exprimée en pourcentage de sucrose consommé par rapport à la totalité de liquide consommée.

### III.2.3 Peur conditionnée à un son

Ce test permet de tester la capacité d'acquiescer et d'éteindre une réponse de peur conditionnée. Il s'effectue dans une chambre (20x24x23 cm) à parois noires, équipée d'un haut-parleur. Le sol est constitué de barreaux pouvant être électrifié grâce à un courant électrique. La chambre est placée dans une enceinte insonorisée et éclairée par une lampe de 40 Watts. Le test est réalisé en 2 étapes : une phase de conditionnement et une phase d'extinction (**Figure 28**). Le dispositif est nettoyé à l'alcool entre chaque passage, afin d'éliminer l'odeur des congénères.

Lors du conditionnement, l'animal reçoit 5 associations entre un stimulus neutre constitué d'un son, suivi immédiatement d'un stimulus aversif, le choc électrique. Le son dure 20 s à une intensité de 80dB (2 kHz) et le choc électrique est généré à une intensité de 0,8 mA. Les 5 associations sont réalisées à intervalles variables (entre 80 et 160 secondes). Le rat, ne pouvant s'échapper de la situation de stress (choc électrique), va adopter un comportement typique de « freezing » mesuré à l'aide du logiciel de Video-Tracking ANY-

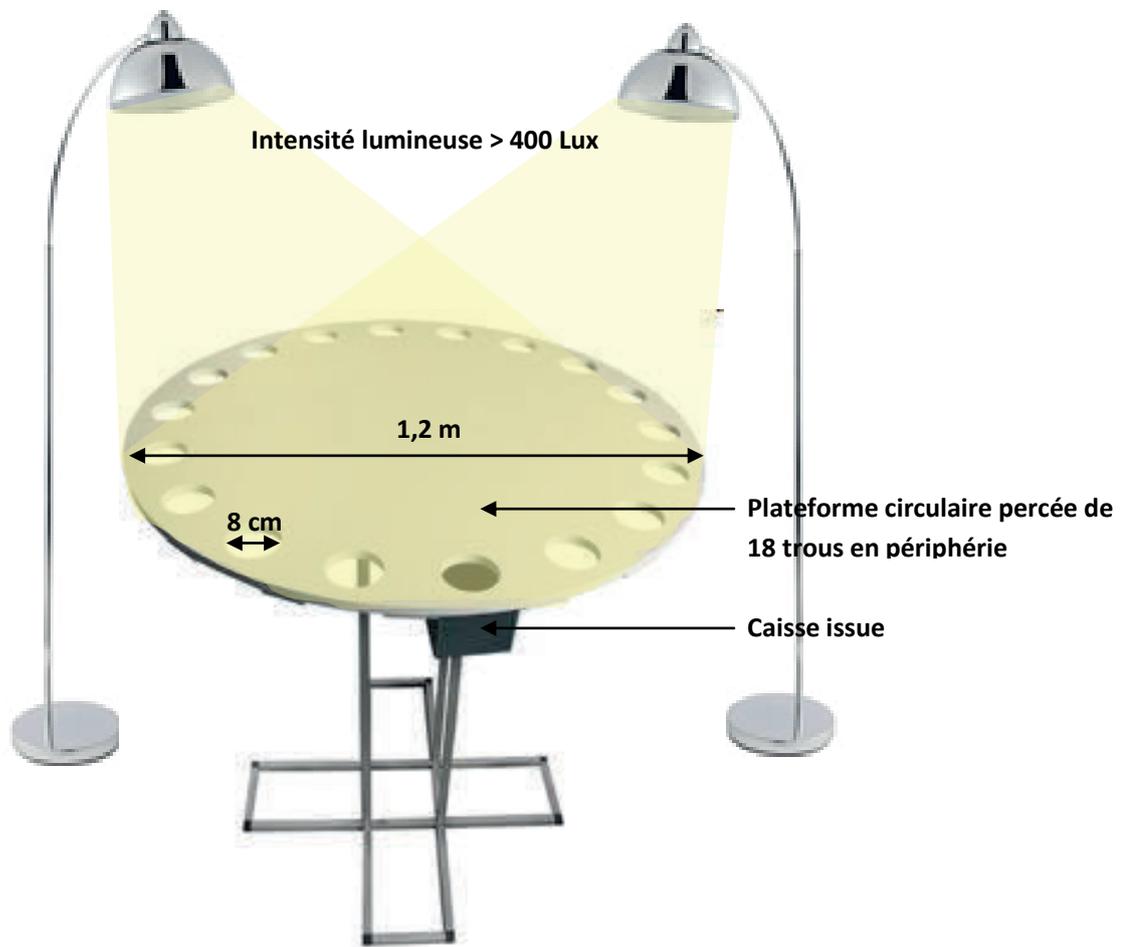


Figure 29 : Dispositif du labyrinthe de Barnes

Maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA) pendant les 20 secondes de chaque son. Le « freezing » est une réaction de peur caractérisée par l'immobilité totale de l'animal en dehors des mouvements respiratoires (Blanchard et Blanchard, 1969 ; Bolles et Collier, 1976).

Une semaine après le conditionnement, les animaux sont soumis à la phase d'extinction, pendant 2 jours consécutifs. Le rat est placé dans une nouvelle chambre noire dont le sol est constitué de barreaux. Il est soumis à une série de sons (15 sons le 1<sup>er</sup> jour de l'extinction et 10 sons le 2<sup>nd</sup> jour) sans choc électrique associé. Les sons, de même intensité et de même durée que lors du conditionnement, sont émis à intervalle variable (entre 80 et 160 secondes). Le temps de « freezing » est à nouveau mesuré à l'aide du logiciel de Video-Tracking ANY-Maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA) pendant les 20 secondes de chaque son.

#### III.2.4 Réaction au sursaut

La chambre de réaction au sursaut consiste en une boîte opaque insonorisée et ventilée, dans laquelle est placée une boîte rectangulaire en Plexiglas transparent (16 cm de large, 29 cm de long et 18 cm de haut) permettant à l'animal de bouger. Cette boîte est elle-même fixée à une armature sous laquelle est placée une unité piezoélectrique capable d'enregistrer les sursauts de l'animal et de convertir ce signal mécanique en signal électrique. La chambre de test est également équipée d'un haut-parleur permettant de délivrer des sons calibrés à l'aide d'un sonomètre. Lors du test, l'animal, préalablement pesé, est placé dans le cylindre de Plexiglas. Le sursaut à 120dB, correspondant à la moyenne des sursauts observés lors de la série de 10 sons forts d'une intensité de 120dB, est mesuré.

### **III.3. Apprentissage : Labyrinthe de Barnes**

#### III.3.1 Principe général

Ce test permet d'apprécier les capacités d'apprentissage et de mémorisation d'informations spatiales des animaux. Le dispositif est constitué d'une plateforme circulaire en bois (diamètre de 1,2m), fortement éclairée et surélevée de 1m, à la périphérie de laquelle se situent 18 trous de diamètre égal (8 cm), séparés d'une distance constante. Un de ces trous est relié à une caisse dans laquelle l'animal peut se réfugier (**Figure 29**). Le

principe est le suivant : la plateforme fortement éclairée (lumière d'intensité supérieure à 1000 Lux) constitue une situation aversive. Pour y échapper, le rat doit apprendre, en utilisant des indices spatiaux, la localisation du trou donnant accès à la caisse. Entre chaque passage, le labyrinthe est nettoyé à l'alcool (70%) et pivoté de 120° afin d'éliminer les repères olfactifs donnés par les autres congénères.

Avant toute expérimentation, les animaux sont soumis à une séance d'habituation pendant laquelle les animaux sont libres d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes afin de se familiariser avec ce nouvel environnement.

### III.3.2 Acquisition

Lors de la phase d'acquisition, l'emplacement de l'issue est déterminé et reste identique au cours des différents essais. Les rats effectuent 2 essais d'apprentissage par jour (séparés de 5 heures) pendant 8 jours consécutifs, en répartissant de manière aléatoire les passages des animaux des différents groupes. Le rat est placé au centre de la plateforme et explore librement le labyrinthe. Lorsque le rat entre dans le trou donnant accès à la caisse, il reste dans cette caisse pendant 1 minute avant d'être remis dans sa cage d'hébergement. Si le rat n'a pas rejoint le trou donnant accès à la caisse au terme de 5 minutes, le test est arrêté et l'animal est guidé vers le trou. Le test est enregistré grâce au système de Video-Tracking ANY-maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA).

Deux paramètres sont analysés : (1) la latence nécessaire à l'animal pour rejoindre le trou donnant accès à la caisse, (2) le nombre d'erreurs effectuées, c'est-à-dire le nombre de visites aux trous non reliés à la caisse (un trou est considéré comme visité lorsque le rat y passe la tête).

### III.3.3 Rétention

Une semaine après la fin de la phase d'acquisition, la rétention à long terme des animaux est évaluée lors de 2 tests successifs, enregistrés grâce au système de Video-Tracking ANY-maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA).

Lors du premier essai utilisant les mêmes conditions que la phase d'acquisition, deux paramètres sont analysés : (1) le temps nécessaire à l'animal pour rejoindre le trou donnant

accès à la caisse, (2) le nombre d'erreurs effectuées, c'est-à-dire le nombre de visites aux trous non reliés à la caisse (un trou est considéré comme visité lorsque le rat y passe la tête).

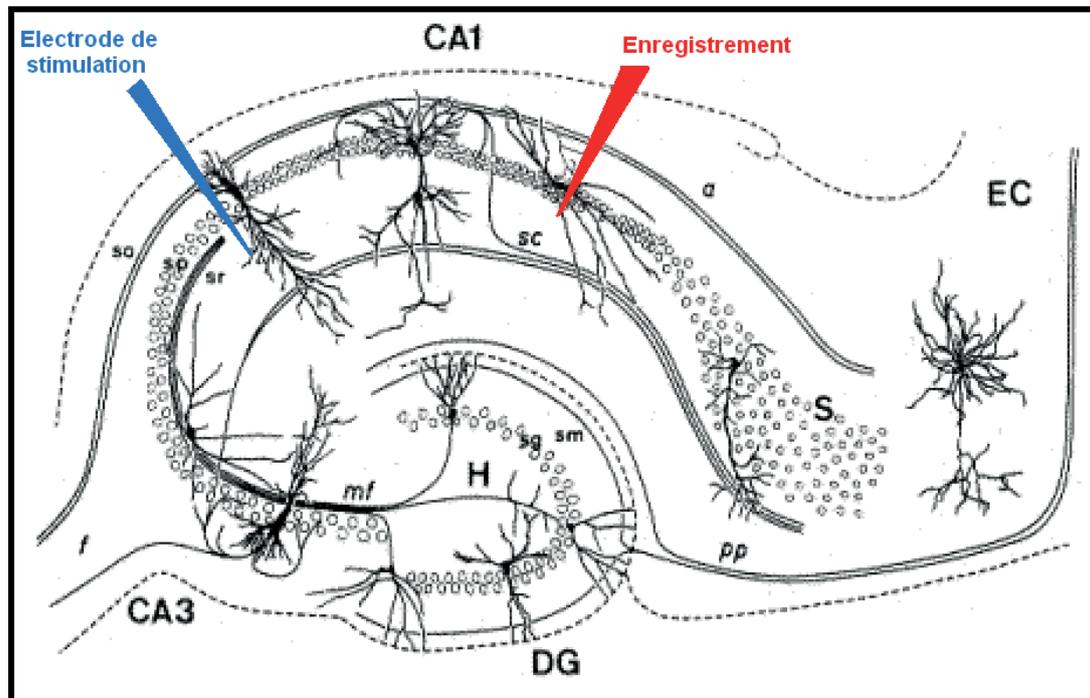
Lors du second essai, la rétention mnésique est évaluée en observant le comportement d'un rat sur la plateforme dont on a retiré la caisse d'issue. L'animal explore librement le labyrinthe pendant 1 minute. Trois paramètres sont analysés : (1) le temps nécessaire à l'animal pour rejoindre l'emplacement de l'ancienne issue, (2) le nombre de visites totales effectuées à l'emplacement de l'ancienne issue (3) le temps passé dans le quart du labyrinthe contenant l'ancienne issue. Ce protocole est équivalent à celui pratiqué pour quantifier la rétention dans le test de la piscine de Morris.

#### III.3.4 Flexibilité

Lors de la phase de flexibilité, l'emplacement du trou donnant accès à la caisse est indiqué par un indice (le trou menant à l'issue est cerclé d'un anneau en PVC gris) et change d'emplacement à chaque essai. Les rats effectuent 2 essais par jour pendant 7 jours consécutifs, en répartissant de manière aléatoire les passages des animaux des différents groupes.

Comme pour la phase d'acquisition, le rat est placé au centre du dispositif et peut explorer le labyrinthe librement. Le test, enregistré grâce au système de Video-Tracking ANY-maze™ (Stoelting Co, Wood Dale, USA), prend fin lorsque l'animal est entré entièrement dans l'issue ou à la fin des 5 minutes maximum.

Deux paramètres sont analysés : (1) le temps nécessaire à l'animal pour rejoindre l'issue, (2) le nombre d'erreurs effectuées, c'est-à-dire le nombre de visites aux trous non reliés à l'issue.



**Figure 30 : Mise en place des électrodes au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe pour les mesures électrophysiologiques**

DG = Gyrus Denté ; CA = Corne d'Ammon ; H = hile ; EC = Cortex Entorhinal ; S = subiculum ; sm = stratum moleculare ; mf = fibres moussues ; sg = stratum granulosum ; sr = stratum radiatum ; so = stratum oriens ; pp = voie perforante ; sp = stratum pyramidale ; sc = collatérales de Schaeffer

## **IV. Mesures électrophysiologiques**

Les mesures électrophysiologiques ont été réalisées en collaboration avec Brigitte Potier et Jean-Marie Billard (Centre de Psychiatrie et de Neurosciences, INSERM U894 Hôpital Sainte-Anne, Paris)

### ***IV.1. Préparation des tranches d'hippocampe***

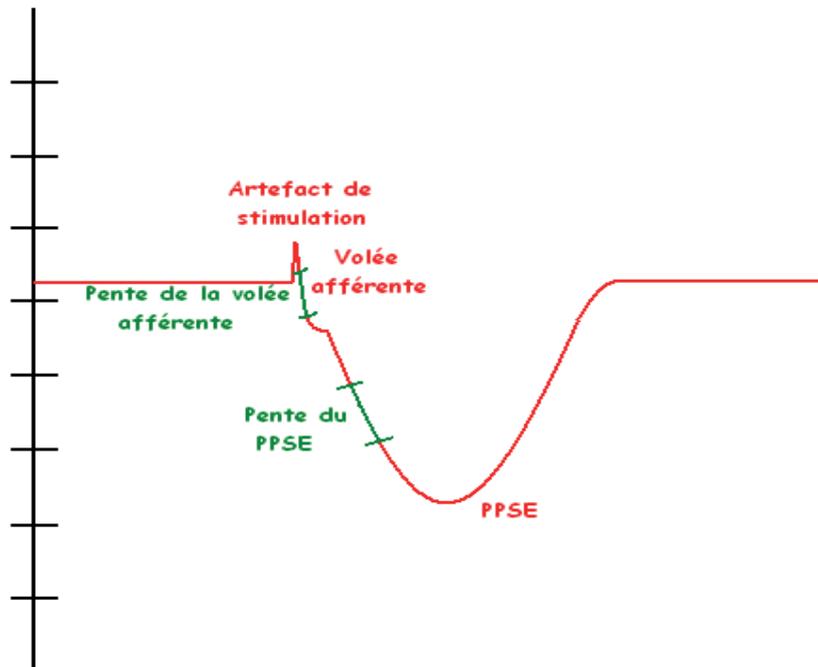
#### **IV.1.1 Dissection**

Le rat est anesthésié à l'halothane (agent anesthésique volatil), puis sacrifié par décapitation. Le cerveau est rapidement isolé et placé dans du tampon Krebs (NaCl 124 mM ; KCl 3,5 mM ; MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 26,2 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; Glucose 11 mM) glacé et oxygéné (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). Ce tampon constitue un milieu cérébrospinal artificiel. L'hippocampe est disséqué dans le tampon glacé puis placé sur un « Chopper » afin d'être coupé en tranches de 400 µm d'épaisseur dans le plan frontal. Les tranches d'hippocampe sont placées dans du tampon Krebs à 30°C et constamment oxygénées pendant au moins 1h avant utilisation, afin de récupérer leurs fonctions biologiques interrompues par le froid (en particulier la réactivation des pompes membranaires telles que la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>).

#### **IV.1.2 Mise en place des électrodes**

La tranche analysée est placée dans une chambre d'enregistrement, constamment perfusée avec un tampon Krebs oxygéné. Elle est maintenue entre 2 filets de nylon, en prenant soin de placer la zone de stimulation et celle d'enregistrement au niveau de la même maille. Les enregistrements sont effectués à température ambiante (26°C).

L'électrode de stimulation (électrode bipolaire) est placée dans le stratum radiatum, où se trouvent les collatérales de Schaeffer et les fibres commissurales, qui constituent les fibres afférentes de l'aire CA1. L'enregistrement est réalisé de manière extracellulaire et s'effectue à l'aide d'une micropipette remplie de NaCl (2 M), placée au niveau des dendrites apicales des neurones du champ CA1 (**Figure 30**).



**Figure 31 : Réponse enregistrée suite à une stimulation électrique unique**

PPSE : Potentiel Post-synaptique Excitateur ; VA : Volée Afférente

Les stimulations électriques générées par l'électrode de stimulation induisent une libération de glutamate de la part des fibres afférentes. Ce glutamate, en agissant au niveau des récepteurs post-synaptiques, va induire une dépolarisation membranaire, se traduisant par la production d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). Ce potentiel est également appelé « potentiel de champ » car il résulte de l'activation synaptique d'un grand nombre de cellules par la stimulation. En amont de ce potentiel de champ, apparaît une petite déflexion négative appelée « volée afférente » (**Figure 31**), proportionnelle à la quantité de fibres stimulées.

## ***IV.2. Transmission synaptique basale***

### ***IV.2.1 Courbe intensité-réponse (Input-Output)***

Le but de cette expérience est de caractériser l'efficacité de la transmission synaptique. Pour cela, on mesure la pente des PPSEs obtenus en réponse à des stimuli d'intensité croissante. L'électrode de stimulation envoie un choc toutes les 10 secondes dont on fait varier l'intensité entre 100 et 1000  $\mu\text{A}$  maximum. Les résultats sont exprimés par la moyenne de 3 réponses à 3 chocs consécutifs de même intensité. Ils sont représentés sous la forme d'une courbe donnant, pour une intensité donnée (en  $\mu\text{A}$ ), le rapport entre la pente du PPSE (exprimée en V/s) et la pente de la volée afférente VA (exprimée en V/s) (**Figure 31**).

### ***IV.2.2 Paired-Pulse Facilitation (PPF)***

Le but de ce protocole est de mettre en évidence des modulations de la libération présynaptique de glutamate. Pour cela, on applique 2 chocs de stimulation d'intensité égale séparés de 40ms, générant chacun un PPSE. Dans l'hippocampe, ce protocole engendre une facilitation du 2<sup>nd</sup> PPSE, qui est plus grand que le 1<sup>er</sup>. En effet, lors de la stimulation, il y a une dépolarisation de la zone présynaptique et une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , qui va participer à la libération de glutamate. Si un 2<sup>nd</sup> choc est appliqué dans un intervalle de temps inférieur à 100 ms après le 1<sup>er</sup>, la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  n'a pas eu le temps de revenir à son état basal et la nouvelle entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  vient alors s'ajouter au  $\text{Ca}^{2+}$  résiduel, générant une plus forte libération de glutamate et donc une amplification du 2<sup>nd</sup> PPSE (facilitation de la réponse). Les résultats sont exprimés par le ratio de la pente de la réponse au 2<sup>nd</sup> PPSE sur la pente du 1<sup>er</sup> PPSE.

### ***IV.3. Plasticité synaptique***

Pour les mesures de plasticité, une ligne de base de la transmission synaptique est enregistrée pendant 15 minutes environ, à une intensité fixe générant un PPSE d'environ 30% de la réponse maximale (cette intensité est déterminée en se basant sur la courbe intensité-réponse) et à une fréquence de 0,033Hz (soit un choc toutes les 10s).

#### **IV.3.1 Potentialisation à Long Terme (LTP)**

Après établissement de la ligne de base, la LTP est obtenue en appliquant une stimulation à haute fréquence ou téтанus (2 chocs de 100 Hz pendant 1 seconde, espacés de 20s). Immédiatement après le téтанus, les stimulations à la fréquence de 0,033 Hz sont reprises et on observe alors une potentialisation post-tétanique (PPT) des PPSE, dont on va suivre l'évolution pendant une heure. La LTP est exprimée en pourcentage d'augmentation des réponses, comparées à la ligne de base.

#### **IV.3.2 Dépression à long terme (LTD)**

Après établissement de la ligne de base, la LTD est obtenue en appliquant une stimulation à basse fréquence (1 Hz durant 15 minutes, soit 900 chocs au total). Immédiatement après cette stimulation, les stimulations à la fréquence de 0,033 Hz sont reprises et on observe alors une dépression des PPSEs, dont on va suivre l'évolution pendant une heure. La LTD est exprimée en pourcentage de diminution des PPSEs, comparée à la ligne de base.

## **V. Tagman Low Density Array (TLDA)**

### ***V.1. Récupération des échantillons et extraction des ARN totaux***

Les CA1 prélevés sont placés dans du RNA later. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les ARN totaux sont extraits des tissus en utilisant le kit d'isolation mirVana miRNA (Ambion). Les CA1 sont décongelés puis repris dans un tube conique de 1,5mL avec 300µL de Lysis/Binding Buffer. Le tissu est ensuite broyé à l'aide d'un potter manuel « Kontes » avec un piston en téflon-inox (2x10 s sur glace). 1/10<sup>e</sup> de volume (soit 30µL) de miRNA homogenate additive est ajouté à l'homogénat. Après agitation au vortex, le mélange est laissé au repos 10 minutes sur glace. Un volume (~330µL) d'acide-phenol:chloroforme est ajouté. Les échantillons sont ensuite agités au vortex puis

centrifugés 5 min à 10000g à température ambiante. A l'issue de la centrifugation, la phase supérieure est prélevée et on y ajoute 1,25 volume d'éthanol absolu. Le mélange est placé sur une colonne d'extraction puis centrifugé pendant 15s à 10000g à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois avec différents tampons de rinçages suivis de centrifugation de 10 s à 10000g. Les ARN totaux retenus sur la colonne sont ensuite élués avec 100µL d'eau exemptée de RNases, puis conservés à -80°C.

La quantité d'ARN totaux présents dans les différents échantillons est estimée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biophotomètre, Eppendorf SARL, France) permettant de mesurer la densité optique (DO). Le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  permet d'évaluer la contamination protéique ; il doit être compris entre 1,8 et 2,2 pour une préparation de bonne qualité. Le ratio  $DO_{260}/DO_{230}$  permet quant à lui d'évaluer la contamination par les molécules organiques ; les échantillons sont considérés de bonne qualité si ce ratio est compris entre 2 et 2,2.

L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse miniaturisée sur puce grâce à un bioanalyseur Agilent 2100. Cette mesure est réalisée à la plateforme de biologie moléculaire PICT du centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas. Après avoir déposé de façon homogène un gel filtré contenant un intercalant de l'ARN fluorescent (dye) dans chacun des puits d'une puce Agilent RNA 6000 Nano, les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dénaturés (70°C pendant 2 minutes) sont déposés sur la puce. Après agitation pendant 1 min, la puce est placée dans le Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent technologies, France) qui va mesurer en temps réel l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention des ARN. Par comparaison des données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) des échantillons avec le marqueur de poids moléculaire connu du logiciel, le RIN de l'échantillon (RNA Integrity Number) est alors calculé. Il permet d'évaluer l'intégrité des ARN ; sa valeur est comprise entre 1 (ARN très dégradé) et 10 (ARN de très bonne qualité). Pour la suite de l'expérimentation, seuls les échantillons ayant un RIN supérieur à 8 sont conservés.

Gènes	N° Genbank	Fonction
Slc1a3 (GLAST)	NM_019225	Transporteurs astrocytaires du glutamate
Slc1a2 (GLT-1)	NM_017215	
	NM_001035233	
Grin2a (NMDA-NR2A)	NM_012573	Récepteurs ionotropiques du glutamate
Grin2b (NMDA-NR2B)	NM_012574	
Gria1 (AMPA GluR1)	NM_031608	
Gria2 (AMPA GluR2)	NM_017261	
	NM_001083811	
Slc17a7 (V-Glut1)	NM_053859	Transporteurs vésiculaires du glutamate
Slc17a6 (V-Glut 2)	NM_053427	
Grm1 (mGluR1)	NM_017011	Récepteurs métabotropiques du glutamate
	NM_001114330	
Grm2 (mGluR2)	NM_001105711	
Grm3 (mGluR3)	NM_001105712	
Grm4 (mGluR4)	NM_022666	
Grm5 (mGluR5)	NM-017012	
Grm6 (mGluR6)	NM_022920	
Grm7 (mGluR7)	NM_031040	
Grm8 (mGluR8)	NM_0222002	
Syp	NM_012664	Marqueurs de l'exocytose
Syt1	NM_001033680	
Vamp2	NM_012663	
Stx1a (Syntaxine 1a)	NM_053788	
Snap25	NM_030991	
Syn1	NM_019133	
	NM_001110782	
GAPDH	NM_017008	Gènes de ménage
18S		
Nr3c1 (GR)	NM_012576	Récepteurs aux glucocorticoïdes
Nr3c2 (MR)	NM_013131	
BDNF	NM_012513	Facteurs de croissance
EGF	NM_012842	
FGF2	NM_019305	
GDNF	NM_019139	
NGF	XM_227525	
PPAR $\alpha$	NM_013196	
PPAR $\gamma$	NM_013124	
	NM_001145366	
	NM_001145367	
PPAR $\delta$	NM_013141	
Pla2g6 (iPLA2)	NM_001005560	Phospholipases A2
Pla2g4a (cPLA2)	NM_133551	
Pla2g2a (sPLA2)	NM_031598	
Ptgs2	NM_017232	Enzymes du métabolisme lipidique
Alox5 (LOX-5)	NM_012822	
Alox 12 (LOX-12)	NM_001105798	
Alox15 (LOX-15)	NM_031010	
GFAP	NM_017009	Marqueurs astrocytaires
Glul (GS)	NM_017073	
S100 $\beta$	NM_013191	
SR (Sérine racémase)	NM-198757	
Vimentine	NM_031140	
MAP2	NM_013066	Autres
Th	NM_012740.3	

**Tableau 4 : Numéro d'accession et principales fonctions des 48 gènes étudiés**

## **V.2. Rétrotranscription**

La rétrotranscription des ARNm correspond à la synthèse d'AND complémentaire simple brin (ADNc) grâce à la reverse transcriptase. Elle est réalisée avec un kit de rétrotranscription (High Capacity cDNA reverse transcription, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Un mélange réactionnel de 50µL (contenant du tampon de rétrotranscription, un mélange de dinucléotides (dNTP), des amorces et l'enzyme reverse transcriptase (50U/µL)) est préparé. Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 2µg d'ARN totaux est pipeté et complété avec de l'eau exempté de RNases pour obtenir un volume final de 50µL. Les 50µL de mélange réactionnel sont ajoutés aux 50µL d'échantillon dilué. La réaction se déroule dans un thermocycleur à 25°C pendant 10 minutes, puis à 37°C pendant 2h. Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

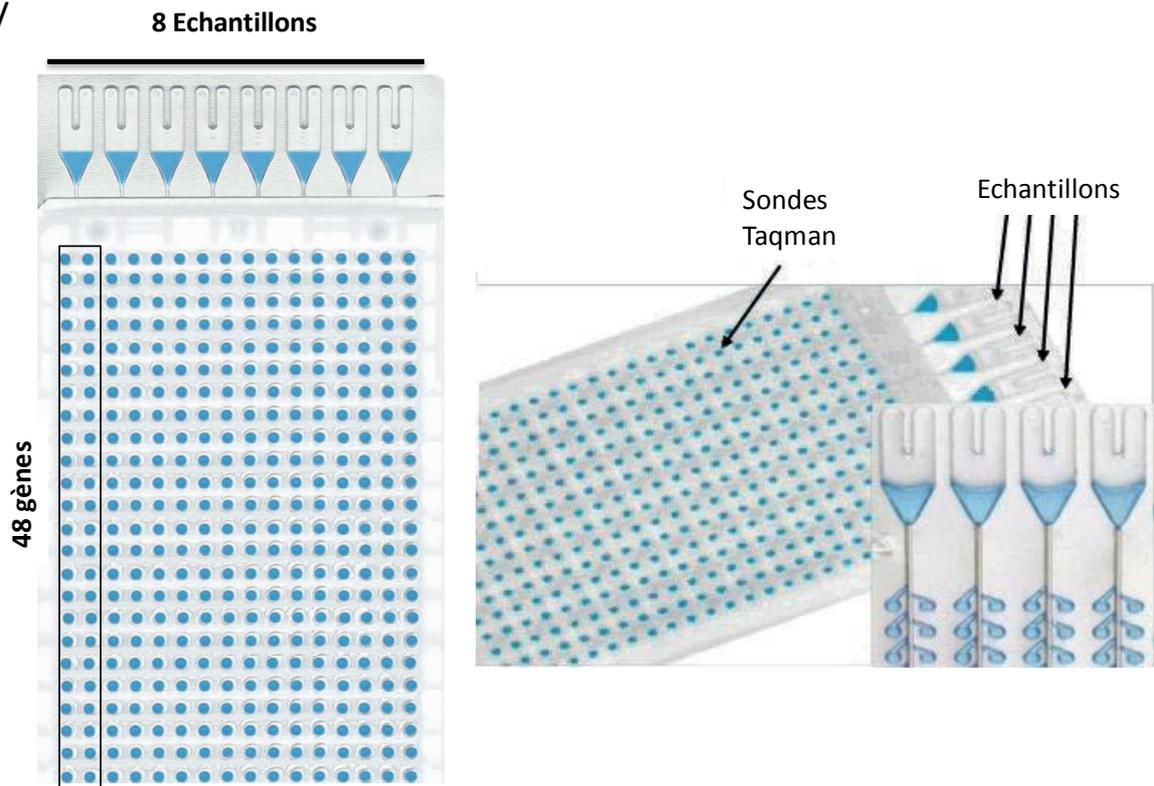
## **V.3. TLDA**

La quantification de nos ARN cibles a été réalisée à l'aide d'une carte microfluidique (Taqman Low-Density Array (TLDA), Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) sur laquelle chaque puits contient un couple d'amorces et une sonde Taqman spécifiques d'un gène d'intérêt. Cette technologie permet ainsi la quantification simultanée de l'expression d'un nombre important de gènes sur plusieurs échantillons. Cette technique est très reproductible car d'une grande sensibilité et spécificité.

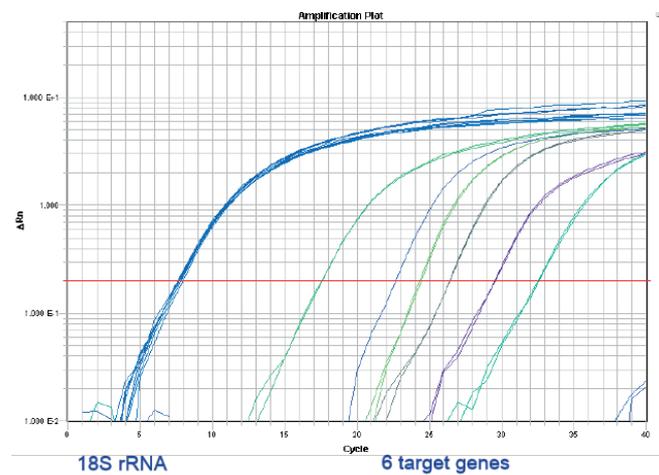
Pour notre étude, nous avons choisi une configuration de cartes permettant de quantifier simultanément 48 gènes impliqués dans la synapse tripartite glutamatergique et dans sa régulation par les AGPI et les corticoïdes, dont 2 gènes de référence (18S et GAPDH) (**Tableau 4**). Les couples d'amorces et de sondes pour chaque gène d'intérêts ont été sélectionnés à partir d'essais préétablis (Taqman Gene Expression Assay, Applied Biosystems) et préchargés dans chacun des puits (**Figure 32**).

La chimie Taqman repose sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique spécifique de la séquence à amplifier, marquée en terminaison 5' par un fluorochrome appelé Reporter (R) et en terminaison 3' par un autre fluorochrome appelé Quencher (Q). La sonde s'hybride entre les 2 amorces après excitation. Le spectre d'émission du reporter chevauchant celui du quencher, l'émission du reporter est absorbée par l'effet quenching de Q. Puis l'élongation des amorces par la Taq-polymerase qui présente une action exonucléasique, va permettre le

A/



B/



**Figure 32: Taqman Low Density Array (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.

clivage de l'extrémité 5' de la sonde et donc la libération de R. Ce dernier va alors émettre un signal fluorescent proportionnel au nombre de produits de PCR formés et permettre ainsi le suivi en temps réel de l'augmentation du nombre de copies polymérisées à chaque cycle.

Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 600ng d'ADNc est prélevé et mélangé à de l'eau exempte de RNases pour obtenir un volume final de 55µL. L'échantillon dilué est ensuite mélangé avec 55µL de Taqman Universal PCR Master Mix et 100µL de ce mélange sont déposés sur les cartes microfluidiques. La carte est centrifugée 2 fois pendant 1 min à 12000 rpm afin de distribuer les échantillons de manière homogène dans tous les puits, puis scellée. Elle est ensuite déposée dans l'appareil à haut débit ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, France). La quantification des ARN par TLDA a été réalisée à la plateforme PICT du centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas. La réaction de qPCR suit le thermocyclage suivant : 2 min à 50°C, puis 10 min à 95°C pour activer la Taq-polymerase, puis 40 cycles composés de 30s à 97°C et de 1 min à 59,7°C.

#### **V.4. Normalisation et analyse des résultats**

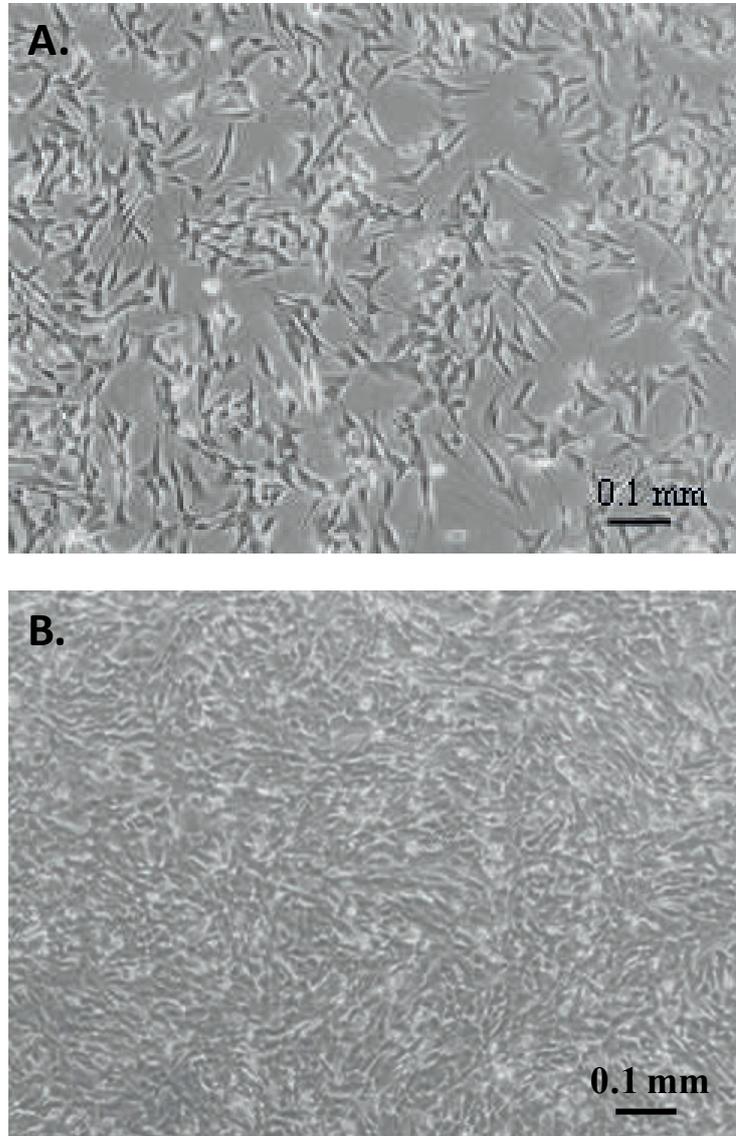
Les données sont collectées à partir du logiciel Applied Biosystems SDS Version 2.1 et analysées par le logiciel RQ Manager Version 1.2 (Applied Biosystems). L'expression relative des ARN est déterminée en utilisant la méthode comparative du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (ou quantification relative normalisée à un calibrateur) (Livak *et al*, 2001).

Basée sur la partie linéaire de l'exponentielle (première partie de la courbe d'amplification), la quantification fait appel au principe du Ct (Cycle Threshold ou cycle seuil) qui correspond au nombre de cycles requis pour que l'émission de fluorescence devienne significativement supérieure au bruit de fond. L'abondance des ADNc des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à celle du gène de référence 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, qui correspond pour la caractérisation des effets du régime aux rats équilibrés non stressés, et pour la caractérisation des effets du stress aux rats non stressés du régime équivalent. L'abondance normalisée par rapport au gène de référence du calibrateur est ramenée à 1. L'expression relative (ou abondance relative) des gènes d'intérêt est calculée avec la formule des  $\Delta\Delta Ct$  :

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



**Figure 33 : Culture de lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y**

- A. Cellules non confluentes, 1 jour après repiquage
- B. Cellules confluentes, 7 jours après repiquage

## Partie 2 : Etude mécanistique sur des modèles *in vitro*

### I. Culture de la lignée de neuroblastomes humains SH-SY5Y

#### ***I.1. Présentation du modèle***

La lignée de neuroblastomes SH-SY5Y est établie à partir de la mise en culture de la lignée SK-N-SH qui a été obtenue à partir d'une biopsie pratiquée chez un enfant atteint d'une tumeur du système nerveux sympathique métastasée dans la moelle osseuse (Biedler *et al*, 1973). Ces cellules présentent des caractéristiques de neurones adrénérgiques. Elles expriment notamment l'enzyme indispensable à la synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase (Pahlman *et al*, 1990), ainsi que des protéines impliquées dans l'exocytose de neurotransmetteurs telles notamment les protéines du complexe SNARE (Goodall *et al*, 1997). De plus, exprimant différents canaux voltage- et ligand-dépendants (Vaughan *et al*, 1995), ces cellules présentent les caractéristiques de cellules excitables. Ainsi, les cellules SH\_SY5Y sont capables de libérer de la NA en condition basale et en condition stimulée suite à une dépolarisation membranaire (KCl) ou une activation des récepteurs muscariniques (Carbachol) (Ou *et al*, 1999 ; Vaughan *et al*, 1993). De par ces caractéristiques, les cellules SH\_SY5Y constituent donc un modèle d'étude de la libération de neurotransmetteur.

#### ***I.2. Conditions de culture***

La lignée cellulaire de neuroblastomes humains de type SH-SY5Y est fournie par la Collection Européenne de Culture Cellulaire Animale (Porton Down, Salisbury, United Kingdom). Le milieu de culture, dit complet, est composé à 50% de Minimum Essential Medium Eagle (MEME, Sigma, **Annexe 1**) et à 50% de Ham's Nutrient Mixture F-12 (HAM-F12, Sigma, **Annexe 1**), supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Gilbo, **Annexe 2**) préalablement décomplémenté à 52 °C pendant 1 heure, de pénicilline 50 IU / mL, de streptomycine 50 µg / mL et de L-Glutamine 2 mM (Gilco BRL, Cergy Pontoise, France). Les cellules, adhérentes au support, sont cultivées dans 10 mL de milieu complet dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> à bouchon aéré dans un incubateur maintenu à 37 °C et à 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Après comptage sur cellules de Malassez, elles sontensemencées à une densité de  $1,4 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et le milieu est renouvelé après 24 h et 96 h de culture. Lorsque les cellules sont à confluence, soit après 7 jours de culture, elles sont repiquées et réensemencées à la concentration initiale afin d'assurer l'entretien de la lignée (**Figure 33**).

	Tampon A	Tampon KCl
NaCl	135 Mm	35 mM
KCl	5 mM	105 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,6 mM	0,6 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5 mM	2,5 mM
HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique)	10 mM	10 mM
D-glucose	6 mM	6 mM
Acide ascorbique	0,2 mM	0,2 mM
Pargyline	0,2 mM	0,2 mM
DMI	-	1 μM

**Tableau 5 : Composition des tampons utilisés au cours des mesures de captage et libération de [<sup>3</sup>H]-NA par les cellules SH\_SY5Y**

**Tampon C** = Tampon A + [<sup>3</sup>H]-NA 40 nM

**Tampon D** = Tampon A + DMI 1 μM

**Tampon E** = Tampon A + DMI 1 μM + TPA 100 nM

**Tampon Carbachol** = Tampon D + Carbachol 1 mM

### 1.2.1 Etude des effets d'une supplémentation en AGPI

Les cellules sontensemencées dans un milieu complet à une concentration de  $7 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 6 puits (8,96 cm<sup>2</sup> par puit, TPP). 24h après l'ensemencement, ce milieu est supplémenté en acide docosahéxaénoïque (DHA) ou acide arachidonique (AA) pendant 72 h. Les AGPI sont apportés dans le milieu sous forme de sels de sodium à une concentration de 5, 10, 20, 30, 50 ou 70 µM à partir d'une solution mère à 4 mg/mL (Sigma).

### 1.2.2 Etude des effets des glucocorticoïdes

Afin de mimer une condition de stress, les cellules SH\_SY5Y sont soumises à un traitement à l'hydrocortisone (OH-C), principale hormone du stress humaine. L'hydrocortisone (Sigma) est dissoute dans de l'éthanol (1mg/mL) puis incorporée dans le milieu de culture à la concentration finale de 100 nM.

Les cellules sont exposées pendant 1h ou 24h avant le début de l'expérimentation. L'effet de l'hydrocortisone a été testé en présence ou non des différents AGPI apportés selon le protocole décrit précédemment. Dans cette série d'expérimentation, seules les supplémentations pendant 72h en DHA et AA, à des doses de 30 µM et 70µM, ont été testées.

### **1.3. Estimation du captage de noradrénaline tritiée (<sup>3</sup>H)-NA par les cellules SH\_SY5Y**

Le captage de [<sup>3</sup>H]-NA est estimé sur des cellules non différenciées supplémentées ou non en AGPI pendant 72h. Les cellules sontensemencées à  $7 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 6 puits 96h avant le début de la mesure de captage. Tous les tampons utilisés lors de la mesure de captage sont additionnés de pargyline 0,2 mM (Sigma), qui inhibe la dégradation de la noradrénaline par les monoamines oxydases. La composition des différents tampons utilisés pour la mesure du captage et de la libération de noradrénaline tritiée ([<sup>3</sup>H]-NA) par les cellules SH\_SY5Y est décrite dans le **Tableau 5**.

Après avoir éliminé le milieu de culture et rincé 2 fois les cellules avec 2 mL/puits de tampon A, les cellules sont incubées dans 1 mL de ce tampon A additionné du traceur [<sup>3</sup>H]-NA (levo-[7-<sup>3</sup>H]-Norepinephrine, 16,2Ci/mmol, PerkinElmer, USA) à la concentration finale de 40 nM pendant 1h (temps nécessaire au captage du traceur par les cellules) dans un

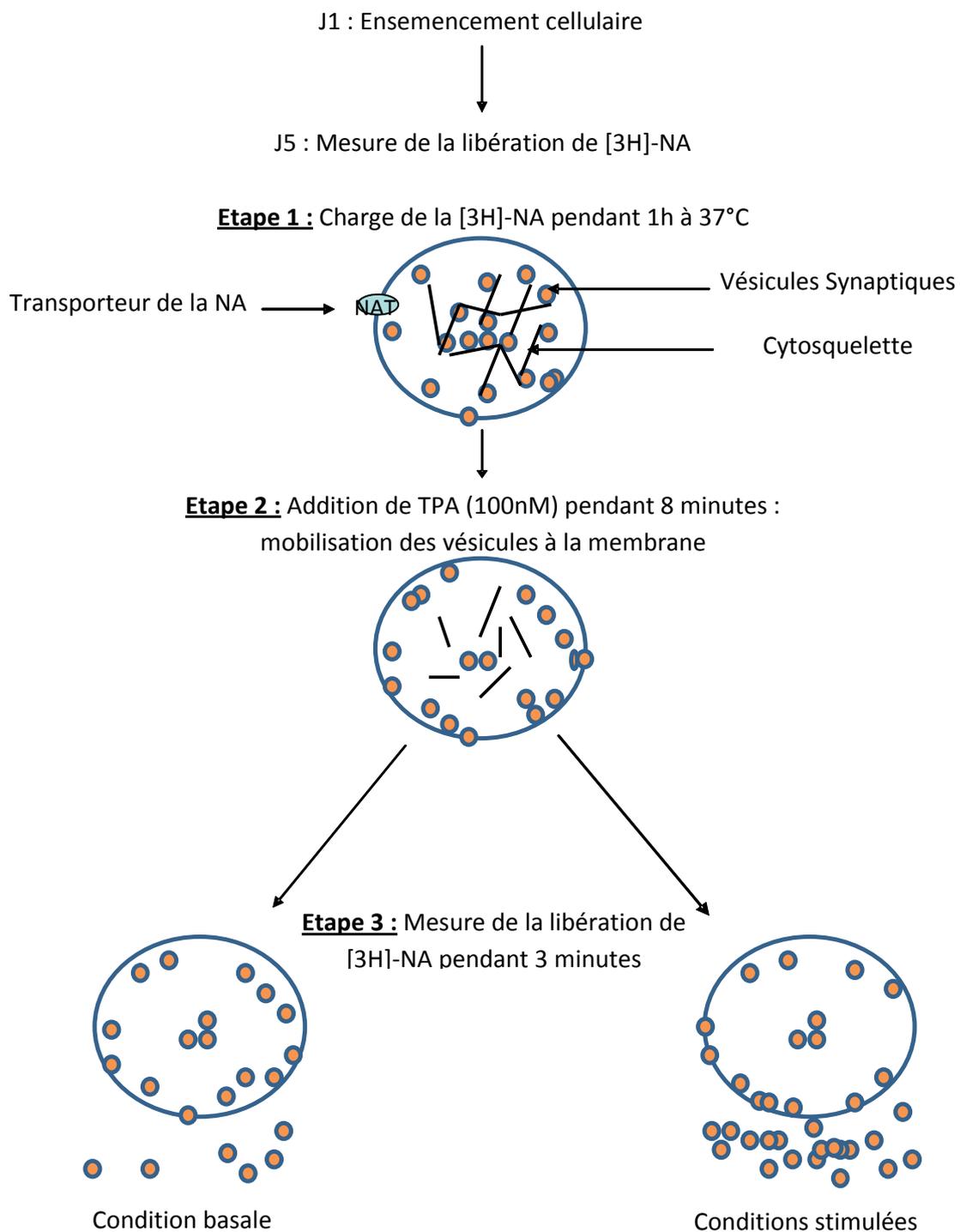


Figure 34 : Protocole général de la mesure de la libération de [<sup>3</sup>H]-NA par les cellules SH\_SY5Y

incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Un échantillon de la solution de traceur [<sup>3</sup>H]-NA (levo-[7-<sup>3</sup>H]-Norepinephrine, 16,2Ci/mmol, PerkinElmer, USA) est prélevé et compté en scintillation liquide beta (Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser, Packard) dans 10 mL de liquide scintillant (Optiphase Hisafe2, PerkinElmer), permettant ainsi de connaître la quantité totale de radioactivité mise au contact des cellules. La quantité de radioactivité captée par les cellules est estimée comme étant la somme de la radioactivité contenue dans le surnageant et dans les cellules à l'issue de la mesure de libération de NA. Le captage est alors calculé de la manière suivante : (Somme de la radioactivité contenue dans le surnageant et les cellules à l'issue de la mesure de libération / la radioactivité totale mise au contact des cellules) x 100.

Le captage a été estimé sur des cellules ayant reçu les différentes suppléments à long terme (72h) en AGPI (DHA ou AA) et/ou les traitements à l'hydrocortisone décrits précédemment.

#### ***1.4. Mesure de la libération de noradrénaline tritiée ([<sup>3</sup>H]-NA) par les cellules SH\_SY5Y***

Les cellules sontensemencées à  $7 \times 10^4$  cellules / cm<sup>2</sup> dans des plaques 6 puits. La mesure de la libération est effectuée au 5<sup>e</sup> jour de culture sur des cellules non différenciées et non confluentes. La composition des différents tampons utilisés est décrite dans le **Tableau 5**.

Le principe de cette mesure est de mimer la libération de neurotransmetteurs contenus dans les vésicules synaptiques, soit en condition basale, correspond à une libération faible et continue, soit après stimulation, entraînant alors une libération massive (**Figure 34**).

Après avoir éliminé le milieu de culture et rincé 2 fois les cellules avec 2 mL/puits de tampon A, les cellules sont incubées dans 1 mL de ce tampon A additionné du traceur [<sup>3</sup>H]-NA (levo-[7-<sup>3</sup>H]-Norepinephrine, 16,2Ci/mmol, PerkinElmer, USA) à la concentration finale de 40 nM pendant 1h dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont rincées 2 fois avec 3 mL de tampon D contenant de la désipramine (DMI, Sigma) 1 µM, inhibant la recapture de NA par blocage des transporteurs, puis traitées 8 minutes avec le tampon E contenant du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) 100 nM, activateur de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC permet

la dissociation du réseau de protéines du cytosquelette et ainsi la mobilisation des vésicules contenant la NA vers la membrane plasmique. Les cellules sont ensuite mises en contact avec le tampon D (contrôle) permettant la libération basale de NA ou avec un tampon stimulant la libération de NA tel que le tampon KCl 105 mM (qui provoque une dépolarisation de la membrane) ou le tampon Carbachol 1 mM (ou carbamylcholine, agoniste des récepteurs muscariniques) (Vaughan *et al*, 1993). Le tampon riche en KCl va stimuler la libération de noradrénaline en provoquant une dépolarisation de la membrane, tandis que le carbachol va activer les voies de signalisation associée aux récepteurs muscariniques couplés à des protéines G. Le surnageant contenant la NA tritiée libérée est récupéré après 3 minutes et la radioactivité est comptée en scintillation liquide beta (Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser, Packard). Enfin, la radioactivité restante dans les cellules est comptée en scintillation liquide, après lyse des cellules dans 1 mL de NaOH pendant 1h à 37°C. La libération de NA contenue dans le surnageant est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale (somme de radioactivité contenue dans les cellules et dans le surnageant).

## **II. Culture primaire d'astrocytes issus de rats nouveaux nés**

### ***II.1. Culture primaire d'astrocytes***

#### **II.1.1 Mise en culture primaire des astrocytes de rats**

Les astrocytes sont mis en culture à partir de cortex de rats nouveaux nés (moins de 1 jour). Les rats mâles sont décapités et les cerveaux, rapidement isolés, sont placés dans du milieu complet composé de milieu essentiel minimum (MEM, **Annexe 1**) additionné de glucose (7 mM), d'un mélange d'acide aminés (50X), de L-glutamine (100X), de vitamines (100X), d'une solution de pénicilline (100UI/mL)/Streptomycine (100 µg/mL final)/Fingizone (250 pg/mL), de bicarbonate et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). La dissection s'effectue sur glace, sous loupe binoculaire, en conditions stériles, dans une boîte de Pétri contenant quelques gouttes de milieu complet. Les méninges sont éliminés, puis les cortex sont récupérés séparément dans du milieu complet froid.

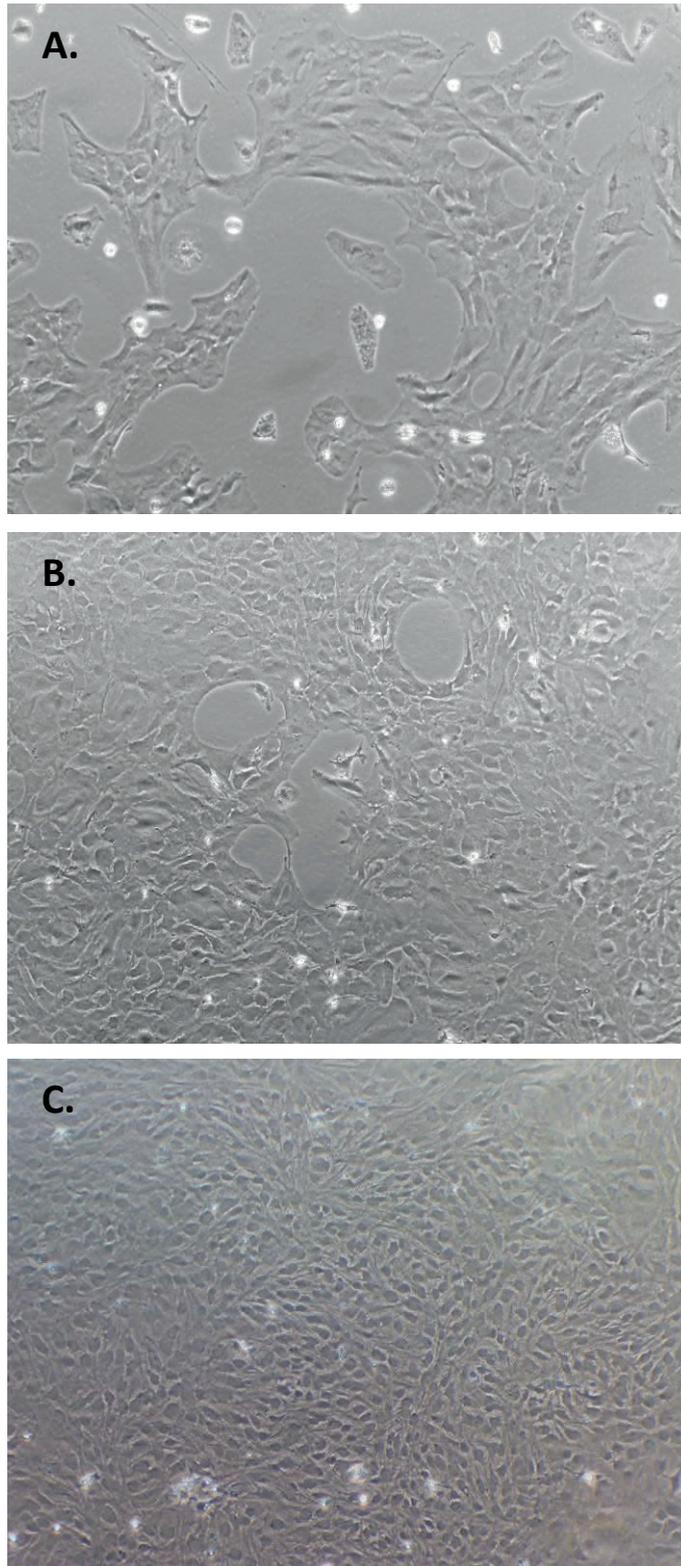
Les structures cérébrales sont dissociées mécaniquement par aspirations successives à la seringue à aiguille de 18G, puis de 20G. Les suspensions cellulaires sont alors passées sur

un filtre de nylon de porosité 40 µm, puis centrifugées à 1800trs/min pendant 8 minutes à 4°C. Les culots sont alors récupérés dans le volume adéquat à l'ensemencement des cellules : volume final de 20 mL par flasque de 75 cm<sup>2</sup> pour les cortex (1 flacon pour 3 cortex) et de 7 mL par flasque de 25 cm<sup>2</sup> pour les hippocampes (1 flacon pour 3 hippocampes). Les flasques à bouchons aérés sont alors placées dans un incubateur maintenu à 37 °C et à 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide.

Le milieu est changé 3 jours après la mise en culture, puis tous les 2-3 jours. Pour éliminer les cellules non astrocytaires (microglie, oligodendrocytes, fibroblastes), les cellules sont soumises à une opération de décollement sélectif dès le stade de pré-confluence (environ 6 jours après l'ensemencement) et ce à chaque changement de milieu. Cette opération repose sur le fait qu'en absence d'ions divalents dans le milieu, la plupart des cellules se décollent alors que les astrocytes restent adhérents au support. Ainsi, les tapis cellulaires sont rincés 3 fois avec une solution saline de Hanks sans calcium ni magnésium (Gibco), puis incubés dans 10 mL de cette solution et agités frénétiquement 10 s/min pendant 4 minutes. Suite à 2 nouveaux rinçages pour éliminer les cellules décollées, le tapis astrocytaire est à nouveau incubé dans du milieu de culture complet MEM + 10% SVF.

### II.1.2 Culture secondaire

Le repiquage s'effectue lorsque les astrocytes sont à confluence (soit environ 15 jours après la mise en culture). Les cellules sont rincées 2 fois par du milieu sans sérum, puis décollées par une incubation de 10 minutes dans l'incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) dans un mélange de trypsine 0,25% et d'EDTA 1mM (Gibco). La suspension cellulaire est alors récupérée dans 1 mL de SVF pur afin de stopper l'action de la trypsine grâce à son activité anti-protéasique et les boîtes sont rincées 3 fois avec du milieu complet MEM + 10% SVF pour récupérer toutes les cellules. La suspension obtenue est centrifugée 2 fois successives à



**Figure 35 : Culture primaire d'astrocytes issus de rats nouveaux-nés**

- A. Cellules non confluentes, 72h après l'ensemencement
- B. Cellules à sous-confluence
- C. Cellules à confluence

1800 trs/min pendant 8 minutes à 4°C, puis le culot est repris dans du milieu complet MEM + 10% SVF.

Après comptage sur cellules de Malassez, les cellules sontensemencées à une densité de 14000 cellules/cm<sup>2</sup> - dans un type de boîte adaptée à l'expérimentation effectuée.

L'évolution de la culture cellulaire d'astrocytes est illustrée dans la **Figure 35**.

### II.1.3 Supplémentation en AGPI et/ou Vitamine E

Les astrocytes sont supplémentés en AGPI (DHA ou AA) et/ou Vitamine E dès 72h après la mise en culture secondaire, puis à chaque renouvellement de milieu (tous les 2 ou 3 jours). Trois groupes de culture sont ainsi mis en place : avec Vitamine E seule, avec DHA et Vitamine E, avec AA et Vitamine E.

L'ensemble des cellules est supplémenté en Vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol, Acros-Organics), un antioxydant qui permet de limiter les processus cytototxiques liés à la peroxydation lipidique. La vitamine E est dissoute dans de l'éthanol (250mg/mL) et diluée dans du sérum de veau foetal (2mg/mL). Puis elle est incorporée dans les milieux de culture à une concentration finale de 30 $\mu$ M.

La supplémentation en AGPI, DHA ou AA, est réalisée sous forme de sel de sodium (Sigma). Les AGPI sont dissous dans du SVF, puis dilués dans du MEM pour obtenir une concentration de 3,3 mg/mL dans du MEM à 10% SVF. Ils sont ensuite incorporés dans du milieu de culture à une concentration finale de 30 $\mu$ M.

### II.1.4 Traitement aux glucocorticoïdes

Afin de mimer une condition de stress, les astrocytes sont soumis à un traitement à la corticostérone, principale hormone du stress chez le rat. La corticostérone (Sigma) est dissoute dans de l'éthanol (1mg/mL) puis dilué dans du milieu de culture (3,5  $\mu$ g/mL). Elle est ensuite incorporée dans le milieu de culture à la concentration de 100 nM.

Lorsque les astrocytes arrivent à confluence, la teneur en sérum du milieu (initialement 10%) est diminuée à 5%, puis 2% et enfin 1%. Le traitement à la corticostérone est réalisé lors du passage à 1% SVF et prolongé pendant 2 ou 6 jours. Pour les mesures de capture de

glutamate, des temps intermédiaires ont été réalisés à 1h (après 2h de déplétion totale en SVF) et 24h.

## *II.2. Mesure de la capture astrocytaire du glutamate*

### II.2.1 Protocole expérimental de mesure de la capture du glutamate

Le principe de cette technique repose sur la mesure de la capture du D-[<sup>3</sup>H]-aspartate, un analogue du glutamate qui présente l'avantage de ne pas être métabolisé par l'astrocyte.

Les astrocytes sont cultivés en boîte 24 puits (surface des puits : 1,86 cm<sup>2</sup>) et sont utilisés à confluence à l'issue des différents traitements aux AGPI (DHA ou AA 30µM en présence de vitamine E 30 µM) et/ou glucocorticoïdes (corticostérone 100 nM).

Pour les traitements courts (inférieur à 24h), les cellules sont préalablement rincées et mises en incubation pendant 2 heures dans du milieu complet sans sérum. Pour les traitements longs (supérieur ou égal à 24h), la mesure de la capture de glutamate se fait directement.

Les cellules sont rincées 2 fois, puis incubées pendant 10 minutes à 37°C dans du tampon Krebs-NaCl préalablement chauffé (HEPES 25 mM ; KCl 4,7 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1,8 mM, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,8 mM ; Glucose 7 mM ; NaCl 120 mM ; pH 7,2). La capture est initiée par l'ajout d'une solution contenant du D-[<sup>3</sup>H]-aspartate (GE HealthCare ; activité spécifique 35Ci/mmol) et du D-aspartate non marqué pour une concentration finale de 105 µM. Après 10 minutes d'incubation, la capture est stoppée par 3 rinçages successifs au tampon Krebs-NaCl froid (4°C) et le tapis cellulaire est solubilisé par incubation avec 250µL de NaOH 0,5M pendant 1h à 37°C.

### II.2.2 Comptage de la radioactivité et analyse des résultats

Pour chaque puits, 200 µL de lysat cellulaire sont prélevés puis placés dans une fiole à scintillation contenant 5 mL de scintillant (Optiphase Hisafe2, PerkinElmer). La radioactivité est ensuite comptée sur un compteur à scintillation liquide beta (Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser, Packard) et les résultats obtenus sont exprimés en nombre de désintégrations par minute (dpm). Afin de caractériser la capture du glutamate, ces résultats

sont rapportés à la quantité totale de protéines des échantillons, dosée par la méthode de Bradford sur le lysat cellulaire restant.

### II.2.3 Dosage de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique permettant de caractériser la quantité totale de protéines des échantillons. Elle est basée sur le changement d'absorbance se manifestant suite au changement de couleur du bleu de Coomassie G-250 après fixation spécifique sur les résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine et phénylalanine des protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue et possède un spectre d'absorption maximal de 595nm, tandis que les formes cationiques (libres) sont rouges et absorbent autour de 465-470nm.

Sur une plaque 96 puits, 10µL d'échantillon sont déposés par puits auxquels sont ajoutés 200µL de réactif de Bradford. L'absorbance des protéines est mesurée par spectrophotométrie à 595nm (lecteur de plaque Spectra Fluor Plus Tecan). Une gamme étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA) (0 à 250 µg/mL) diluée dans une solution de NaOH 0,5M est réalisée en parallèle.

## *II.3. Etude de la morphologie astrocytaire par immunomarquage*

### II.3.1 Préparation de la culture d'astrocytes

Les astrocytes sont cultivés en boîtes 12 puits (surface puits : 3,59cm<sup>2</sup>). Chaque puits contient une lamelle de verre pré-incubée pendant 1h dans de la poly-D-lysine (25µg/mL) puis séchée, créant ainsi un film sur la lamelle permettant l'adhésion des cellules. La morphologie astrocytaire est étudiée à confluence à l'issue des différents traitements aux AGPI et/ou glucocorticoïdes.

### II.3.2 Protocole d'immunomarquage

Entre chaque étape, les cellules sont rincées 3 fois successivement dans du Phosphate Buffer Saline (PBS).

- Fixation : les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde froid à 4% dans du PBS pendant 10 minutes.

Anticorps Primaire			Anticorps Secondaire			Fluorochrome		
Anticorps	Dilution	Fournisseur	Anticorps	Dilution	Fournisseur	Type	Dilution	Fournisseur
Anti-MCR	1/500	Santa Cruz SC-11412	Anti-Lapin- Dylight 649	1/3000	Rockland Tebu-Bio 611- 143-002			
Anti-GR	1/500	Santa Cruz SC-8992	Anti-Lapin- Dylight 649	1/3000	Rockland Tebu-Bio 611- 143-002			
Anti-Ezrine Clone 3C12	1/2000	Sigma E8897	Anti-Souris- biotynilé	1/200	Vector- Biovalley BA- 2001	Streptavidine FITC	1/200	Vector- Biovalley SA- 5001
Anti- PhosphoTyrosine Clone PT-66	1/1000	Sigma P3300	Anti-Souris- biotynilé	1/200	Vector- Biovalley BA- 2001	Streptavidine FITC	1/200	Vector- Biovalley SA- 5001
Anti-GFAP Clone G- A-5 Couplé à Cy3	1/2000	Sigma C9205						
Anti-Phalloïdine- TRITC (Actine)	1/2000	Sigma P1951						

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour l'immunomarquage des astrocytes en culture primaire

- Perméabilisation des membranes : les cellules sont traitées pendant 5 minutes avec un détergent on ionique PBS + Triton 0,25% afin de rendre les membranes perméables aux anticorps.
- Blocage des sites non spécifiques : les sites non spécifiques susceptibles de fixer l'anticorps sont bloqués par incubation de 2h à température ambiante avec une solution de PBS + BSA 2% (Bovine Serum Albumine)
- Blocage des sites biotin-like : avant l'incubation avec l'anticorps primaire, les cellules sont incubées successivement dans de l'avidine puis de la biotine (Blocking-kit Vector). Cette étape permet de limiter le bruit de fond lorsqu'on utilise un anticorps secondaire biotynilé et un marquage streptavidine-FITC. En effet, les protéines extracellulaires possèdent des sites « biotin-like » liant l'avidine. Après blocage des sites à l'avidine, les sites restant libres sont bloqués avec de la biotine.
- Incubation avec l'anticorps primaire : les cellules sont incubées à 4°C sur la nuit en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS + BSA 0,2 %, qui va venir se fixer sur les protéines d'intérêt.
- Incubation avec l'anticorps secondaire : les cellules sont incubées pendant 2h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du PBS + BSA 0,2 %, qui va venir se fixer sur l'anticorps primaire.
- Incubation avec le complexe streptavidine-FITC : lorsque le marquage le nécessite (c'est-à-dire lorsque les anticorps utilisés ne sont pas directement couplés à un fluorochrome), les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante à l'obscurité avec le complexe streptavidine-FITC dilué au 1/200 dans du PBS. Ce complexe se lie sur l'anticorps secondaire au niveau de plusieurs sites, ce qui permet d'amplifier la réponse.

N.B : Les étapes d'incubation avec les anticorps primaire et secondaire ainsi qu'éventuellement avec le complexe streptavidine-FITC sont répétées successivement pour chaque protéine étudiée. Tous les anticorps utilisés sont décrits dans le Tableau 6.

- Marquage des noyaux : les noyaux des cellules sont marqués par une incubation de 10 minutes dans une solution de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) à 0,5 µg/mL dans du PBS. Le DAPI est en effet une molécule fluorescente capable de se fixer sur l'ADN des

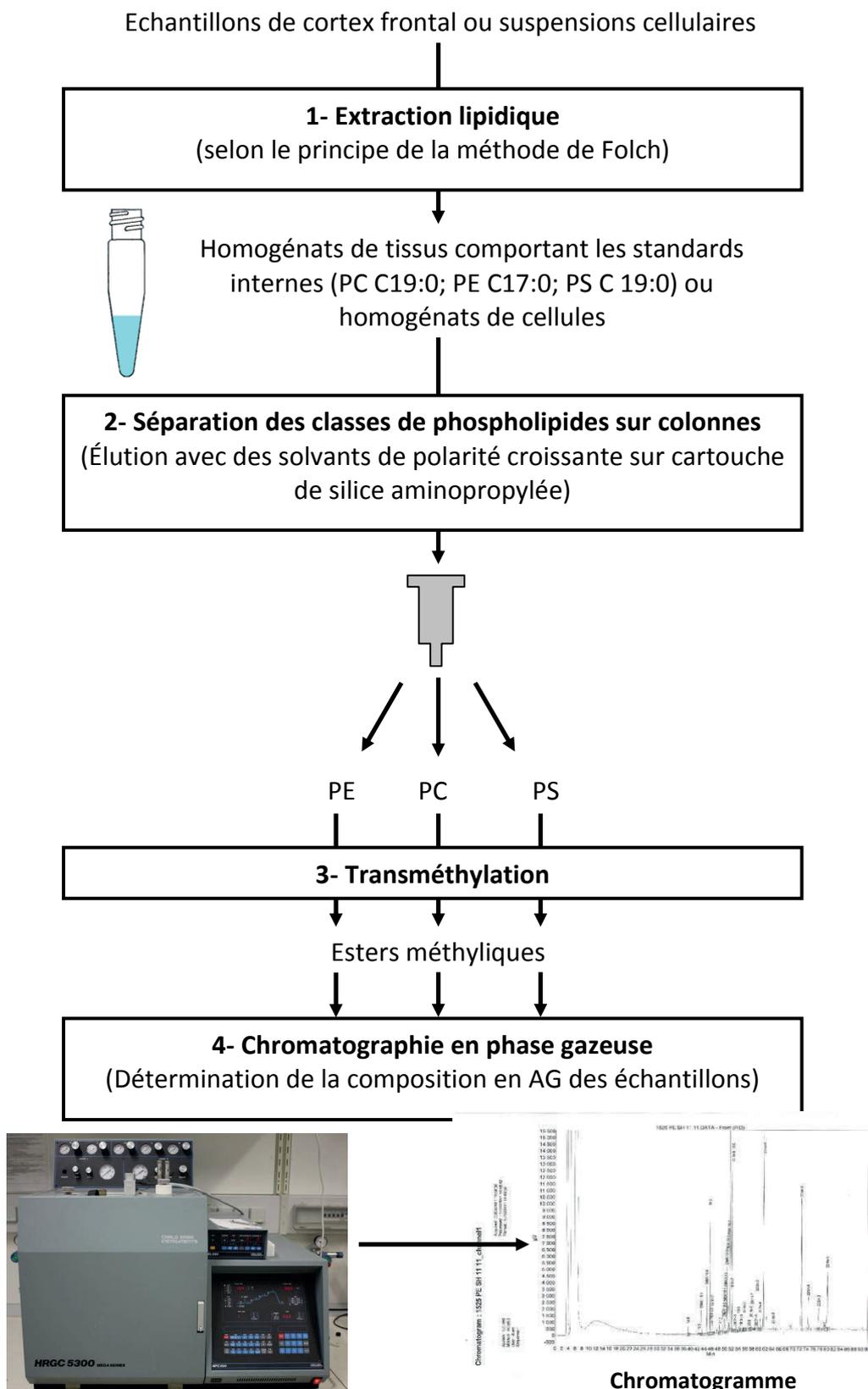


Figure 36 : Principe général de l'analyse de la composition lipidique

cellules. Les astrocytes sont ensuite rincés au PBS puis à l'eau distillée avant le montage sur lame, afin d'éliminer les sels de PBS.

- Montage : les lamelles sont déposées sur une goutte de milieu de montage pour fluorescence (DAKO) sur une lame de verre. Le montage est laissé à sécher toute la nuit à température ambiante et à l'obscurité, puis les lames sont stockées à 4°C.

### II.3.3 Analyse des images

Les coupes sont observées sur un microscope équipé d'un système Apotome (Zeiss) et saisies numériquement avec un logiciel d'analyse Axio Vision 4.8. Nous étudions d'une part la morphologie astrocytaire grâce aux marqueurs GFAP, Ezrine, Actine et Phospho-Tyrosine (P-Tyr) et d'autre part l'expression et la répartition des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR).

## Partie 3 : Techniques communes aux études *in vivo* et *in vitro*

### I. Analyse de la composition lipidique membranaire

Le principe général de l'analyse de la composition lipidique membranaire des différents échantillons est résumé dans la Figure 36.

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

L'extraction des lipides totaux est effectuée selon le principe de la méthode Folch (Folch *et al*, 1957).

Protocole *in vivo* : Les cortex frontaux, préalablement pesés et conservés à -80°C, sont homogénéisés dans 4 mL de Folch (chloroforme/méthanol : 2/1, v/v) additionnés de 0,02% de BHT (Butylhydroxytoluène, Sigma B1378) à l'aide d'un Polytron (PT1200, Kinematica, Bioblock Scientific). Pour nous permettre de quantifier la quantité d'acides gras (en  $\mu\text{mol/g}$  de tissu), 70 $\mu\text{L}$  d'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 40 $\mu\text{L}$  d'un standard interne de PS C17:0 (20  $\mu\text{g}$ ) (PS C17:0, Avanti Polar Lipids) sont ajoutés à la préparation avant broyage.

Protocole *in vitro* sur culture primaire d'astrocytes : Les astrocytes sont cultivés dans des boîtes de 10 cm de diamètre et sont utilisés à confluence à l'issue des différents

Solvants	Composition	Volume d'élution (en mL)	Séparation des lipides
Solvant I	Isopropanol/Chloroforme (1/2, v/v)	3	Lipides Neutres
Solvant II	Diéthyléther/Acide Acétique (98/2, v/v)	3	Acides Gras Libres
Solvant III	Acétonitrile	1	-
Solvant IV	Acétonitrile/n-propanol (3/1, v/v)	8	Phosphatidylcholine
Solvant V	Acétonitrile.n-propanol (1/1, v/v)	2	Sphingomyéline
Solvant VI	Méthanol	3	Phosphatidyléthanolamine
Solvant VII	Isopropanol/Méthanol HCl 3N (4/1, v/v)	4,5	Phosphatidylsérine

Tableau 7 : Protocole d'élution des différentes classes de phospholipides

traitements aux AGPI (DHA ou AA 30 $\mu$ M en présence de vitamine E 30  $\mu$ M) et/ou glucocorticoïdes (corticostérone 100 nM pendant 6 jours). Les cellules sont rincées 3 fois par un mélange de PBS/Albumine délipidée 50  $\mu$ M froid afin d'éliminer toute trace de lipides pouvant être apportés par le milieu. Les cellules sont ensuite récupérées par grattage dans du PBS/Albumine délipidée. Après centrifugation à 1800 trs/min pendant 8 minutes à 4°C, le culot cellulaire est récupéré dans 4 mL de Folch + 0,005% de BHT (Butyl-Hydroxy-Toluène).

Protocole *in vitro* sur lignées cellulaires SH\_SY5Y : Les cellules SH\_SY5Y sontensemencées à  $7 \times 10^4$  cellules / cm<sup>2</sup> dans des flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont récupérées au 5<sup>e</sup> jour de culture, à l'issue des traitements aux AGPI (DHA ou AA 70 $\mu$ M pendant 48h) suivis ou précédés d'un traitement à l'hydrocortisone (100 nM pendant 24h). Après rinçage des cellules dans du milieu simple ne contenant pas de SVF, les cellules sont incubées pendant 5 minutes dans 3mL de trypsine/EDTA. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de milieu complet puis les cellules récupérées sont centrifugées à 1000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est rincé deux fois par centrifugation avec 1 mL de PBS, puis homogénéisé dans 4 mL de Folch + 0,005% de BHT (Butyl-Hydroxy-Toluène).

Commun : On ajoute aux homogénats 1mL de solution de NaCl 0,73% pour permettre la décantation. Après agitation au vortex, les échantillons sont centrifugés pendant 30 minutes à 3000g à 4°C (Beckman, Rotor JA20). On obtient alors 2 phases : la phase supérieure, composée du mélange chloroforme/méthanol/eau dans les proportions 3/48/47 (v/v/v) qui contient les molécules hydrosolubles (protéines et glucides), est éliminée ; la phase inférieure, composée du même mélange dans les proportions 86/14/1 (v/v/v) contient les lipides totaux. Cette dernière est rincée avec 2 mL de phase supérieure théorique de Folch mimant la composition de la phase supérieure (chloroforme/méthanol/eau 3/48/47, v/v/v), afin d'éliminer les molécules hydrosolubles résiduelles. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé 30 minutes à 3000g à 4°C. La phase inférieure recueillie est ensuite évaporée à sec sous flux d'azote puis stockée à -20°C.

### *1.2 Séparation des principales classes de phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) et phosphatidylserine (PS) (Tableau 7)*

La séparation des différentes classes de phospholipides membranaires s'effectue sur cartouche de silice aminopropylée de 3 mL (Bakebond Spe amino NH<sub>2</sub>, JT Baker) (Alessandri

& Goustard-Langelier, 2001). Le principe de cette technique repose sur l'affinité des différentes classes de phospholipides pour la phase solide de la cartouche (groupement aminopropylés polaires greffés sur le support de silice).

La cartouche est préalablement rincée à l'hexane (3 mL) puis activée par 3 mL de Solvant I. Les lipides totaux sont déposés sur la cartouche et les différentes classes de phospholipides sont éluées par le passage successif de 7 solvants à polarité croissante (voir Tableau 7).

Trois classes de phospholipides sont analysées. La phosphatidylcholine (PC) est la classe majoritaire de phospholipides membranaires dans le système nerveux central. La phosphatidyléthanolamine (PE) a été décrite comme la plus riche en AGPI n-3 et en particulier en DHA. La phosphatidylsérine (PS) est une classe de phospholipides minoritaires dans le cerveau, mais sa composition est fortement influencée par des perturbations telles que le vieillissement (Giusto *et al*, 2002). Ces trois fractions isolées sont ensuite évaporées à sec sous flux d'azote, puis conservées à -20°C.

### *1.3 Préparation des esters méthyliques d'acides gras*

L'estérification par méthylation des phospholipides permet de libérer les acides gras et de les transformer en composés plus volatils, les esters méthyliques d'acides gras, pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

La méthode utilisée est celle décrite par Morisson et Smith, (1964), utilisant une solution de trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>) complexé au méthanol prête à l'emploi (Boron trifluoride, Fluka Chemica, réf. 15716) comme catalyseur de la réaction. Les différentes classes de phospholipides sont reprises dans 500 µL de BF<sub>3</sub> à 10 % de méthanol et incubées au bain Marie à 90°C pendant 20 minutes sous agitation continue. La réaction est arrêtée par l'ajout de 500µL d'eau froide. L'extraction des esters méthyliques est réalisée par ajout de 500µL d'hexane. Après agitation, les échantillons sont laissés à décanter, puis la phase inférieure aqueuse est éliminée. La phase supérieure hexanique, contenant les esters méthyliques, est rincée 2 fois avec 500 µL d'eau. Afin d'éliminer toute trace d'eau, les échantillons sont congelés et la phase hexanique est récupérée. Les esters méthyliques ainsi isolés sont conservés à -20°C.

#### *1.4 Chromatographie en phase gazeuse*

La détermination de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette technique permet la séparation de composés à l'état gazeux en fonction de leur affinité pour une phase dite stationnaire. Les acides gras sont séparés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée (niveau de volatilité), leur nombre d'insaturations et la position de ces insaturations.

Le mélange d'esters méthyliques conservés dans la phase hexanique est évaporé à sec sous flux d'azote, puis repris dans du chloroforme.

Le chromatographe (Carlo Erba, HRGC 5300, Thermo Separation Products, Les Ulis, France) est équipé d'un injecteur « on-column » et d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne est une colonne capillaire (50 m de longueur × 0,32 mm de diamètre intérieur, CB Wax 52 CB, Chrompack), greffée d'une phase stationnaire (polyéthylèneglycol). Le gaz vecteur, qui constitue la phase mobile, est de l'hydrogène sous pression (1,2 bar). L'injecteur « on-column » permet d'injecter les esters méthyliques (0,5 µL) dans une pré-colonne à une température inférieure d'environ 10°C au point d'ébullition du solvant, permettant ainsi d'augmenter la résolution de séparation des acides gras (les composés peu volatils contaminants restent dans la pré-colonne) et d'éviter la perte des acides gras à chaîne courte.

Les esters méthyliques sont élués dans la colonne insérée dans un four dont la température augmente de 54 à 212 °C à raison de 3 °C/min avec un palier de 40 min à 212 °C. En sortie de colonne, les esters méthyliques sont ensuite brûlés au niveau du détecteur à ionisation de flamme à 250°C. La formation d'ions entre les électrodes génère une différence de potentiel (ddp), proportionnelle à la masse et donc au nombre de carbone des composés élués. Ce courant, converti en tension par un électromètre transformateur d'impédance, est enregistré et traité par l'intégrateur (Nelson, SRA, Gagny, France) couplé à un ordinateur (Aïd *et al*, 2003).

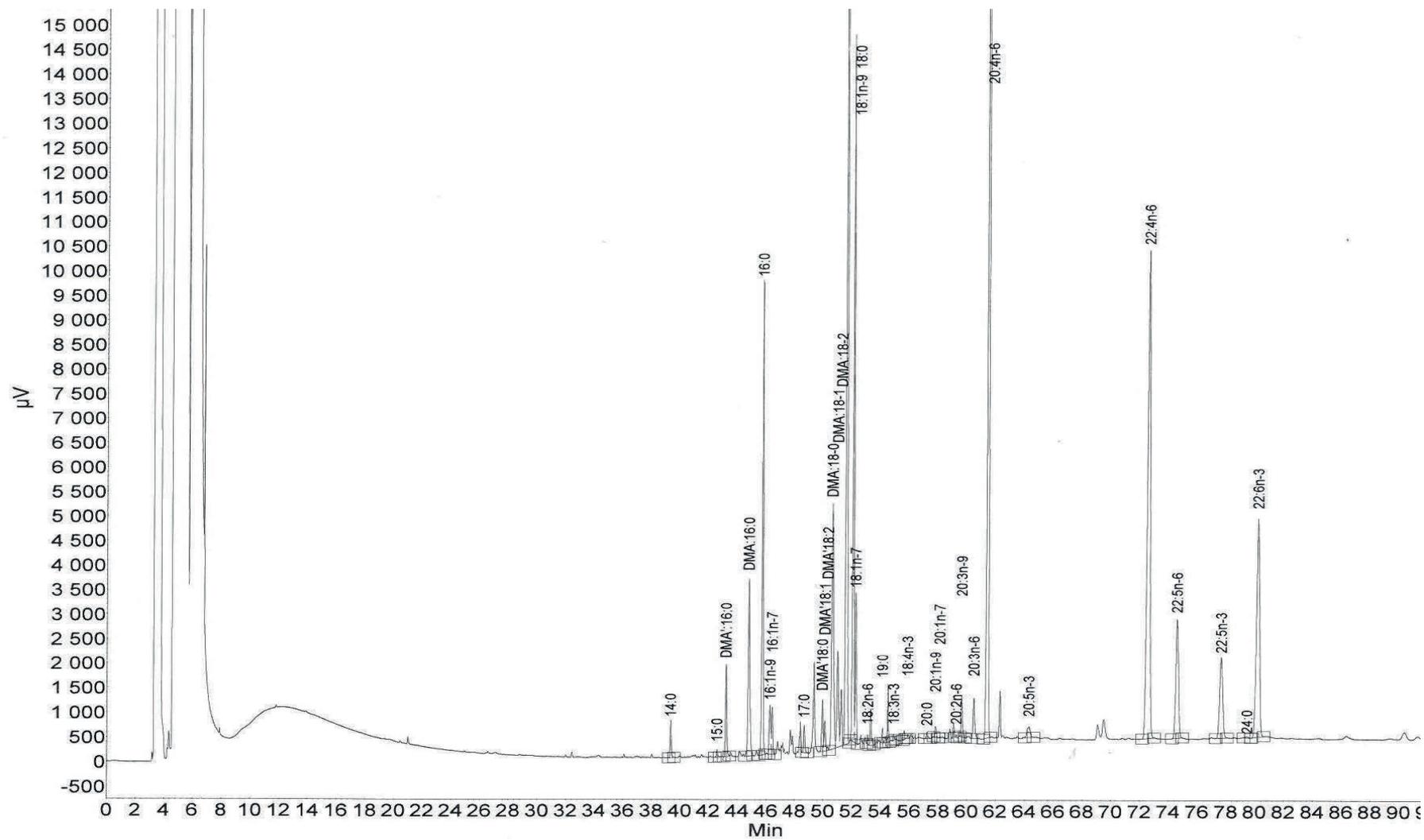


Figure 37 : Allure général d'un chromatogramme obtenu suite au passage d'échantillon d'éthers méthyliques en CPG

Un chromatogramme représentant le profil d'élution des esters méthyliques est obtenu, ainsi que leur temps de rétention respectif (Figure 37). L'identification des acides gras de l'échantillon est possible par le calcul des longueurs équivalentes de chaîne (LEC), relation entre le logarithme décimal des temps de rétention et le nombre de carbone des esters méthyliques (formule de Kovats ci-dessous).

$$LEC = 2 \times \frac{\text{Log}(T_x - T_s) - \text{Log}(T_n - T_s)}{\text{Log}(T_{n+2} - T_s) - \text{Log}(T_n - T_s)} + N$$

Avec  $T_x$  = Temps de rétention de l'acide gras inconnu, encadré par deux acides gras saturés de référence dont la longueur de chaîne diffère de 2 atomes de carbone ;  $T_s$  = Temps de rétention du solvant ;  $T_n$  = Temps de rétention du premier acide gras saturés de référence ;  $T_{n+2}$  = Temps de rétention du deuxième acide gras saturé de référence ;  $N$  = nombre de carbones du premier acide gras saturé de référence.

Les LEC calculées sont comparées aux LEC de référence établies à partir de la chromatographie de standards purs et d'un mélange composé d'esters méthyliques connus d'huile de foie de morue (HFM) et additionnés d'esters méthyliques de 8:0, 10 :0, 12 :0, 22 :0 et 24 :0 de PE de cortex cérébral pour l'identification des diméthyl acétals (DMA) issus de la transestérification des plasmalogènes. La surface des pics est proportionnelle à la quantité de chaque acide gras élué. Les résultats sont exprimés en pourcentage des acides gras totaux (%AGT).

## II. Analyse semi-quantitative de marqueurs protéiques du stress et de la synapse glutamatergique par Western Blotting

### *II.1 Préparation des échantillons*

Protocole *in vivo* : Les CA1 prélevés sont pesés puis placés dans du tampon d'extraction de protéines RIPA additionnée d'antiprotéases (10µL de RIPA+AP/mg de tissu). Les tissus sont ensuite broyés au potter sur glace jusqu'à homogénéisation de la suspension. Après 30 minutes d'incubation dans le tampon sur glace, les échantillons sont conservés à -80°C.

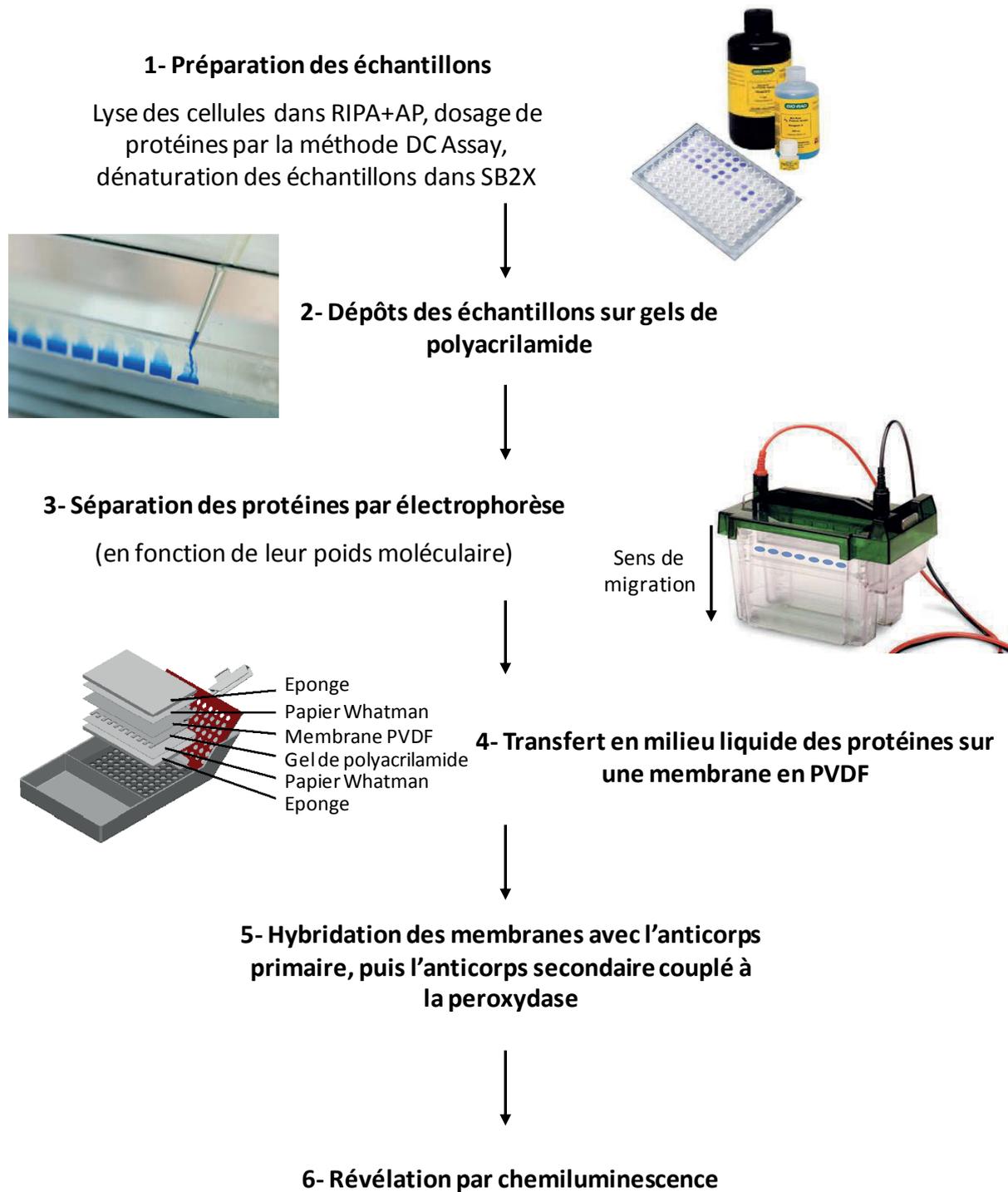


Figure 38 : Principe général de l'analyse protéique par Western Blot

Protocole *in vitro* sur culture primaire d'astrocytes : Les astrocytes sont cultivés en boîte 6 puits (surface des puits : 8,96 cm<sup>2</sup>) et sont utilisés à confluence à l'issue des différents traitements aux AGPI (DHA ou AA 30 µM en présence de vitamine E 30 µM) et/ou glucocorticoïdes (corticostérone 100 nM pendant 2 ou 6 jours). Les cellules sont rincées 3 fois au PBS froid puis incubées à 4°C pendant 30 minutes minimum dans 100µL de tampon RIPA d'extraction de protéines additionné d'antiprotéase. Les cellules sont ainsi récupérées par grattage et conservées à -80°C.

Les différentes étapes de l'analyse protéique par Western Blot sont résumées dans la Figure 38.

### *II.2 Dosage des protéines par la méthode DC Assay*

Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la méthode de Lowry, qui a été adaptée pour être compatible avec les agents réducteurs et les détergents tels que le SDS présent dans le tampon RIPA. Le kit Biorad DC-Protein Assay est basé sur la réaction entre les tyrosines et tryptophanes des protéines de l'échantillon, les ions cuivre en solution et le réactif de Folin fourni, qui donne une coloration bleue mesurée par absorbance à 660 nm ; il permet de mesurer la concentration de protéines totales des échantillons.

Sur une plaque de 96 puits, 5µL d'échantillon préalablement homogénéisés sont déposés en duplicat. Chaque puits est complété par 25 µL de solution A' (solution A + solution S fournies par le kit), puis par 200 µL de solution B également fournie. Après une incubation de 15 minutes, l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 660 nm. Une gamme étalon de Bovin Serum Albumine (BSA) allant de 0 à 2 mg/mL est dosée en parallèle.

### *II.3 Migration et transfert*

Après dosage de protéines et avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont dilués au ½ dans une solution tampon dénaturante SB2X (2,5 mL de Tris HCl 0,5 M/SDS 0,4 % pH6,8 ; 2 mL de SDS 20% ; 2 mL de glycérol ; 50 µL de bleu de bromophénol 1% ; 3 mL d'eau ultra pure) additionnée de DTT 4M (50 µl pour 950 µL de SB2X). Ce tampon contient du SDS, détergent anionique qui dénature les protéines et les charge négativement, ainsi que du DTT, agent réducteur qui rompt les ponts disulfure des protéines.

PROTEINE	PM (en kDa)	Anticorps Primaire		Anticorps Secondaire		
		Dilution	Fournisseur	Type	Dilution	Fournisseur
MCR	102	1/500	Santa Cruz SC-11412	Lapin	1/30000	Jackson 711- 035-152
GR	90-95	1/500	Santa Cruz SC-8992	Lapin	1/30000	Jackson 711- 035-152
VGLUT1	60	1/500	Chemicon- Millipore MAB5502	Souris	1/60000	Jackson 715- 035-150
VGLUT2	56	1/500	Chemicon- Millipore MAB5504	Souris	1/60000	Jackson 715- 035-150
ACTINE	42	1/10000	Sigma A5316	Souris	1/60000	Jackson 715- 035-150
GAPDH	37	1/500	Santa Cruz SC-32233	Souris	1/60000	Jackson 715- 035-150

Tableau 8 : Anticorps utilisés en Western Blot et leurs dilutions

Les échantillons ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, Biorad) sont déposés sur un gel Tris-HCl à gradient de polyacrilamide 4-15% (Biorad). L'électrophorèse est réalisée dans une cuve contenant du tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine et 0,1% (w/v) SDS ; pH = 8,3) à ampérage constant de 30 mA pendant 1h à température ambiante. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Les protéines ainsi séparées le long du gel sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene Fluoride Membrane, Immobilon-P, Millipore), préalablement perméabilisée par incubations successives dans de l'éthanol 100%, de l'eau ultra-pure et du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine et 20% (v/v) éthanol ; pH = 8,3). Le gel et la membrane sont placés entre des papiers Whatman et Scotch-Brit dans une cassette de transfert immergée dans une cuve contenant du tampon de transfert. Le transfert est réalisé à voltage constant de 30V à 4°C pendant 2 heures.

#### *II.4 Hybridation et Immunodétection*

A la fin du transfert, la membrane est rincée dans du TBST (Tris 20 mM ; NaCl 0,8% ; pH 7,6 ; Tween 20 0,1%) puis incubée 2 heures à température ambiante sous agitation dans du TBST additionné de 5% de lait écrémé en poudre. Cette étape a pour but de bloquer les sites non spécifiques de la membrane susceptibles de fixer les anticorps.

Les membranes sont ensuite incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt et dilué dans du TBST-lait 5%. Après plusieurs rinçages successifs au TBST, les membranes sont ensuite incubées pendant 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBST-lait 5%. Les différents anticorps utilisés sont présentés dans le Tableau 8. Enfin, les membranes sont rincées à nouveau dans plusieurs bains successifs de TBST et conservées une nuit dans du TBST à 4°C avant d'être révélées.

Les membranes sont révélées par chemiluminescence selon la technique ECL + (Enhancer Chimio-Luminescence, GE Healthcare, Amersham) : l'anticorps secondaire réagit avec son substrat pour donner un produit luminescent.

Les solutions A et B du réactif sont mélangées à température ambiante en proportion 40:1 à l'obscurité, 5 minutes avant utilisation. Le mélange est mis au contact des membranes pendant 5 minutes, à température ambiante, dans l'obscurité. Les membranes sont ensuite observées directement grâce à la caméra Fujifilm LAS1000 en chemiluminescence (qui permet d'effectuer une analyse semi-quantitative directe) puis en fluorescence (qui permet de visualiser le marqueur de poids moléculaire).

Les bandes d'intérêt sont quantifiées grâce au logiciel d'analyse Aida Image Analyser.

#### V. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat version 3.1. Tous les résultats sont représentés par leur moyenne et leur erreur standard à la moyenne (SEM).

Les données ont été analysées selon une ANOVA à 2 facteurs (effet régime x stress de contention pour le modèle *in vivo*; effet supplémentation en AGPI x traitement aux glucocorticoïdes pour les modèles *in vitro*) suivie de tests post-hoc de Bonferroni.

La comparaison d'évènements répétés dans le modèle *in vivo* (croissance pondérale, dosage de la corticostérone plasmatique) est effectuée à l'aide d'un ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées suivi de tests post-hoc de Bonferroni.

Pour chacun des tests, le seuil de significativité est fixé à  $p < 0,05$ .

# Résultats



## **Partie 1 : Effet des apports en AGPI et du stress sur la composition lipidique des membranes cellulaires**

### **I. Analyse de la composition lipidique au niveau du cortex frontal de rat (étude *in vivo*)**

Les compositions en acides gras de la phosphatidyléthanolamine (PE), de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidylsérine (PS) du cortex frontal des 6 groupes expérimentaux ont été analysées qualitativement en termes de pourcentage d'acides gras totaux (%AGT) dans les **Tableaux 9, 10 et 11** et quantitativement en termes de concentrations ( $\mu\text{moles/g}$  de tissu) (Résultats en **Annexe 3**). Les AGPI précurseurs (moins de 20 atomes de carbone) ne sont pas présentés dans les tableaux, leurs taux étant très faibles ( $<0.1\%$  des AGT).

Pour chaque acide gras dans les différentes classes de phospholipides, les résultats ont été analysés par ANOVA 2 (régime x stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. Dans la suite de l'exposé, seuls les résultats sur les %AGT seront décrits d'un point de vue statistique. D'une manière générale, les données quantitatives (exprimées en  $\mu\text{moles/g}$  de tissus) varient de façon similaire aux résultats qualitatifs exprimés en %AGT. Cependant, dans certains cas où la modulation qualitative, bien que significative, n'est pas suffisante pour induire une modulation quantitative significative, les résultats quantitatifs seront précisés.

#### ***1.1. Caractérisation générale des différentes classes de phospholipides***

Dans le cortex frontal, chez les rats équilibrés non stressés, la concentration en PC est de  $22,7 \pm 3,2 \mu\text{moles/g}$  de tissu. Cette classe de phospholipides est majoritaire dans les membranes cérébrales, puisqu'elle représente à elle seule près de 44 % des phospholipides étudiés. Les concentrations en PE et PS sont respectivement de  $13,6 \pm 0,9 \mu\text{moles/g}$  de tissu et de  $15,4 \pm 1,2 \mu\text{moles/g}$  de tissu, ce qui représente 27 % et 30 % des phospholipides étudiés.

D'un point de vue qualitatif, la PC constitue la classe de phospholipides la plus riche en acides gras saturés (AGS) et monoinsaturés (AGMI), qui représentent respectivement 59% et 28% des AGT. Elle est relativement pauvre en acides gras polyinsaturés (AGPI) qui ne représentent, toutes séries confondues, que 13% des AGT. A l'inverse, la PE, qui ne contient

que 23% et 13 % d'AGS et d'AGMI, constitue la classe la plus riche en AGPI (45% des AGT). Ainsi les AGPI n-6, principalement représentés par l'AA, et les AGPI n-3, principalement représentés par le DHA, représentent respectivement près de 18 % et 26 % des AGT. La PS, quant à elle, possède une composition intermédiaire entre celle de la PC et de la PE, avec près de 43% d'AGS, 20% d'AGMI, 10% d'AGPI n-6 et 26% d'AGPI n-3.

## ***1.2. Impact du régime alimentaire***

Le régime alimentaire a un effet globalement significatif sur la proportion en AGPI n-6 (en particulier AA et DPA n-6) et sur la proportion en AGPI n-3 (en particulier DHA) dans toutes les classes de phospholipides, ce qui a des répercussions sur le ratio AGPI n-6/AGPI n-3.

***a- Impact d'une déficience en AGPI n-3*** : La déficience en AGPI n-3 est caractérisée par une diminution significative d'environ 50% de la proportion en AGPI n-3 dans toutes les classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ). Cette variation de la composition en AGPI n-3 totaux est due à une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de 49% dans la PE, 51% dans la PC et 63 % dans la PS de la proportion en DHA des membranes, sans modification de la composition en EPA. La diminution des AGPI n-3 totaux est associée à une augmentation de la proportion d'AGPI n-6, de 62% dans la PE, 29% dans la PC et 89% dans la PS ( $p < 0,001$ ). En effet, si la composition en AA des membranes est inchangée, on observe l'apparition d'une importante proportion de DPA n-6 ( $p < 0,001$ ) dans toutes les classes de phospholipides, compensant la diminution en DHA. Ces variations conduisent à une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 ( $p < 0,001$ ) de 221% dans la PE, 159 % dans la PC et 389% dans la PS.

La déficience en AGPI n-3 ne modifie pas la composition en AGS, en AGMI et en DMA de la PE et de la PC. Au niveau de la PS, elle induit une augmentation globale de 13% de la proportion en AGS ( $p = 0,008$ ) et de 14% de la proportion d'AGMI ( $p = 0,027$ ), sans modification de la proportion en DMA. La déficience en AGPI n-3 induit également une augmentation de la proportion en AGPI n-9 de 25% au niveau de la PS ( $p = 0,035$ ) et de 57% au niveau de la PE ( $p = 0,002$ ).

Ces variations qualitatives de la composition lipidique cérébrale par la déficience alimentaire en AGPI n-3 sont retrouvées également quantitativement.

	Déf		Eq		Enr		Effet global du stress
	NS	S	NS	S	NS	S	
$\Sigma$ AGS	22,3 ± 0,2	22,1 ± 0,4	22,4 ± 0,4	24,0 ± 1,3	21,8 ± 0,2	21,2 ± 0,2	ns
$\Sigma$ AGMI	13,3 ± 0,3	13,4 ± 0,3	12,7 ± 0,6	14,0 ± 0,9	14,0 ± 0,2	15,6 ± 0,3*	F(1,35)=6,19 p=0,08
20:4 n-6	13,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,9 ± 0,3	12,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,5	10,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	10,2 ± 0,2	ns
22:5 n-6	10,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,2	0,5 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,03	0,2 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,01	ns
$\Sigma$ AGPI n-6	29,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	29,9 ± 0,5	18,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	17,5 ± 0,7	14,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	14,6 ± 0,3	ns
20:5 n-3	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,1	0,15 ± 0,03	0,1 ± 0,02	ns
22:6 n-3	12,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,7 ± 0,3	25,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	24,1 ± 0,4*	27,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	25,6 ± 0,5*	F(1,35)=5,07 p=0,031
$\Sigma$ AGPI n-3	13,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,3	26,4 ± 1 <sup>b</sup>	23,0 ± 1,7*	28,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	26,3 ± 0,5*	F(1,35)=5,28 p=0,028
$\Sigma$ AGPI n-9	0,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,01	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01	ns
$\Sigma$ DMA	21,4 ± 0,2	21,3 ± 0,3	20,1 ± 0,6	21,5 ± 0,4	21,1 ± 0,2	22,2 ± 0,3	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	2,2 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,07	0,7 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,04	0,5 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,01	ns

**Tableau 9 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidyléthanolamine (PE) du cortex frontal de rat**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficitaires en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire (p<0,05)

	Déf		Eq		Enr		Effet global du stress
	NS	S	NS	S	NS	S	
$\Sigma$ AGS	58,9 ± 0,3	58,9 ± 0,3	58,6 ± 0,4	59,0 ± 0,4	58,6 ± 0,2	58,4 ± 0,2	ns
$\Sigma$ AGMI	27,7 ± 0,4	28,7 ± 0,2*	27,6 ± 0,4	28,3 ± 0,4	28,2 ± 0,2	29,0 ± 0,3	F(1,36)=9,52 p=0,004
20:4 n-6	6,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,08	6,4 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,03 ± 0,1	5,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,1 ± 0,05	ns
22:5 n-6	2,3 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,07	0,1 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,01	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,02	ns
$\Sigma$ AGPI n-6	10,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,1	8,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,2	6,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,04	ns
20:5 n-3	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0 ± 0	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01	ns
22:6 n-3	2,4 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,05	5,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,2*	5,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	5,2 ± 0,09	F(1,36)=9,53 p=0,004
$\Sigma$ AGPI n-3	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,05	5,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,2*	5,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	5,5 ± 0,1	F(1,36)=12,2 p=0,001
$\Sigma$ AGPI n-9	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	ns
$\Sigma$ DMA	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,02	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1*	1,5 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,07	1,2 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,2 ± 0,02	ns

**Tableau 10 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylcholine (PC) du cortex frontal de rat**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire (p<0,05)

	Déf		Eq		Enr		Effet global du stress
	NS	S	NS	S	NS	S	
$\Sigma$ AGS	47,7 ± 1,7	49,2 ± 2	42,9 ± 2,1	42,5 ± 1,2	46,5 ± 1,6	45,0 ± 1,1	ns
$\Sigma$ AGMI	22,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	24,0 ± 0,5	20,0 ± 1,1 <sup>b</sup>	20,8 ± 0,8	22,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	24,6 ± 0,9	F(1,34)=5,71 p=0,023
20:4 n-6	4,6 ± 0,3 <sup>ab</sup>	4,3 ± 0,35	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,2	4,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,1	ns
22:5 n-6	10,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,5	0,8 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,06	0,3 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,04	ns
$\Sigma$ AGPI n-6	18,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	16,1 ± 1	9,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	9,6 ± 0,4	7,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,5 ± 0,2	ns
20:5 n-3	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,06	0,3 ± 0,07	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,1	ns
22:6 n-3	9,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,4 ± 0,8	25,4 ± 2,3 <sup>b</sup>	25,0 ± 1,4	21,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	20,8 ± 1,5	F(1,34)=9,53 p=0,004
$\Sigma$ AGPI n-3	9,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,9 ± 0,8	25,9 ± 2,2 <sup>b</sup>	25,6 ± 1,4	22,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	21,4 ± 1,5	F(1,34)=12,2 p=0,001
$\Sigma$ AGPI n-9	0,1 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	ns
$\Sigma$ DMA	1,4 ± 0,04	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,06	1,4 ± 0,05	1,5 ± 0,09	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	1,9 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,07	0,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,02	ns

**Tableau 11 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylsérine (PS) du cortex frontal de rat**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire (p<0,05)



**b- Impact d'un enrichissement en AGPI-LC n-3 :** A l'inverse de la déficience en AGPI n-3, l'enrichissement en AGPI-LC n-3 est caractérisé par une augmentation globale de la proportion en AGPI n-3 totaux, de 12% dans la PE ( $p=0,005$ ) et de 16 % dans la PC ( $p<0,001$ ). Cette variation est due à une augmentation globale de la proportion en DHA de 8% dans la PE ( $p=0,011$ ) et de 15% dans la PC ( $p<0,001$ ), à laquelle s'ajoute une multiplication par 5 de la proportion en EPA uniquement dans la PC ( $p=0,013$ ). Il est cependant important de noter que l'EPA est très minoritaire dans les phospholipides membranaires. Bien que riche en AGPI n-3, la PS est, quant à elle, inchangée au niveau de sa proportion en AGPI n-3.

L'enrichissement en AGPI-LC n-3 induit également une diminution de la proportion en AGPI n-6 totaux de 19% dans la PE ( $p<0,001$ ), de 13% dans la PC ( $p<0,001$ ) et de 25% dans la PS ( $p=0,051$ ). Cette variation est due principalement à une diminution de la proportion en AA de 15% dans la PE et dans la PC ( $p<0,001$ ) et de 20% dans la PS ( $p=0,033$ ).

Ces modifications du contenu membranaire en AGPI n-3 et en AGPI n-6 induisent une diminution de 24% dans la PE ( $p=0,024$ ) et de 23% dans la PC ( $p=0,007$ ) du ratio AGPI n-6/AGPI n-3. La composition lipidique en AGPI n-6 et AGPI n-3 de la PS étant moins affectée que celle de la PE et de la PC par l'enrichissement en AGPI-LC n-3, son ratio AGPI n-6/AGPI n-3 est inchangé.

L'enrichissement en AGPI-LC n-3 ne modifie pas la composition en AGS, AGMI, en AGPI n-9 et en DMA de la PE et de la PC. Au niveau de la PS, on observe une augmentation de 13% de la proportion en AGMI ( $p=0,044$ ).

Contrairement à l'impact de la déficience, les effets de l'enrichissement du régime alimentaire en AGPI-LC n-3 sur la composition lipidique sont uniquement qualitatifs et ne sont pas suffisants pour être retrouvés quantitativement.

### **1.3. Impact du stress de contention**

Au niveau de la PE et de la PC, le protocole de stress de contention a un effet global sur la proportion en AGPI n-3 et plus particulièrement sur la proportion en DHA. Chez les rats équilibrés et enrichis en AGPI-LC n-3, le stress de contention induit ainsi une diminution de 6% de la proportion en AGPI n-3 totaux dans la PE ( $p<0,05$ ) et de respectivement 12% ( $p=0,003$ ) et 7% ( $p=0,059$ ) dans la PC, principalement due à une diminution du taux de DHA, sans modification significative du ratio AGPI n-6/AGPI n-3.

	Impact du régime chez les non stressés		Impact du protocole de stress		
	Impact de la déficience en AGPI n-3	Impact de l'enrichissement en AGPI-LC n-3	Chez les équilibrés	Chez les déficients en AGPI n-3	Chez les enrichis en AGPI-LC n-3
<b>Σ AGS</b>	-	-	-	-	-
<b>Σ AGMI</b>	-	-	-	-	-
<b>20:4 n-6</b>	-	↓ 15%	-	-	-
<b>22:5 n-6</b>	↑ 2020%	-	-	-	-
<b>Σ AGPI n-6</b>	↑ 62%	↓ 19%	-	-	-
<b>20:5 n-3</b>	-	-	-	-	-
<b>22:6 n-3</b>	↓ 49%	↑ 8%	↓ 4%	-	-
<b>Σ AGPI n-3</b>	↓ 50%	↑ 12%	↓ 13%	-	-
<b>Σ AGPI n-9</b>	↑ 57%	-	-	-	-
<b>Σ DMA</b>	-	-	-	-	-
<b>AGPI n-6/ AGPI n-3</b>	↑ 221%	↓ 24%	-	-	-

**Tableau 12 : Tableau récapitulatif des effets du régime alimentaire et du stress sur la composition lipidique des membranes cérébrales : exemple de la PE**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals.

Chez les animaux déficients en AGPI n-3, la baisse du DHA membranaire induite par la déficience n'est pas accentuée par le protocole de stress. Cependant, on observe une augmentation de 8% du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 ( $p=0,005$ ) dans la PC uniquement.

La composition en AGS, en AGPI n-6 et en AGPI n-9 et en DMA des membranes cérébrales du cortex frontal n'est pas modifiée par le protocole de stress de contention. Par contre, on observe une augmentation globalement significative de la proportion en AGMI dans les phospholipides membranaires, notamment dans la PE des animaux enrichis en AGPI-LC n-3 (+11% ;  $p=0,03$ ) et dans la PC des animaux déficients en AGPI n-3 (+14% ;  $p=0,041$ ). Cependant, ces variations sont relativement réduites et ne se retrouvent pas d'un point de vue quantitatif.

**En résumé**, comparativement au régime équilibré, la déficience en AGPI n-3 est caractérisée par une diminution du DHA dans les phospholipides membranaires, compensée par une augmentation en DPA n-6. Ces modulations sont accompagnées d'une diminution significative de l'activité de la cPLA2. A l'inverse, l'enrichissement en AGPI-LC n-3 est caractérisé par une diminution de l'AA associée à une légère augmentation du DHA. Chez les animaux équilibrés uniquement, le protocole de stress réduit de manière significative la proportion en AGPI n-3 et plus particulièrement en DHA (**Tableau 12**).

## **II. Etude de la composition lipidique des membranes cellulaires sur des modèles de culture *in vitro***

### ***II.1. Culture primaire d'astrocytes de rats***

La composition en acides gras, exprimée en % AGT des différentes classes de phospholipides (PE, PC et PS) des membranes astrocytaires est résumée dans les **Tableaux 13, 14 et 15**.

Toutes les cellules ont été cultivées en présence de Vitamine E (30 $\mu$ M), utilisée comme antioxydant. Cet ajout de Vitamine E dans le milieu de culture n'influence pas la composition lipidique des membranes astrocytaires, comme il a pu être montré au laboratoire lors d'études précédentes par comparaison avec des cellules sans aucun enrichissement.



	Vit E		Vit E + DHA		Vit E + AA		Effet global de la C100nM
	NS	S	NS	S	NS	S	
$\Sigma$ AGS	22,3 ± 2	20,6 ± 2,5	20,6 ± 1,4	19,6 ± 0,4	21,1 ± 0,8	21,5 ± 0,6	ns
$\Sigma$ AGMI	14,7 ± 0,06 <sup>a</sup>	13,6 ± 0,5	9,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,7	9,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,6	ns
20:4 n-6	23,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	25,4 ± 1,4	8,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	9,5 ± 0,2	30,8 ± 0,5 <sup>c</sup>	30,1 ± 0,7	ns
22:5 n-6	0,8 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,06	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,01 ± 0,0	2,4 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,6 ± 0,07	F(1,18)=3,9 p=0,064
$\Sigma$ AGPI n-6	27,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	29,0 ± 1,5	9,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	10,2 ± 0,3	40,5 ± 0,5 <sup>c</sup>	39,7 ± 0,7	ns
20:5 n-3	0,2 ± 0,07 <sup>a</sup>	0 ± 0	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,4*	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0 ± 0	F(1,18)=4,99 p=0,038
22:6 n-3	14,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	14,7 ± 0,7	32,9 ± 1,9 <sup>b</sup>	36,3 ± 1,5	11,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,1 ± 0,3	ns
$\Sigma$ AGPI n-3	16,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,8	42,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	43,7 ± 1	12,1 ± 0,2 <sup>c</sup>	11,7 ± 0,3	ns
$\Sigma$ AGPI n-9	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,2	0,1 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,01	ns
$\Sigma$ DMA	18,3 ± 0,05	19,1 ± 0,8	18,1 ± 0,3	18,2 ± 0,1	17,1 ± 0,3	17,9 ± 0,6	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	1,7 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1	0,2 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,01	3,3 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,4 ± 0,06	ns

**Tableau 13 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidyléthanolamine (PE) des membranes cérébrales d'astrocytes en culture**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Vit E : Vitamine E 30  $\mu$ M ; DHA : Vitamine E 30  $\mu$ M + DHA 30 $\mu$ M ; AA : Vitamine E 30  $\mu$ M + AA 30 $\mu$ M ; NS : Sans traitement à la corticostérone ; S : Corticostérone 100nM pendant 6 jours

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 6 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1% SVF). Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (AGPI\*treatment à la corticostérone), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif des AGPI sur les astrocytes en absence de corticostérone (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif de la corticostérone par rapport au témoin sans corticostérone relevant la même supplémentation en AGPI (p<0,05)

	Vit E		Vit E + DHA		Vit E + AA		Effet global de la C100nM
	NS	S	NS	de la C100nM	NS	S	
$\Sigma$ AGS	58,0 ± 1,1	57,7 ± 1,1	62,2 ± 1,9	63,4 ± 2,5	59,0 ± 1,5	58,6 ± 1,5	ns
$\Sigma$ AGMI	27,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	25,3 ± 0,6	19,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	17,0 ± 2,6	16,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	15,4 ± 0,6	ns
20:4 n-6	7,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,2	3,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,03	16,4 ± 1,1 <sup>c</sup>	17,7 ± 0,9	ns
22:5 n-6	0,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,02	0 ± 0 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,02	0,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,1*	F(1,18)=6,26 p=0,022
$\Sigma$ AGPI n-6	9,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,8 ± 0,2	4,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,8 ± 0,1	20,4 ± 0,9 <sup>c</sup>	21,6 ± 0,5	ns
20:5 n-3	0,2 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,04	2,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,4	0,06 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01	ns
22:6 n-3	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,1	8,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	9,3 ± 0,8	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,3	ns
$\Sigma$ AGPI n-3	3,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,2	12,8 ± 1 <sup>b</sup>	13,6 ± 1	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,3	ns
$\Sigma$ AGPI n-9	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,01	0,04 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,02	ns
$\Sigma$ DMA	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,05	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,05	1,4 ± 0,08	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1	0,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,03	7,4 ± 1 <sup>c</sup>	7,5 ± 0,7	ns

**Tableau 14 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylcholine (PC) des membranes cérébrales d'astrocytes en culture**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Vit E : Vitamine E 30  $\mu$ M ; DHA : Vitamine E 30  $\mu$ M + DHA 30 $\mu$ M ; AA : Vitamine E 30  $\mu$ M + AA 30 $\mu$ M ; NS : Sans traitement à la corticostérone ; S : Corticostérone 100nM pendant 6 jours

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 6 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1% SVF). Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (AGPI\*traitement à la corticostérone), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif des AGPI sur les astrocytes en absence de corticostérone (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif de la corticostérone par rapport au témoin sans corticostérone relevant la même supplémentation en AGPI (p<0,05)

	Vit E		Vit E + DHA		Vit E + AA		Effet global de la C100nM
	NS	S	NS	S	NS	S	
$\Sigma$ AGS	41,4 ± 1,5	40,5 ± 0,7	46,0 ± 3,6	46,9 ± 3,5	43,0 ± 3,1	40,3 ± 1,2	ns
$\Sigma$ AGMI	28,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	28,7 ± 0,7	20,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	21,2 ± 2,5	22,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	22,9 ± 1,1	ns
20:4 n-6	6,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,1	2,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,3	9,3 ± 0,8 <sup>c</sup>	9,7 ± 0,6	ns
22:5 n-6	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1	0,2 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,02	6,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	7,8 ± 0,2*	F(1,16)=7,92 p=0,012
$\Sigma$ AGPI n-6	10,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,2	4,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,9	22,8 ± 2,2 <sup>c</sup>	24,2 ± 1,7	ns
20:5 n-3	0,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,07	1,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,02	ns
22:6 n-3	13,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	14,9 ± 0,9	23,3 ± 3,3 <sup>b</sup>	22,6 ± 2,6	7,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,5	ns
$\Sigma$ AGPI n-3	15,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	16,7 ± 0,9	26,8 ± 3,4 <sup>b</sup>	25,1 ± 3	9,1 ± 1 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,4	ns
$\Sigma$ AGPI n-9	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,05	0,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,01	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,06	ns
$\Sigma$ DMA	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,1	ns
AGPI n-6/ AGPI n-3	0,7 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,03	0,2 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,05	2,5 ± 0,07 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,08	ns

**Tableau 15 : Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylsérine (PS) des membranes cérébrales d'astrocytes en culture**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Vit E : Vitamine E 30  $\mu$ M ; DHA : Vitamine E 30  $\mu$ M + DHA 30 $\mu$ M ; AA : Vitamine E 30  $\mu$ M + AA 30 $\mu$ M ; NS : Sans traitement à la corticostérone ; S : Corticostérone 100nM pendant 6 jours

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 6 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1% SVF). Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en pourcentage d'acides gras totaux (%AGT).

Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (AGPI\*treatment à la corticostérone), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif des AGPI sur les astrocytes en absence de corticostérone (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif de la corticostérone par rapport au témoin sans corticostérone relevant la même supplémentation en AGPI (p<0,05)

### II.1.1 Caractérisation des cellules témoins (Vitamine E)

Comparativement à des cellules cérébrales prélevées *in vivo* chez le rat, les cellules témoins de notre modèle de culture astrocytaire sont caractérisées par une proportion importante d'AGPI n-9 et d'AGMI, qui représentent respectivement 15% et 1,6% des AGT de la PE, 27% et 0,7% des AGT de la PC et de la PS. Ce phénomène est caractéristique d'un déficit en AGPI, et plus particulièrement en AGPI n-3 avec un taux de DHA qui ne représente que 14% des AGT dans la PE et la PS et seulement 2,3 % dans la PC.

### II.1.2 Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique des membranes astrocytaires

Les compositions des membranes astrocytaires en AGS et en DMA ne sont pas modifiées lors de l'enrichissement du milieu de culture avec de l'AA ou du DHA. Dans toutes les classes de phospholipides, la supplémentation du milieu de culture en AGPI (AA ou DHA) module globalement la composition des membranes astrocytaires en AGPI n-6 (en particulier AA et DPA n-6) et en AGPI n-3 (en particulier EPA et DHA), ce qui a des répercussions sur le ratio AGPI n-6/AGPI n-3. On observe également une diminution globale de la proportion en AGMI et en AGPI n-9.

**a- Impact d'un enrichissement du milieu en AA :** L'enrichissement du milieu de culture avec de l'AA 30µM induit une augmentation de la proportion d'AGPI n-6 dans toutes les classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ). Celle-ci est augmentée de 50% dans la PE et doublée dans la PC et la PS. Cette augmentation de la proportion en AGPI n-6 est due à une augmentation des proportions d'AA et de DPA n-6 qui sont doublées voire triplées selon les classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ).

En parallèle, on observe une diminution en AGPI n-3 totaux de 25% dans la PE ( $p < 0,001$ ), sans modification de la proportion en EPA ou en DHA. Cette variation n'est pas retrouvée au niveau de la PC ou de la PS.

Ces modifications de la composition en AGPI n-3 et AGPI n-6 induisent un doublement du ratio des proportions en AGPI n-6/AGPI n-3 dans toutes les classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ).

L'enrichissement du milieu de culture avec de l'AA 30µM induit une diminution du taux d'AGMI de 38% dans la PE et la PC ( $p < 0,001$ ) et de 22% dans la PS ( $p = 0,033$ ), par

rapport aux cellules témoins. Cette diminution des AGMI est accompagnée d'une chute de 95% de la proportion en AGPI n-9 dans les trois classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ). Ces modulations de la composition en AGMI et en AGPI n-9 découlent de l'enrichissement des membranes astrocytaires en AGPI n-6 par rapport aux cellules témoins.

**b- Impact d'un enrichissement du milieu en DHA :** L'enrichissement du milieu en DHA induit une augmentation importante de la proportion en AGPI n-3. Celle-ci est ainsi doublée dans la PS ( $p = 0,008$ ), triplée dans la PE ( $p < 0,001$ ) et quadruplée dans la PC ( $p < 0,001$ ). Cette augmentation des AGPI n-3 est due à une augmentation de la proportion en EPA et en DHA ( $p < 0,001$ ). L'EPA, qui est faiblement représenté dans les membranes astrocytaires des cellules témoins, atteint jusqu'à 6% des AGT dans la PE des cellules enrichies en DHA. Le taux de DHA est quant à lui doublé dans la PS ( $p = 0,011$ ), triplé dans la PE ( $p < 0,001$ ) et quadruplé dans la PC ( $p < 0,001$ ).

L'augmentation en AGPI n-3 est accompagnée d'une diminution de la proportion en AGPI n-6 de 64% dans le PE, de 51% dans la PC, et de 62% dans la PS ( $p < 0,001$ ), principalement liée aux variations de proportions en AA et en DPA n-6. Le taux d'AA chute ainsi de 62% dans la PE, 55% dans la PC et de 65% dans la PS ( $p < 0,001$ ). Le DPA n-6, quant à lui, est presque inexistant dans les membranes des cellules enrichies en DHA.

Ces modifications de la composition en AGPI n-3 et AGPI n-6 induisent une diminution du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 de 87% dans la PE ( $p < 0,001$ ) et la PC ( $p = 0,003$ ) et de 77% dans la PS ( $p < 0,001$ ). La somme des AGPI totaux est augmentée de 20% dans la PE ( $p = 0,001$ ), de 35% dans la PC ( $p = 0,01$ ) et de 15% dans la PS (ns).

L'enrichissement du milieu de culture en DHA 30 $\mu$ M induit une diminution du taux d'AGMI de 35% dans la PE ( $p < 0,001$ ), de 30% dans la PC ( $p = 0,004$ ) et dans la PS ( $p = 0,002$ ), par rapport aux cellules témoins. Cette diminution des AGMI est accompagnée d'une chute de 95% de la proportion en AGPI n-9 dans les trois classes de phospholipides ( $p < 0,001$ ), reflétant l'enrichissement des membranes astrocytaires en AGPI.

	Impact du traitement en AGPI par rapport aux cellules témoins (Vit E)		Impact du traitement à la corticostérone 100 nM pendant 6 jours		
	AA 30μM	DHA 30 μM	Sur cellules témoins (Vit E)	Sur cellules enrichies en AA (Vit E + AA)	Sur cellules enrichies en DHA (Vit E + DHA)
Σ AGS	-	-	-	-	-
Σ AGMI	↓ 38%	↓ 35%	-	-	-
20:4 n-6	↑ 32%	↓ 62%	-	-	-
22:5 n-6	↑ 200%	↓ 96%	-	↑ 9%	-
Σ AGPI n-6	↑ 50%	↓ 64%	-	-	-
20:5 n-3	-	↑ 2850%	-	-	↓ 15%
22:6 n-3	-	↑ 133%	-	-	-
Σ AGPI n-3	↓ 25%	↑ 161%	-	-	-
Σ AGPI n-9	↓ 95%	↓ 95%	-	-	-
Σ DMA	-	-	-	-	-
AGPI n-6/ AGPI n-3	↑ 94%	↓ 87%	-	-	-

**Tableau 16 : Tableau récapitulatif des effets des AGPI et de la C100nM pendant 6 jours sur la composition lipidique des membranes astrocytaires : exemple de la PE**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals.

### II.1.3 Impact de la corticostérone sur la composition lipidique des membranes astrocytaires

La composition des membranes astrocytaires en AGS, en AA, en AGPI n-6 totaux, en DHA, en AGPI n-3 et en AGPI n-9 n'est pas modifiée lors de l'enrichissement du milieu en corticostérone (100nM, 6 jours).

La corticostérone a un effet globalement stimulant sur la proportion en DPA n-6 des membranes astrocytaires. Cet effet est significatif sur les cellules enrichies en AA, qui sont naturellement les plus riches en DPA n-6 et pour lesquelles on observe une augmentation du DPA n-6 de 9% dans la PE ( $p=0,006$ ) et de 30 % dans la PC ( $p=0,005$ ) et la PS ( $p=0,001$ ).

Au niveau de la PE uniquement, le traitement à la corticostérone induit une diminution globale de la proportion en EPA. Cet effet est significatif sur les cellules enrichies en DHA, qui sont naturellement plus riches en EPA et pour lesquelles on observe une diminution de 15% de la proportion d'EPA. Cet effet n'est pas retrouvé au niveau de la PC et de la PS, dans lesquelles l'EPA est aussi moins représenté.

**En résumé**, l'enrichissement du milieu de culture en AA 30 $\mu$ M favorise l'incorporation des AGPI n-6 (AA et DPA n-6) dans les membranes astrocytaires au détriment des AGPI n-3 (en particulier DHA). A l'inverse, l'enrichissement du milieu de culture en DHA 30 $\mu$ M augmente la proportion en AGPI n-3 (DHA et EPA) dans les membranes astrocytaires et réduit celle en AGPI n-6 (AA et DPA n-6). L'ajout de corticostérone 100nM pendant 6 jours dans le milieu de culture favorise l'incorporation de DPA n-6 dans les cellules enrichies en AA et réduit celle de l'EPA dans la PE des cellules enrichies en DHA (**Tableau 16**).

## **II.2. Lignées cellulaires de neuroblastomes humains SH\_SY5Y**

L'étude réalisée sur la composition lipidique des membranes des cellules SH\_SY5Y est préliminaire car elle ne comporte qu'un effectif de  $n=1$ . Aucune analyse statistique n'a donc été réalisée et il ne s'agit ici que d'une interprétation qualitative des résultats obtenus.

Seuls les résultats obtenus sur la PE seront discutés dans cette partie ; cependant, l'analyse de la PC et de la PS révèlent des effets globalement similaires. La composition lipidique détaillée de la PE, de la PC et de la PS est donnée en **Annexe 4**.

	Impact du traitement en AGPI par rapport aux cellules sans AGPI		Impact du traitement à l'OH-C 100 nM pendant 24h		
	AA 70µM	DHA 70 µM	Sur cellules témoins	Sur cellules enrichies en AA	Sur cellules enrichies en DHA
Σ AGS	↑ 30%	↑ 30%	-	-	-
Σ AGMI	↓ 30%	↓ 30%	-	-	-
20:4 n-6	↑ 30%	↓ 50%	-	↑ 20%	↑ 10%
22:5 n-6	↑ 240%	↓ 70%	-	-	-
Σ AGPI n-6	↑ 90%	↓ 50%	-	↑ 9%	↑ 3%
20:5 n-3	-	↑ 200%	↑ 60%	↑ 300%	↑ 13%
22:6 n-3	↓ 30%	↑ 130%	↑ 4%	↑ 9%	↑ 13%
Σ AGPI n-3	↓ 30%	↑ 100%	↑ 4%	↑ 11%	↑ 13%
Σ AGPI n-9	↓ 80%	↓ 80%	-	-	-
Σ DMA	↓ 25%	↓ 25%	-	-	-
AGPI n-6/ AGPI n-3	↑ 300%	↓ 80%	-	-	-

**Tableau 17 : Modulation de la composition lipidique des cellules SH\_SY5Y par la supplémentation du milieu en AGPI et par une pré-incubation de 24h à l'OH-C**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals ; OH-C : hydro-cortisone

Afin de caractériser l'effet de l'OH-C 100nM sur l'incorporation des AGPI membranaires, les cellules SH\_SY5Y ont été pré-incubées pendant 24h avec de l'OH-C avant d'être supplémentées pendant 45h avec des AGPI 70µM (DHA ou AA). Il s'agit ici des résultats d'une étude préliminaire (n=1).

### II.2.1 Caractérisation des cellules témoins

Les cellules témoins ne reçoivent ni traitement aux AGPI, ni traitement à la corticostérone. Elles sont caractérisées par une proportion relativement faible d'AGPI n-6 et d'AGPI n-3 qui ne représentent au total que 39% des AGT dans la PE. Les AGPI n-6 sont majoritaires comparativement aux AGPI n-3, comme l'indique le ratio AGPI n-6/AGPI n-3 de 1,3.

Comme pour les astrocytes, l'apport en AGPI n-6 et n-3, reposant uniquement sur l'addition de 10% de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture, est insuffisant et ce déficit est caractérisé par une proportion plus importante en AGMI et en AGPI n-9, dans les membranes, qui représentent respectivement 19% et 2% des AGT dans la PE.

### II.2.2 Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique des membranes neuronales (Tableau 17)

**a- Impact d'un enrichissement du milieu en AGPI :** Comparativement aux cellules témoins, les cellules supplémentées en AGPI 70  $\mu$ M (DHA, AA ou EPA) pendant 72h, présentent une proportion inférieure en AGMI (-30% en moyenne) et en AGPI n-9 (-80% en moyenne). Au niveau de la PE, l'enrichissement en AGPI induit une augmentation de la proportion en AGS (+30% en moyenne). On observe également une diminution globale de la teneur en DMA, qui est particulièrement visible au niveau de la PE (-25%), classe de phospholipides la plus riche en DMA.

**b- Impact d'un enrichissement du milieu en AA :** Suite à l'enrichissement en AA 70  $\mu$ M pendant 72h, la proportion en AGPI n-6 est doublée au niveau des phospholipides membranaires. Cette augmentation des AGPI n-6 est caractérisée par une augmentation de l'AA, mais également par l'apparition dans les membranes du DPA n-6. Le DPA n-6 compense la baisse de 30% du contenu membranaire en AGPI n-3 et plus particulièrement en DHA. Ces modulations de composition membranaire induisent un triplement du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans les membranes des cellules SH\_SY5Y.

**c- Impact d'un enrichissement du milieu en DHA :** Suite à l'enrichissement en DHA 70  $\mu\text{M}$  pendant 72h, la composition membranaire en AGPI n-3 est doublée dans la PE. Ceci est dû principalement à une augmentation de la proportion en DHA dans les membranes, mais également dans une moindre mesure à une augmentation de la teneur en EPA, par rétroconversion du DHA. A l'inverse, la proportion en AGPI n-6 est diminuée de 50% au niveau de la PE. Cette diminution des AGPI n-6 est due à une réduction des taux d'AA (-50% en moyenne) et de DPA n-6 (-70% en moyenne). Ces modulations de composition membranaire induisent une diminution du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans les membranes des cellules SH\_SY5Y, qui est divisé par 4 dans la PE.

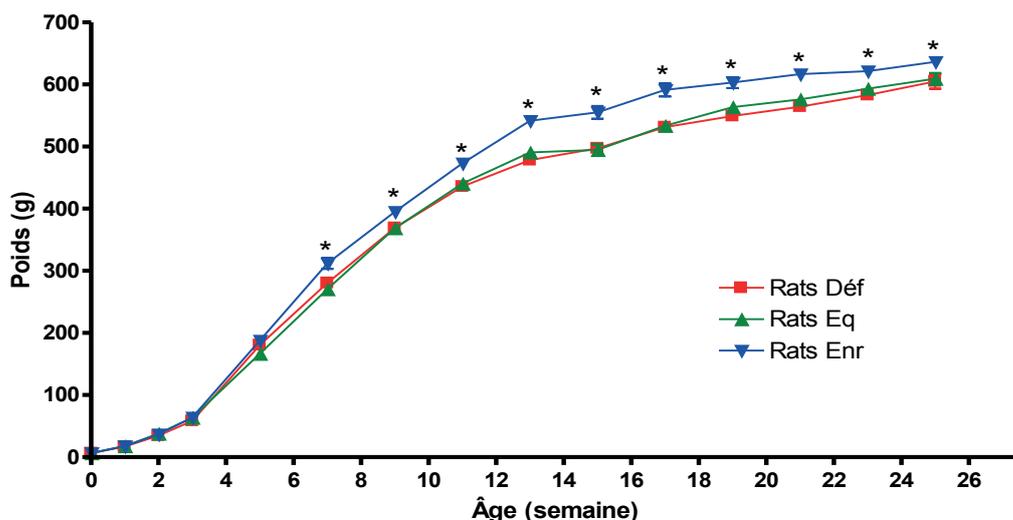
### II.2.3 Impact de l'OH-C 100nM sur la composition lipidique des membranes neuronales

Deux approches ont été utilisées afin d'étudier l'impact de l'OH-C 100nM sur la composition lipidique des membranes des cellules SH\_SY5Y. La première approche consiste à caractériser l'effet de l'OH-C 100nM sur l'incorporation des lipides membranaires ; pour cela, les cellules ont été préalablement incubées pendant 24h avec de l'OH-C 100nM avant les traitements en AGPI. La deuxième approche, à l'inverse, vise à regarder l'effet de l'OH-C 100nM sur la dégradation des lipides membranaires ; dans cet objectif, après une incubation de 48h avec les AGPI, permettant leur incorporation dans les membranes, les cellules ont été soumises ou non à un traitement de 24h à l'OH-C 100nM.

**a- Impact de l'OH-C 100nM sur l'incorporation des lipides membranaires (Tableau 17):** Le traitement à l'OH-C 100nM semble favoriser l'incorporation des AGPI, en augmentant la somme totale des AGPI n-3 et n-6. Les résultats montrent notamment une augmentation de la proportion d'EPA suite à l'incubation à l'OH-C 100nM, quel que soit le traitement préalable des cellules en AGPI. Cette augmentation de l'EPA s'accompagne d'une hausse du contenu membranaire en AA chez les cellules supplémentées en AA et en DHA chez les cellules supplémentées en DHA. Ainsi, l'OH-C 100 nM semble accentuer l'incorporation des AGPI disponibles dans le milieu.

**b- Impact de la corticostérone sur le turnover des lipides membranaires (Annexe 4):** une incubation à l'OH-C 100 nM réalisée sur des cellules préalablement enrichies en AGPI ne modifie pas le contenu en acides gras des membranes. Ainsi l'OH-C 100nM ne semble pas avoir d'impact sur la dégradation des acides gras membranaires.

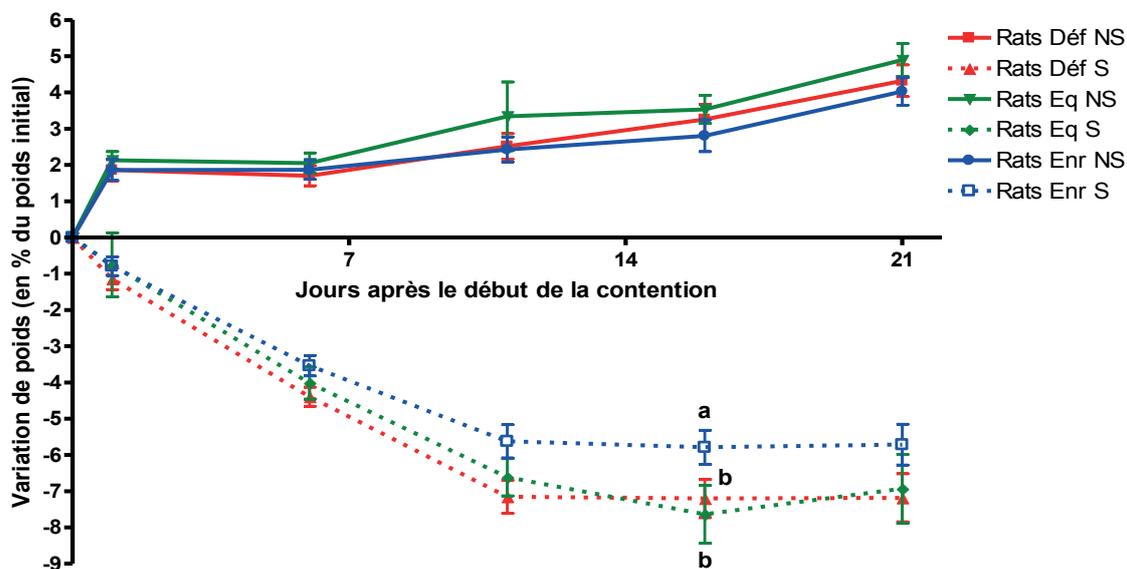
**En résumé,** comme pour les astrocytes, l'enrichissement du milieu de culture en AA favorise l'incorporation des AGPI n-6 (AA et DPA n-6) dans les membranes au détriment des AGPI n-3 (en particulier DHA), tandis que l'enrichissement du milieu de culture en DHA augmente la proportion en AGPI n-3 (DHA et EPA) dans les membranes et réduit celle en AGPI n-6 (AA et DPA n-6). L'ajout d'OH-C 100nM semble favoriser l'incorporation des AGPI, en particulier de l'EPA dans les membranes.



**Figure 39 : Croissance pondérale des rats de la naissance à l'âge de 6 mois**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3

Les rats mâles de 1<sup>e</sup> génération recevant un régime déficient en AGPI n-3, équilibré ou enrichi en AGPI-LC n-3 sont pesés de la naissance à l'âge de 6 mois. Les résultats (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=52 par groupe) ont été analysés par une ANOVA 2 facteurs (régime\*âge) sur mesures répétées. Un effet global de l'âge ( $F(4,2722)=7254,91$  ;  $p<0,001$ ) reflète la croissance des rats. Les effets des régimes ont été caractérisés par des tests post-hoc de Bonferroni. \* : effet significatif de l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 ( $p<0,05$ )



**Figure 40 : Variation de poids des rats au cours de la période de stress de contention**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

L'évolution de la croissance pondérale des rats recevant les différents régimes (déficients en AGPI n-3, équilibré ou enrichi en AGPI-LC n-3) a été étudiée au cours de la période de stress. Les résultats (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=44 par groupe) sont exprimés en pourcentage du poids initial. L'analyse par ANOVA 2 (stress\*jours passés en contention) sur mesures répétées montre une diminution de la prise de poids suite au stress chez les rats déficients en AGPI n-3 ( $F(1,372)=846,402$  ;  $p<0,001$ ), équilibrés ( $F(1,369)=394,863$  ;  $p<0,001$ ) et enrichis en AGPI-LC n-3 ( $F(1,352)=699,993$  ;  $p<0,001$ ). L'impact du régime chez les rats stressés a été évalué par une ANOVA 2 (régime\* jours passés en contention) sur mesures répétées suivies de tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du régime alimentaire chez les rats stressés à un jour de contention donné ( $p<0,05$ ).

## Partie 2 : Effet du statut en AGPI n-3 sur la réponse au stress chez le rat

### I. Etudes des marqueurs du stress

#### *1.1. Croissance pondérale et prise alimentaire*

##### 1.1.1 Croissance pondérale de la naissance à l'âge adulte

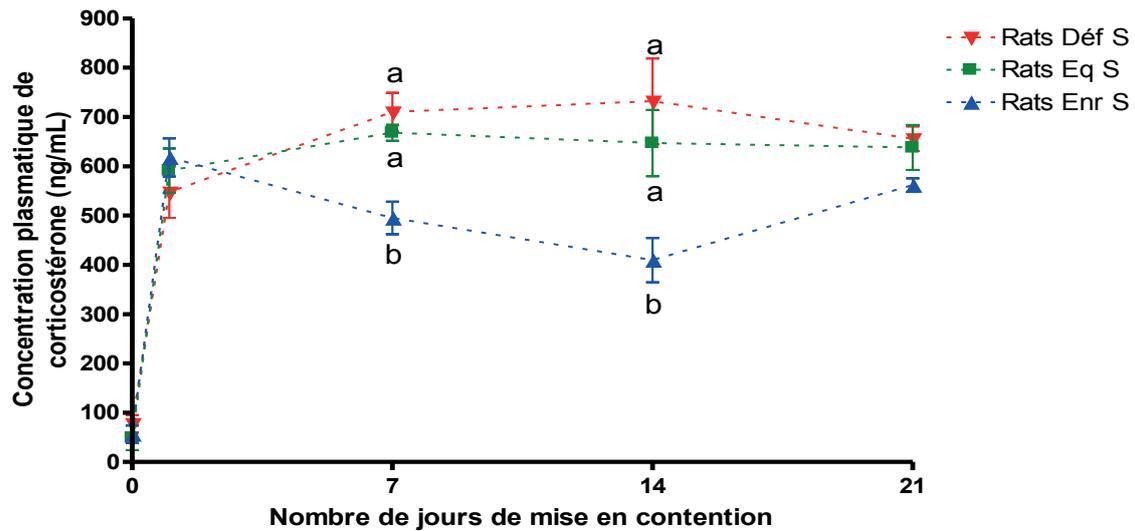
A la naissance, les ratons ont un poids moyen de 6,5 g quel que soit le régime alimentaire de leur mère, puis ils vont prendre du poids de manière significative jusqu'à l'âge de 6 mois ( $p < 0,001$ ). Dès l'âge de 7 semaines, les ratons alimentés avec le régime enrichi en AGPI-LC n-3 présentent un poids significativement supérieur à celui des deux autres groupes alimentaires (+36g, soit une augmentation de 13% en moyenne par rapport aux ratons équilibrés ; +27g, soit une augmentation de 10% en moyenne par rapport aux ratons déficients en AGPI n-3) ( $p < 0,001$ ). Cette différence persiste jusqu'à l'âge de 6 mois (+32g, soit une augmentation de 5% en moyenne par rapport aux rats équilibrés ( $p = 0,044$ ) et aux rats déficients en AGPI n-3 ( $p = 0,013$ ) (**Figure 39**).

##### 1.1.2 Evolution du poids au cours du stress de contention

L'évolution du poids au cours de la période de 21 jours (hors week-end) de stress de contention, exprimée en pourcentage de variation par rapport au poids en début de contention, est représentée dans la **Figure 40**.

**a- Impact du protocole de stress sur la croissance pondérale :** Durant toute la période de stress de contention, les rats perdent significativement du poids, quel que soit leur régime alimentaire, tandis que les animaux non stressés continuent à augmenter leur poids corporel. A l'issue des 21 jours de contention, les animaux stressés ont perdus en moyenne  $40,9 \pm 3,6$  g pour le lot déficient en AGPI n-3,  $41,8 \pm 5,8$  g pour le lot équilibré et  $37,0 \pm 3,7$  g pour le lot enrichi en AGPI-LC n-3. A l'inverse, les animaux non stressés ont pris en moyenne  $4,4 \pm 0,2$  g quel que soit leur régime alimentaire.

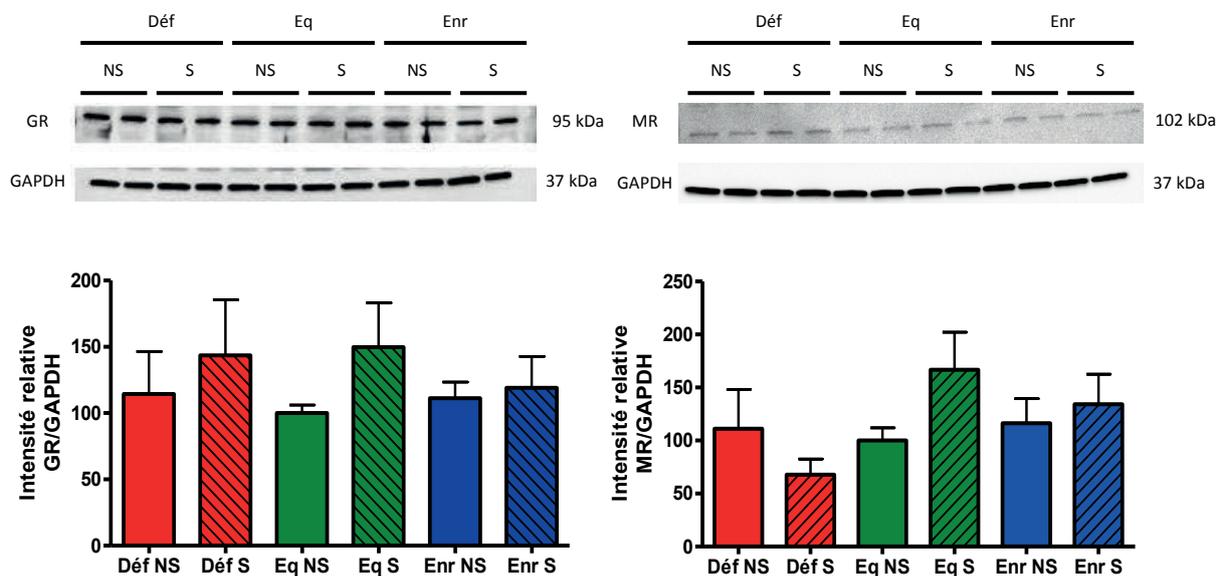
**b- Modulation de l'effet du stress par les apports alimentaires en AGPI n-3 :** Les animaux stressés, quel que soit leur régime alimentaire, perdent significativement du poids jusqu'au 14<sup>e</sup> jour de contention ( $p < 0,001$ ), puis leur poids se stabilise. Les animaux recevant un régime enrichi en AGPI-LC n-3 perdent globalement moins de poids, en pourcentage du



**Figure 41 : Evolution de la concentration de corticostérone plasmatique mesurée 30 minutes après la mise en contention des rats au fil des 21 jours de stress**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; S : Stressés

Le pic de corticostérone plasmatique à 30 minutes a été évalué par RIA à J1, J7, J14 et J21 de mise en contention. Les résultats (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 9 par groupe), exprimés en ng/mL de plasma, ont été analysés par ANOVA 2 (régime\*nombre de jours passés en contention) sur mesures répétées suivies de tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du régime alimentaire chez les rats stressés à un jour de contention donné ( $p < 0,05$ ).



**Figure 42 : Expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et MR au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe chez le rat**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

L'expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes, GR et MR, a été évaluée par Western Blot chez les rats déficients en AGPI n-3, équilibrés ou enrichis en AGPI-LC n-3, soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=10 par groupe) correspondent aux ratios d'intensité GR/GAPDH ou MR/GAPDH, exprimés en pourcentage de la valeur obtenue chez les rats équilibrés NS. L'analyse des résultats par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni ne montre aucun effet du régime ou du stress sur l'expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes, GR et MR.

poids initial, que les animaux déficients en AGPI n-3 ( $p=0,007$ ) et que les animaux équilibrés ( $p=0,042$ ) ; cette différence entre les régimes alimentaires est significative au 21<sup>e</sup> jour de contention ( $p=0,04$ ).

## ***1.2. Dosage de la corticostérone plasmatique***

### ***1.2.1 Impact du régime alimentaire sur le taux basal de corticostérone plasmatique***

Le taux basal de corticostérone plasmatique est respectivement de  $68,9 \pm 10,3$  ng/mL chez les rats déficients en AGPI n-3,  $68,9 \pm 19,4$  ng/mL chez les équilibrés et  $85,2 \pm 19,6$  ng/mL chez les enrichis en AGPI-LC n-3, sans différence significative entre les trois lots (ANOVA 1).

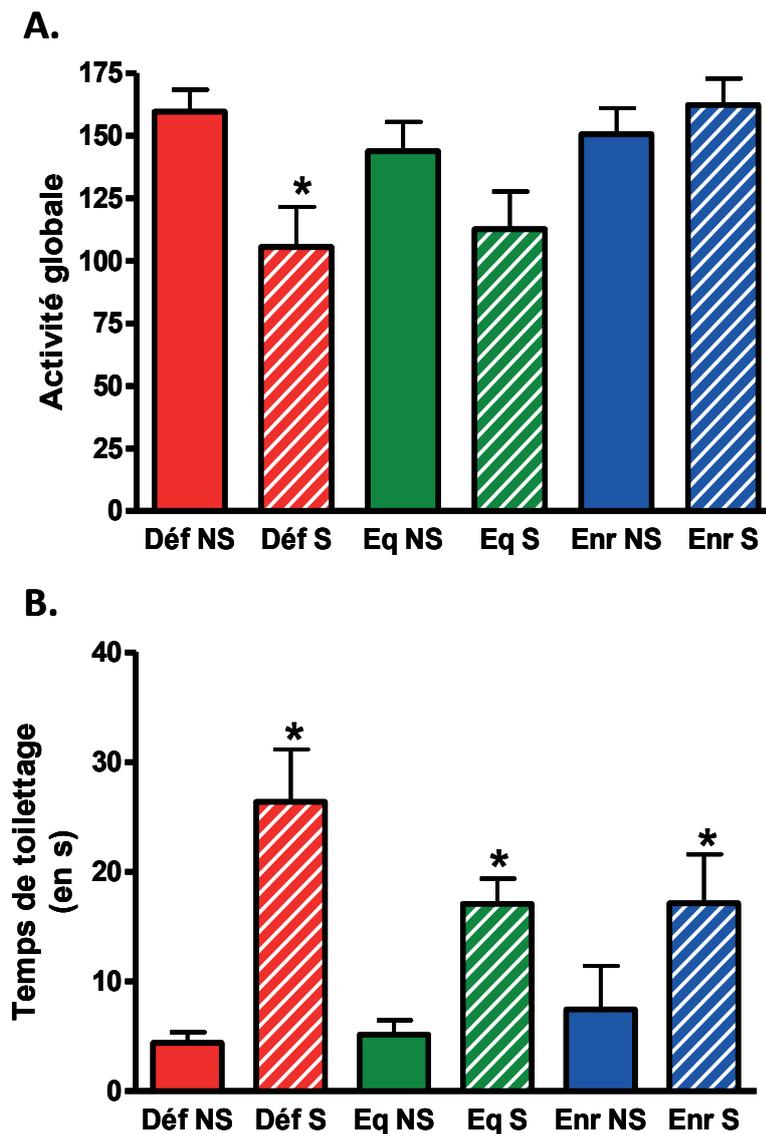
### ***1.2.2 Evolution du taux de corticostérone plasmatique au cours des 21 jours de contention***

***a- Evolution au cours d'une journée de contention*** : les rats présentent un pic important du taux de corticostérone plasmatique 30 minutes après la mise en contention. Ce pic oscille en moyenne entre 450ng/mL et 730ng/mL, mais son amplitude varie en fonction du régime alimentaire et du jour de prélèvement comme il est décrit par la suite. Le taux de corticostérone diminue ensuite légèrement jusqu'à l'issue des 6 heures de stress, se stabilisant en moyenne autour de 440 ng/mL, sans différence entre les lots alimentaires.

***b- Evolution du pic de corticostérone observé 30 minutes après la mise en contention (Figure 41)***: nos résultats montrent que, chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, le pic de corticostérone après 30 minutes de stress de contention est globalement inférieur à celui observé chez les rats déficients en AGPI n-3 ( $p<0,001$ ) ou équilibrés ( $p=0,003$ ). Cette différence est significative au 7<sup>e</sup> ( $p=0,006$  vs. déficients en AGPI n-3 et  $p=0,033$  vs. animaux équilibrés) et au 14<sup>e</sup> jour de contention ( $p<0,001$  vs. déficients en AGPI n-3 et  $p=0,002$  vs. équilibrés).

## ***1.3. Analyse des récepteurs aux corticostéroïdes***

L'expression protéique des récepteurs aux corticostéroïdes, GR et MR, a été analysée par Western Blot, au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (**Figure 42**). Quel que soit leur régime alimentaire ou leur état de stress, tous les animaux présentent des niveaux



**Figure 43 : Activité globale et temps de toilettage mesurés lors d'un test d'openfield**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

Les rats sont étudiés sur un labyrinthe d'openfield, au cours duquel l'activité globale (définie comme la somme des traversées et des redressements) et le temps de toilettage des animaux ont été évalués (Moyenne ± SEM ; n= 12 par groupe). L'analyse des résultats par ANOVA 2 (régime\*stress) montre un effet global du stress sur l'activité globale ( $F(1,66)=5,613$  ;  $p=0,021$ ) et sur le temps de toilettage ( $F(1,62)=28,298$  ;  $p<0,001$ ). Cette analyse a été suivie de tests post-hoc de Bonferroni. \* : effet significatif du stress par rapport au témoin non stressé du même lot alimentaire ( $p<0,05$ )

d'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et MR équivalents au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe.

**En résumé**, le protocole de stress est caractérisé par une réduction de la croissance pondérale des rats, ainsi que par une augmentation de la concentration plasmique en corticostérone, sans modification de l'expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau de l'hippocampe. Ces effets sont limités chez les rats recevant le régime enrichi en AGPI-LC n-3.

## **II. Etude comportementale**

### ***II.1. Mesure de l'activité locomotrice***

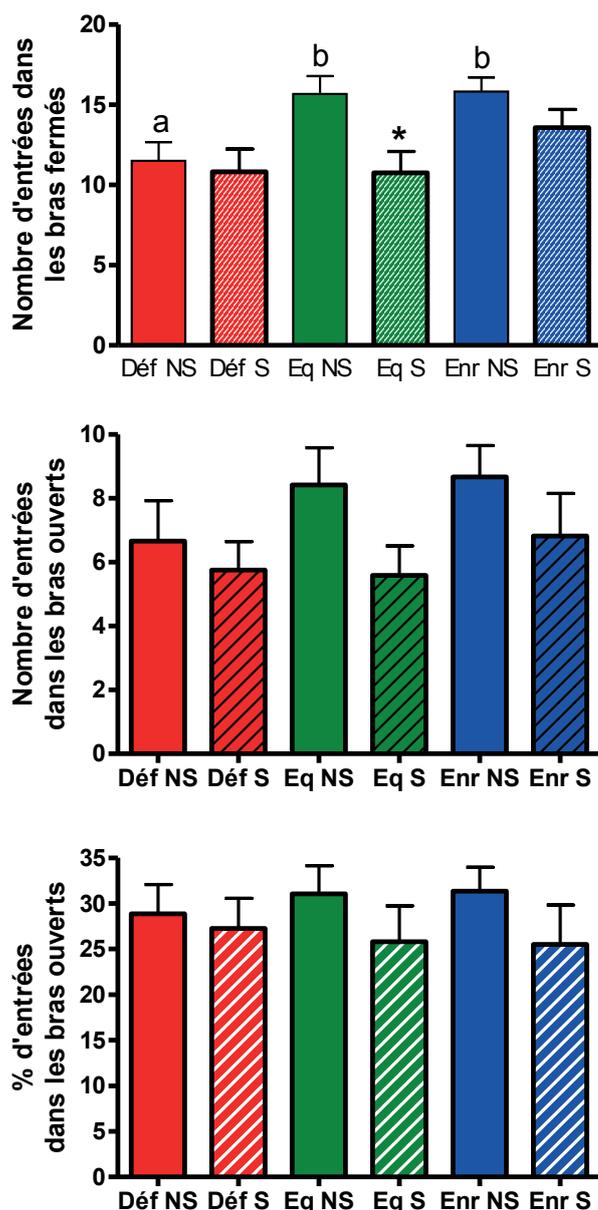
#### **II.1.1 Openfield**

Les résultats montrent que les animaux restent en périphérie du dispositif et ne réalisent en moyenne que  $2,3 \pm 0,3$  entrées dans le centre du dispositif, tous groupes confondus. Nous avons donc décidé d'analyser l'activité des rats sur l'ensemble du dispositif, sans distinction entre les zones centrales et périphériques.

L'activité globale est définie comme la somme de l'activité locomotrice (nombre de traversées) et de l'activité exploratoire (nombre de redressements) au sein du labyrinthe (**Figure 43A**). Le protocole de stress réduit globalement l'activité des rats. Cependant, cet effet n'est significatif que chez les rats déficients en AGPI n-3 (- 34% ;  $p=0,003$ ). De plus, on observe un effet du régime chez les rats stressés. En effet, chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, l'activité globale n'étant pas réduite suite au protocole de stress, elle est significativement supérieure à celle des rats équilibrés ( $p=0,006$ ) et déficients en AGPI n-3 ( $p=0,002$ ).

#### **II.1.2 Test d'actimétrie**

L'analyse statistique par ANOVA 2 (régime x stress) ne montre aucun effet du régime alimentaire, du stress ou des interactions entre les 2 facteurs. Ainsi, quel que soit leur groupe expérimental, les rats effectuent en moyenne  $26,3 \pm 1,7$  quarts de tour/10 minutes.



**Figure 44 : Nombre d'entrées dans les différents compartiments sur le labyrinthe en croix surélevé**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

Le nombre d'entrées des rats dans les différents types de bras d'un labyrinthe en croix surélevé ont été étudiés (Moyenne  $\pm$  SEM ; n= 12 par groupe). L'analyse des résultats par ANOVA 2 (régime\*stress) montre un effet global du stress sur le nombre d'entrées dans les bras fermés ( $F(1,65)=3,932$  ;  $p=0,009$ ) et dans les bras ouverts ( $F(1,65)=4,283$  ;  $p<0,05$ ). Cette analyse a été complétée par des tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du régime alimentaire observé chez les rats NS ( $p<0,05$ ) ; \* : effet significatif du stress par rapport au témoin non stressé du même lot alimentaire ( $p<0,05$ )

## **II.2. Réponse émotionnelle**

### **II.2.1 Mesure du temps de toilette dans l'openfield (Figure 43B)**

Alors que les rats non stressés se toilettent globalement peu ( $5.6 \pm 1.3$  secondes en moyenne), le protocole de stress augmente le temps de toilette d'un facteur 5 chez les rats déficients en AGPI n-3 ( $p < 0,001$ ), d'un facteur 3 chez les équilibrés ( $p = 0,014$ ) et d'un facteur 2 chez les enrichis en AGPI-LC n-3 ( $p = 0,044$ ). Ainsi, plus les apports en AGPI n-3 sont élevés, plus l'impact du stress sur le temps de toilette semble réduit.

### **II.2.2 Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze) (Figure 44)**

Lors de leur passage sur le labyrinthe en croix surélevé, les rats, quel que soit leur groupe expérimental, ont très peu exploré les bras ouverts. Tout groupe confondu, ils n'y ont ainsi passé que  $6,7 \pm 1,1$  % du temps (soit en moyenne  $20,2 \pm 3,3$  secondes), contrairement au 20-30% habituellement observé dans ce test (Carobrez et Bertoglio, 2005). Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement au nombre d'entrées dans les bras fermés et dans les bras ouverts.

#### **A- NOMBRE D'ENTREES DANS LES BRAS FERMES:**

La déficience en AGPI n-3 est associée à une diminution du nombre d'entrées dans les bras fermés comparativement aux animaux équilibrés (-26% ;  $p = 0,047$ ), tandis que l'enrichissement en AGPI-LC n-3 ne présente aucun effet sur ce paramètre.

Le stress de contention, en réduisant le nombre d'entrées dans les bras fermés de 31% chez les équilibrés ( $p = 0,005$ ), semble mimer les effets de la déficience en AGPI n-3 sur ce paramètre. Cet effet est limité chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 (-13% ; ns).

#### **B- NOMBRE D'ENTREES DANS LES BRAS OUVERTS:**

Les rats explorant peu les bras ouverts, nous avons choisi, afin de déterminer leur degré d'intéressement pour ce type de bras, de considérer comme une entrée lorsque la moitié antérieure des rats est sur le bras. Le stress chronique de contention réduit globalement le nombre d'entrées dans les bras ouverts, sans effet du régime ni d'interaction. Cependant, si on considère le % d'entrées dans les bras ouverts/entrées totales, aucun effet significatif du stress ni du régime n'est observé.

		Déf		Eq		Enr	
		NS	S	NS	S	NS	S
12 h de jour	Eau (en g)	10,1 ± 1,3	13,3 ± 1,7	9,3 ± 0,9	11,2 ± 1,7	10,4 ± 1,9	11,9 ± 1,4
	Sucrose (en g)	18,0 ± 1,9	25,9 ± 3,2	21,8 ± 2,4	24,0 ± 3,5	22,9 ± 2,5	28,9 ± 4,0
	Eau + Sucrose (en g)	29,0 ± 1,6	39,2 ± 2,3*	31,1 ± 2	35,2 ± 2,9	34,6 ± 1,6	40,8 ± 3,6
	Préférence au sucrose	64,2 ± 4,9	63,2 ± 5,7	67,0 ± 4,9	64,5 ± 6,1	69,6 ± 5,5	67,5 ± 5,4
12h de nuit	Eau (en g)	4,8 ± 0,7	6,4 ± 0,8	3,8 ± 0,4	6,7 ± 1,0*	4,4 ± 0,6	4,9 ± 0,6
	Sucrose (en g)	27,7 ± 4,3	35,9 ± 6,3*	22,7 ± 2,5	30,6 ± 6,9	19,0 ± 3,5	32,6 ± 4,2*
	Eau + Sucrose (en g)	32,5 ± 4,1	42,4 ± 6,0	26,5 ± 2,5	37,3 ± 6,6	23,4 ± 4	37,5 ± 4,4*
	Préférence au sucrose	82,7 ± 3,4	81,8 ± 3	84,0 ± 1,9	75,8 ± 6,5	76,9 ± 3,6	85,8 ± 1,6
24h	Eau (en g)	16,5 ± 1,9	22,0 ± 2,4	14,8 ± 0,9	20,1 ± 2,5	16,2 ± 2,8	19,0 ± 1,6
	Sucrose (en g)	46,8 ± 5,2	59,8 ± 8,5	43,7 ± 2,8	52,3 ± 10,0	40,9 ± 3,9	62,7 ± 6,1*
	Eau + Sucrose (en g)	63,2 ± 4,8	81,8 ± 7,2*	58,5 ± 2,4	72,5 ± 9,2	57,1 ± 4,2	81,8 ± 5,7*
	Préférence au sucrose	72,2 ± 4,4	70,2 ± 4,2	74,0 ± 2,3	66,7 ± 6,3	71,3 ± 5,1	75,1 ± 3,2

**Tableau 18 : Quantité d'eau, de sucrose, de liquide total consommée et préférence au sucrose mesurés pendant les 24h (12h de phase diurne et les 12h de phase nocturne) suivant la privation d'eau de 20h**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

Les quantités d'eau et de sucrose consommées, ainsi que la préférence au sucrose ont été mesurées en période diurne et en période nocturne, suite à une privation d'eau pendant 20h (Moyenne ± SEM ; n = 16 par groupe). L'analyse statistique par ANOVA 2 (régime\*stress) révèle un effet global du stress sur la quantité totale (eau+sucrose) de liquide consommé (F(1,64)=14,781 ; p<0,001) au cours des 24h. Ceci se reflète par un effet global du stress sur la quantité de sucrose (F(1,64)=7,008 ; p=0,01), ainsi que sur la quantité d'eau consommées (F(1,64)=7,016 ; p=0,01). Des tests post-hoc de Bonferroni ont permis de compléter l'analyse des résultats. Aucun effet du régime alimentaire n'a été mis en évidence. \* : effet significatif du stress par rapport aux rats NS du même lot alimentaire (p < 0,05)

### II.2.3 Test de préférence au sucrose (Tableau 18)

Les quantités d'eau et de sucrose consommées, ainsi que la préférence au sucrose ont été mesurées en période diurne et en période nocturne, correspondant respectivement aux phases de repos et d'activité des animaux.

#### **A- QUANTITE DE FLUIDES CONSOMMEE**

D'une manière générale, les rats non stressés consomment en moyenne  $31,6 \pm 1,4$  g de liquide total en phase diurne,  $27,5 \pm 2,8$  g en phase nocturne et  $59,6 \pm 3,5$  g sur 24h. Aucune différence n'est observée entre les différents lots alimentaires. Les résultats étant similaires entre les 2 phases de la journée considérées, nous avons donc, par la suite, choisi de considérer uniquement les quantités de fluides consommées sur une période totale de 24h.

Aucun effet du régime n'est observé. En revanche, le protocole de stress induit une augmentation de la consommation de sucrose et d'eau, de 30% chez les déficients en AGPI n-3 ( $p=0,036$ ), de 24% chez les équilibrés (ns) et de 43% chez les enrichis en AGPI-LC n-3 ( $p=0,006$ ).

#### **B- PREFERENCE AU SUCROSE**

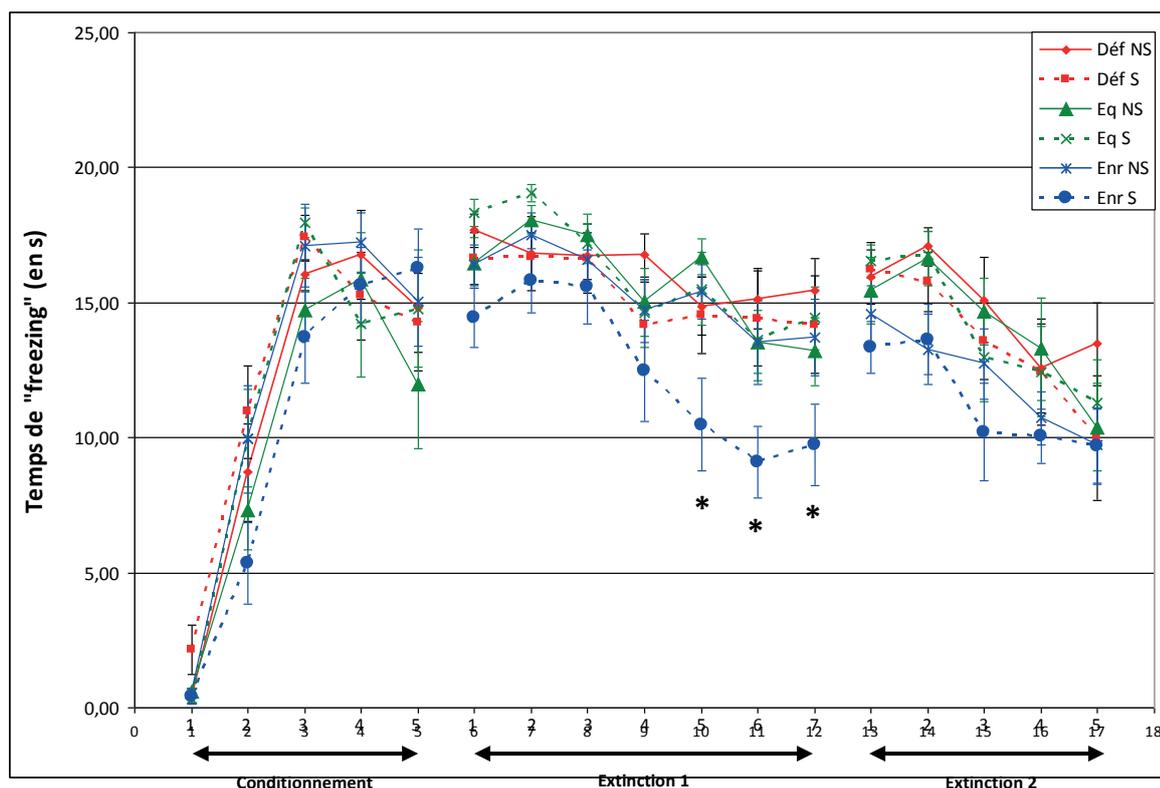
La préférence au sucrose est exprimée en pourcentage de liquide total consommé. D'une manière générale, les rats ont une nette préférence pour le sucrose qui représente en moyenne 66% de leur consommation. Aucun effet du régime alimentaire ou du stress n'est observé sur ce paramètre.

### II.2.4 Peur conditionnée

L'évolution du temps de freezing des animaux au cours des phases d'acquisition et d'extinction de la peur conditionnée est reportée dans la **Figure 45**.

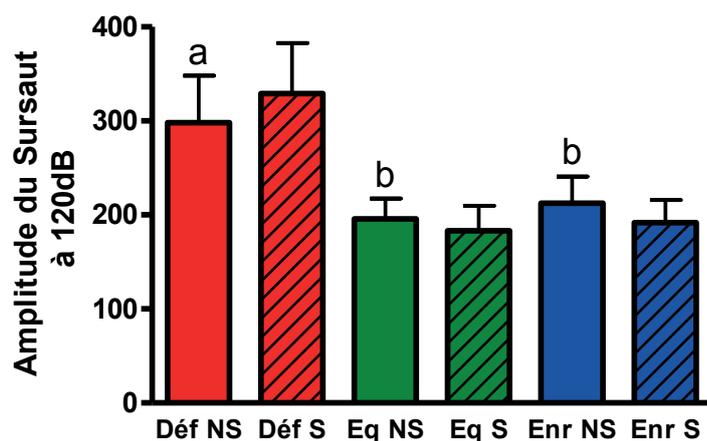
#### **A- PHASE D'ACQUISITION**

Au fur et à mesure des différentes sessions d'acquisition, le temps de freezing des animaux durant les 20 secondes de son augmentent de manière significative attestant de la mise en place de l'apprentissage. Ainsi, si lors de la première association son-choc électrique, les animaux s'immobilisent en moyenne pendant moins d'une seconde, le temps



**Figure 45 : Evolution du temps de « freezing » mesuré au cours de la phase d'acquisition et des 2 jours d'extinction d'une peur conditionnée**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 Les rats ont été soumis aux phases d'acquisition et d'extinction d'une peur conditionnée (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 12 par groupe). Pour chaque phase de l'étude, les résultats ont été analysés de la manière suivante : 1) ANOVA 2 (régime x sessions) sur mesures répétées sur les données des rats NS afin d'étudier l'effet du régime, 2) ANOVA 2 (stress x sessions) sur mesures répétées pour chaque régime alimentaire afin d'étudier l'effet du stress et 3) ANOVA 2 (régime\*stress) pour chaque session. Tous les tests statistiques ont été suivis de tests post-hoc de Bonferroni. \* : significativement différents des autres groupes ( $p < 0,05$ )



**Figure 46 : Amplitude du sursaut au son de 120 dB observé chez les rats**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 La réaction au sursaut a été étudiée chez les rats recevant différents régimes alimentaires (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 16 par groupe). Les résultats ont été analysés par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS ( $p < 0,05$ )

de « freezing » lors de la 5<sup>e</sup> session de son-choc s'élève en moyenne de 15 secondes. A l'issue de cette phase d'acquisition, les rats sont donc conditionnés à la peur du stimulus conditionnel, quel que soit leur régime alimentaire ou leur état de stress.

## **B- PHASE D'EXTINCTION**

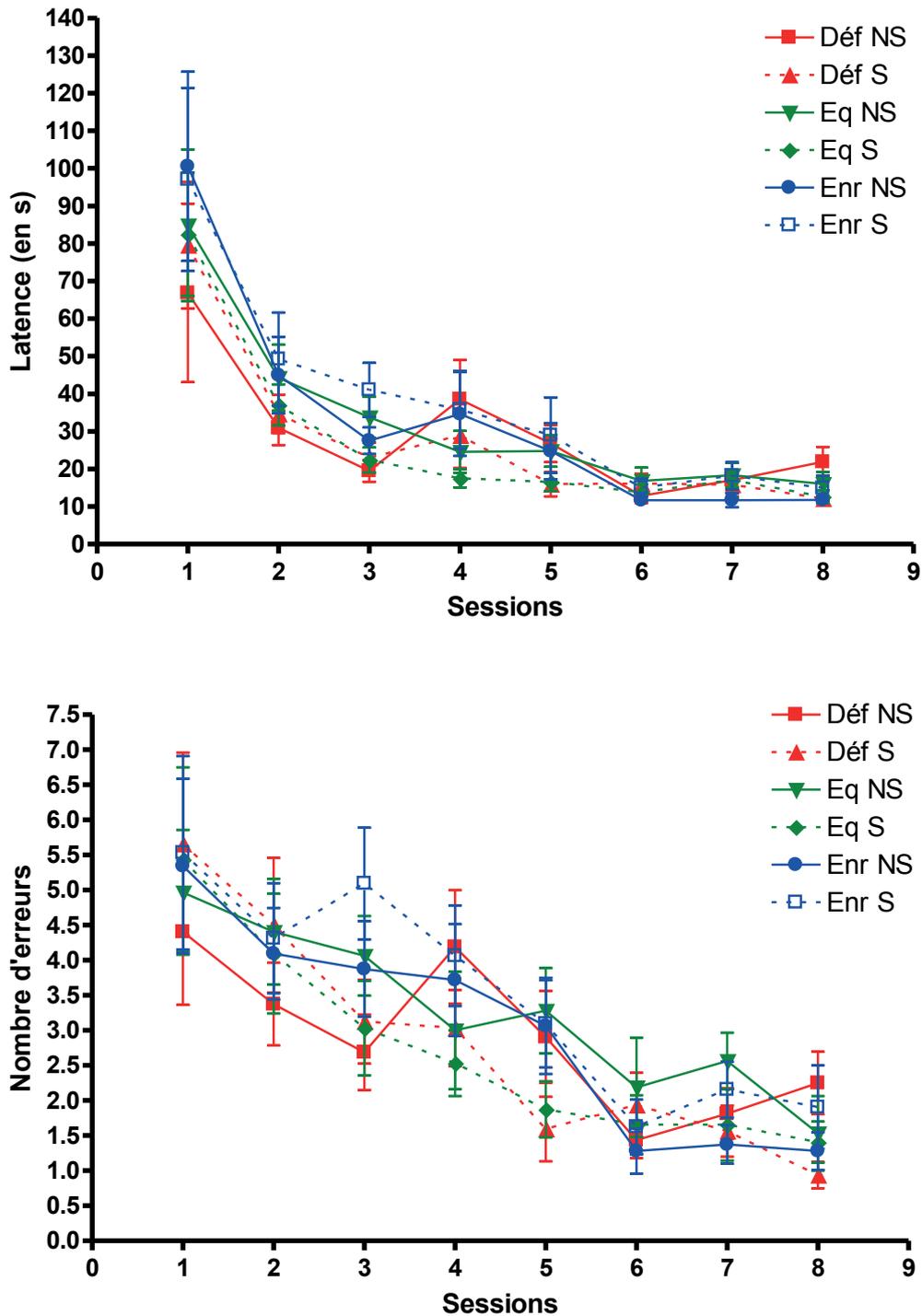
La phase d'extinction a été réalisée sur 2 jours consécutifs. Le temps de freezing est moyenné par bloc de 3 sons consécutifs.

Nos résultats montrent que tous les rats réduisent globalement leur temps de freezing au son de 17% au cours de J1 ( $p=0,035$ ) et de 30% au cours de J2 ( $p=0,002$ ). Ainsi, quel que soit leur régime alimentaire ou leur état de stress, les rats atténuent leur réaction de peur préalablement conditionnée au fur et à mesure des blocs, attestant de l'extinction de la peur conditionnée. Cependant, on note, chez les rats non stressés, qu'au cours du 2<sup>e</sup> jour d'extinction, les rats enrichis en AGPI n-3 présentent un temps de freezing globalement inférieur aux 2 autres lots alimentaires, de 18% vs. les rats déficients en AGPI n-3 ( $p=0,007$ ) et de 13% vs. les rats équilibrés ( $p=0,083$ ), suggérant ainsi une extinction plus rapide.

Chez les rats stressés, le profil d'extinction est équivalent entre les rats stressés équilibrés et déficients en AGPI n-3, alors qu'on note une nette réduction du temps de freezing chez les rats stressés enrichis en AGPI-LC n-3 comparativement aux 2 autres groupes à J1, suggérant une extinction plus rapide ou facilitée. Cependant, cet effet n'est plus observé à J2.

### **III.2.5 Réaction de sursaut (Figure 46)**

Nos résultats ont montré que la réaction de sursaut au son de 120dB est globalement plus élevée de 60 % chez les animaux déficients en AGPI n-3 comparativement aux équilibrés ( $p=0,0415$ ) et aux enrichis en AGPI-LC n-3 ( $p=0,097$ ). Aucun effet du stress n'est observé sur ce paramètre.



**Figure 47 : Latence et nombre d'erreurs effectuées avant d'entrer dans l'issue mesurés lors de la phase l'apprentissage spatial sur le labyrinthe de Barnes**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 Les capacités d'apprentissage spatial des rats ont été testés sur un labyrinthe de Barnes (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 16 par groupe). Les résultats ont été analysés statistiquement de la manière suivante : 1) par une ANOVA 2 (régime\*sessions) sur mesures répétées sur les données des rats NS afin d'étudier l'effet du régime, 2) par une ANOVA 2 (stress\*sessions) sur mesures répétées pour chaque régime alimentaire afin d'étudier l'effet du stress et 3) par une ANOVA 2 (régime\*stress) pour chaque session. Tous les tests statistiques ont été suivis de tests post-hoc de Bonferroni. On observe un effet global des sessions, dénotant de l'apprentissage des rats. Aucune différence entre les différents lots expérimentaux n'est mise en évidence.

### ***II.3. Apprentissage : Labyrinthe de Barnes***

#### **II.3.1 Apprentissage spatial**

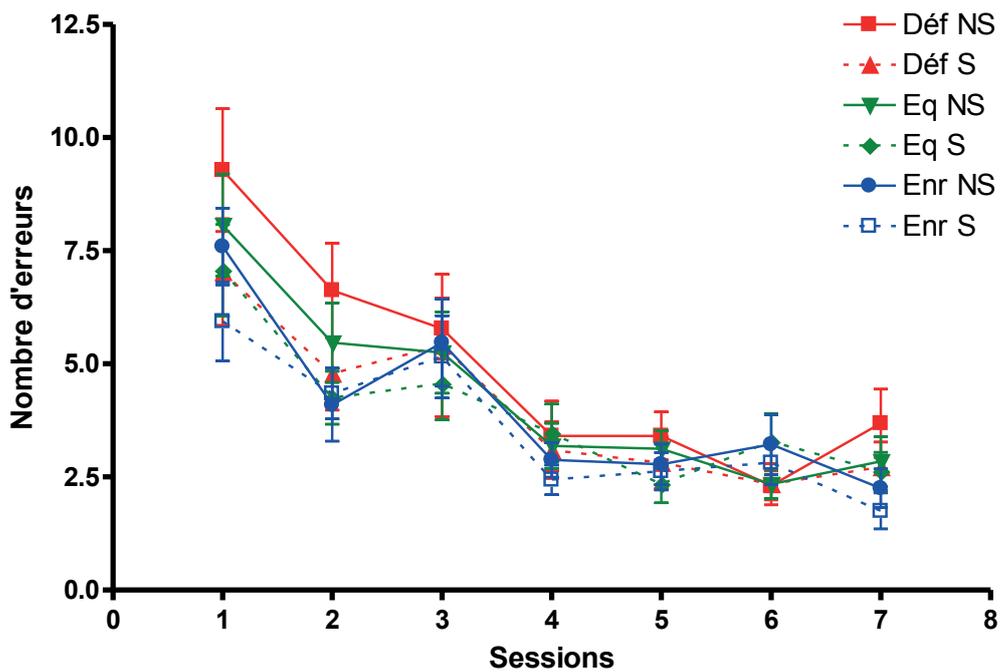
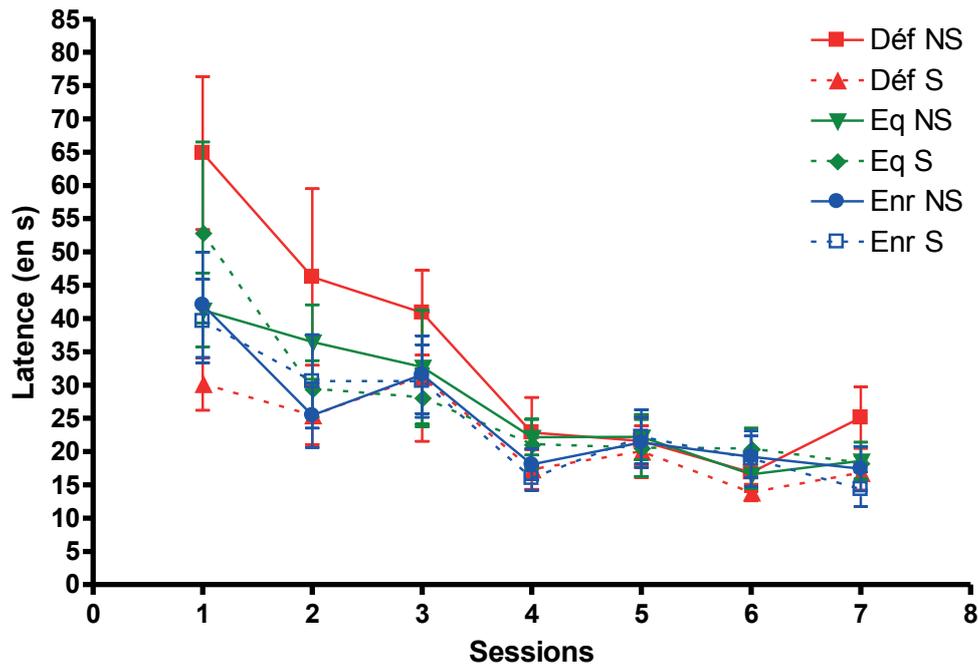
Dans ce test, les rats doivent apprendre à repérer un trou « issue » à position fixe sur le labyrinthe ; ils sont soumis au test 2 fois par jour pendant 8 jours. La latence, ainsi que le nombre d'erreurs (hors trous adjacents) effectuées avant d'entrer dans le trou « issue » sont comptabilisées et moyennées par jour. La **Figure 47** représente les résultats obtenus au cours des 8 sessions successives.

Quel que soit le groupe expérimental considéré, les rats mettent en place un apprentissage de la localisation du trou « issue ». Ainsi, si le premier jour, les animaux mettent en moyenne  $85,2 \pm 8,6$  secondes en faisant en moyenne  $5,2 \pm 0,5$  erreurs pour trouver le trou « issue », la latence n'est plus que de  $14,8 \pm 1,1$  secondes avec  $1,5 \pm 0,1$  erreurs environ lors de la 8<sup>e</sup> session. Aucune différence significative liée au régime alimentaire ou au protocole de stress de contention n'a été mise en évidence sur les capacités d'apprentissage spatial des animaux dans ce test.

#### **III.3.2 Rétention**

La rétention de cet apprentissage est testée une semaine après la fin de l'apprentissage spatial. D'une manière générale, les animaux se souviennent de l'emplacement du trou. En effet, tout groupe confondu, ils mettent en moyenne  $12,5 \pm 1,4$  secondes pour aller s'y réfugier, avec en moyenne  $1,3 \pm 0,2$  erreurs.

Un second test nous a permis d'étudier le comportement des animaux pendant une minute lorsqu'ils n'ont plus accès à la boîte « issue », et plus particulièrement leur obstination à rester autour de l'emplacement de l'ancien trou « issue » malgré son absence. Tout groupe confondu, les animaux vont rapidement vers l'ancien trou « issue » ( $11,1 \pm 1,2$  secondes) et n'effectuent qu'en moyenne  $1,1 \pm 0,2$  erreurs avant cette première visite. Au cours de la minute de test, ils passeront en moyenne  $27,1 \pm 1,0$  secondes dans le quart du labyrinthe comprenant l'ancien trou « issue » et y feront  $3,4 \pm 0,2$  visites. Ces résultats montrent que les rats, quel que soit leur régime, stressés ou non, se souviennent de l'emplacement de l'ancien trou issue.



**Figure 48 : Latence et nombre d'erreurs effectuées avant d'entrer dans l'issue mesurés lors du changement de consignes sur le labyrinthe de Barnes**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 Les capacités d'apprentissage spatial des rats ont été testés sur un labyrinthe de Barnes (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 16 par groupe). Les résultats ont été analysés statistiquement de la manière suivante : 1) par une ANOVA 2 (régime\*sessions) sur mesures répétées sur les données des rats NS afin d'étudier l'effet du régime, 2) par une ANOVA 2 (stress\*sessions) sur mesures répétées pour chaque régime alimentaire afin d'étudier l'effet du stress et 3) par une ANOVA 2 (régime\*stress) pour chaque session. Tous les tests statistiques ont été suivis de tests post-hoc de Bonferroni. On observe un effet global des sessions, dénotant de l'apprentissage des rats.

### III.3.3 Flexibilité Comportementale : Adaptation des animaux à un changement de consigne (Figure 48)

Dans cette phase du test, les animaux doivent apprendre à localiser le trou « issue » qui n'est plus à une position fixe, mais dont l'emplacement variable est indiqué par un cerclage en PVC gris. La latence, ainsi que le nombre d'erreurs effectuées avant d'entrer dans le trou « issue » sont comptabilisées et moyennées par jour.

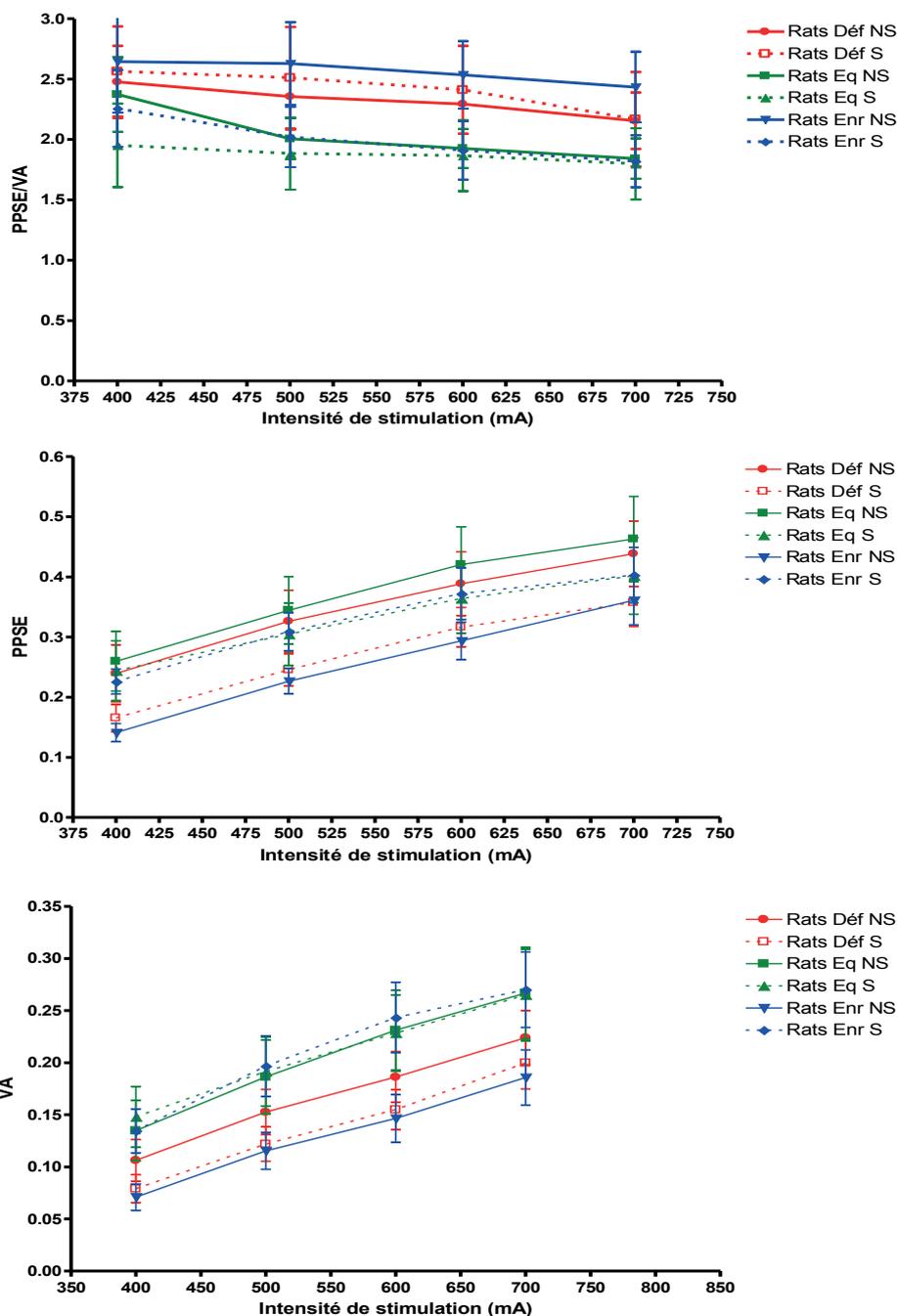
Quel que soit leur régime alimentaire ou leur état de stress, les rats apprennent à repérer le trou « issue » en suivant la nouvelle règle et réduisent ainsi de manière significative leur temps de latence et leur nombre d'erreurs effectuées au fil des sessions.

Les résultats montrent que la déficience en AGPI n-3 augmente la latence à trouver le trou, comparativement aux animaux équilibrés ( $p=0,093$ ) et aux enrichis en AGPI-LC n-3 ( $p=0,015$ ). Cette augmentation de la latence chez les rats déficients en AGPI n-3 s'accompagne d'une augmentation, bien que non significative, du nombre d'erreurs. Cet effet du régime alimentaire sur la latence et le nombre d'erreurs est particulièrement marqué lors des 2 premières sessions de test, alors qu'il n'y a plus de différence entre les lots alimentaires à partir de la 3ème session. Ces résultats suggèrent une flexibilité réduite en condition de déficience en AGPI n-3. Cet effet est inhibé suite au stress chronique de contention.

		Impact du régime chez les non stressés		Impact du protocole de stress			
		Impact de la déficience en AGPI n-3	Impact de l'enrichissement en AGPI-LC n-3	Chez les équilibrés	Chez les déficients en AGPI n-3	Chez les enrichis en AGPI-LC n-3	
Activité locomotrice	<i>mesurée dans le test d'actimétrie</i>	-	-	-	-	-	
	<i>mesurée dans l'openfield</i>	-	-	Réduction globale de l'activité chez les rats stressés			
				-	↓ 34%	-	
Réponse émotionnelle	<i>mesurée dans l'openfield</i>	-	-	Augmentation globale du temps de toilettage chez les rats stressés			
					↑ 300%	↑ 400%	↑ 200%
	<i>mesurée dans le labyrinthe en croix surélevé</i>	-	-	Réduction globale de l'intérêt porté aux bras ouverts chez les rats stressés			
	<i>mesurée dans le test de préférence au sucre</i>	-	-	Augmentation globale de la consommation de liquide suite à une privation en eau chez les rats stressés			
					-	↑ 30%	↑ 43%
	<i>mesurée dans un test de peur conditionnée</i>	-	↓ du temps de freezing le 2e jour de l'extinction		-	↓ du temps de freezing le 1e jour de l'extinction	
<i>mesurée par la réaction au sursaut</i>	↑ 60%	-	-	-	-	-	
Apprentissage sur le labyrinthe de Barnes		↑ erreurs et latence lors du changement de consignes		-	↓ erreurs et latence lors du changement de consignes		

Tableau 19 : Résumé de l'impact du régime alimentaire et du stress chronique de contention sur les paramètres comportementaux des rats

**En résumé,** le stress de contention réduit l'activité locomotrice des rats et augmente leur réponse émotionnelle, notamment en stimulant le comportement de toilettage sur l'openfield, en réduisant le nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé ou en augmentant la consommation de liquide suite à un stress aigu de privation d'eau. Cependant, il ne modifie pas les capacités d'apprentissage des rats sur le labyrinthe de Barnes. Ces effets seront plus ou moins modulés par les apports alimentaires en AGPI n-3 en fonction du test comportemental considéré. Ainsi sur l'openfield, plus les apports alimentaires sont pauvres en AGPI n-3, plus l'impact du stress sur l'activité globale ou le comportement de toilettage est important, tandis que sur le labyrinthe en croix surélevé, le protocole de stress semble mimer les effets de la déficience en AGPI n-3. Enfin, dans certains tests, le stress inhibe les effets spécifiques de l'enrichissement en AGPI-LC n-3 (PPI) ou de la déficience en AGPI n-3 (Barnes). Il ressort de ces résultats que l'impact du stress sur le comportement des rats et sa régulation par les apports alimentaires en AGPI n-3 sont complexes (**Tableau 19**).



**Figure 49 : Courbes d'intensité-réponse mesurées sur des tranches d'hippocampe de rats**

PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur ; VA : Volée Afférente ; Déf : Déficiants en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

L'efficacité synaptique a été évaluée au niveau de l'hippocampe des rats recevant les différents régimes alimentaires et soumis ou non au stress chronique de contention. Pour cela, la pente des PPSEs, la pente de la VA et le ratio PPSEs/VA ont été relevés suite à des stimulations d'intensité croissante entre 400 et 700 mA (Moyenne  $\pm$  SEM ; n= 10 par groupe). Les résultats ont été analysés statistiquement de la manière suivante : 1) par une ANOVA 2 (régime x intensité de stimulation) sur mesures répétées sur les données des rats NS afin d'étudier l'effet du régime, puis 2) par une ANOVA 2 (stress x intensité de stimulation) sur mesures répétées pour chaque régime alimentaire afin d'étudier l'effet du stress. Tous les tests statistiques ont été suivis de tests post-hoc de Bonferroni. Ces analyses ont montré un effet global du stress chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 sur le ratio PPSE/VA ( $F(1,154)=6,758$  ;  $p=0,010$ ), sur les PPSEs ( $F(1,154)=9,68$  ;  $p=0,002$ ) et sur les VA ( $F(1,154)=19,8$  ;  $p<0,001$ ), qui va à l'encontre de l'effet propre de l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3.

### **III. Etude de la transmission synaptique et de la plasticité cérébrale**

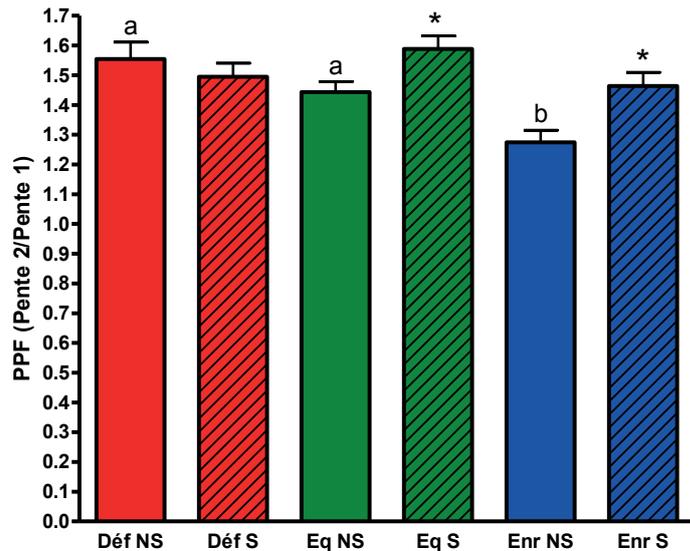
#### ***III.1. Transmission synaptique de base***

Lors de ces enregistrements, la réponse mesurée est liée uniquement à l'activation des récepteurs AMPA du glutamate. Les stimulations appliquées étant insuffisantes pour libérer le bouchon magnésium qui bloque les récepteurs NMDA, elles ne permettent donc pas leur activation.

##### ***III.1.1 Courbe d'intensité-réponse (Input-Output) (Figure 49)***

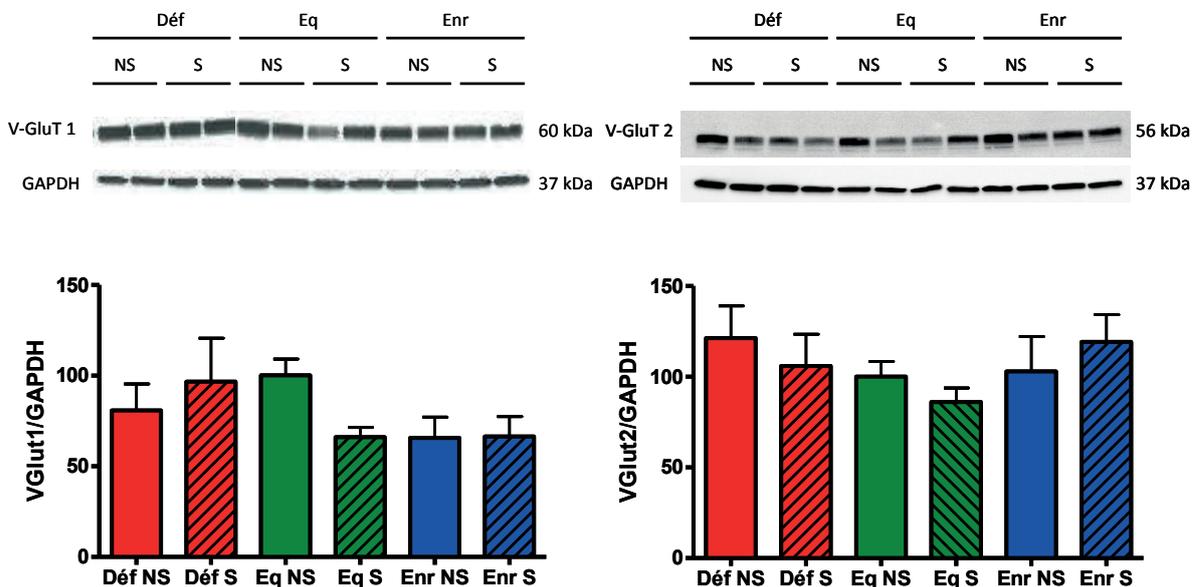
L'enrichissement en AGPI-LC n-3 induit une augmentation globale de 26% du ratio PPSE/VA, comparativement aux rats équilibrés ( $p=0,030$ ). Les rats enrichis en AGPI-LC n-3 ont ainsi une meilleure efficacité synaptique, car globalement, pour un même nombre de fibres stimulées, ils présentent une réponse plus intense suite à l'arrivée d'un stimulus. Cependant, cet effet est inversé suite au protocole de stress. En effet, chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, le stress induit une diminution globale de 22% du ratio PPSE/VA ( $p=0,010$ ) ; qui atteint alors des valeurs comparables à celles des rats équilibrés non stressés.

Si on considère l'amplitude des PPSEs et VA séparément, on observe que, d'une manière générale, l'intensité de ces derniers est en moyenne doublée, lorsque l'on applique des stimulations d'intensités croissantes entre 400 et 700 mA, quel que soit le régime alimentaire ou l'état de stress des animaux. L'enrichissement en AGPI-LC n-3 induit une diminution globale de 30% de l'amplitude des PPSEs et de 36% des VA par rapport au lot équilibré ( $p=0,001$ ). Cet effet est inversé suite au protocole de stress. En effet, chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, le stress induit une augmentation globale de 28% de l'amplitude des PPSEs ( $p=0,002$ ) et de 60% de la VA ( $p=0,002$ ), qui atteignent alors des valeurs comparables à celles des rats équilibrés non stressés.



**Figure 50 : Paired-Pulse Facilitation (PPF) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 Cette mesure représente la pente du 2<sup>e</sup> champ par rapport à celle du 1<sup>e</sup> champ lorsque 2 stimulations de même intensité sont délivrées dans un intervalle court (Moyenne ± SEM ; n = 10 par groupe). L'analyse des résultats par ANOVA 2 (régime\*stress) a permis de dégager un effet global du stress ( $F(1,100)=6,182$  ;  $p=0,015$ ). Des tests post-hoc de Bonferroni précisent les effets des régimes alimentaires et du stress. a, b : effet significatif du régime alimentaire chez les animaux non stressés ( $p<0,05$ ) ; \* : effet significatif du stress par rapport au témoin non stressé du même lot alimentaire ( $p<0,05$ )



**Figure 51 : Expression protéique des récepteurs transporteurs vésiculaires du glutamate V-Glut 1 et 2 au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe des rats**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Equilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés  
 Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=10 par groupe) correspondent aux ratios d'intensité V-Glut1/GAPDH ou V-Glut2/GAPDH, exprimés en pourcentage de la valeur obtenue chez les rats équilibrés NS. L'analyse des résultats par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni ne montre aucun effet du régime ou du stress sur l'expression protéique des transporteurs vésiculaires du glutamate, V-Glut1 et 2.

### III.1.2 Paired-Pulse Facilitation (PPF) (Figure 50)

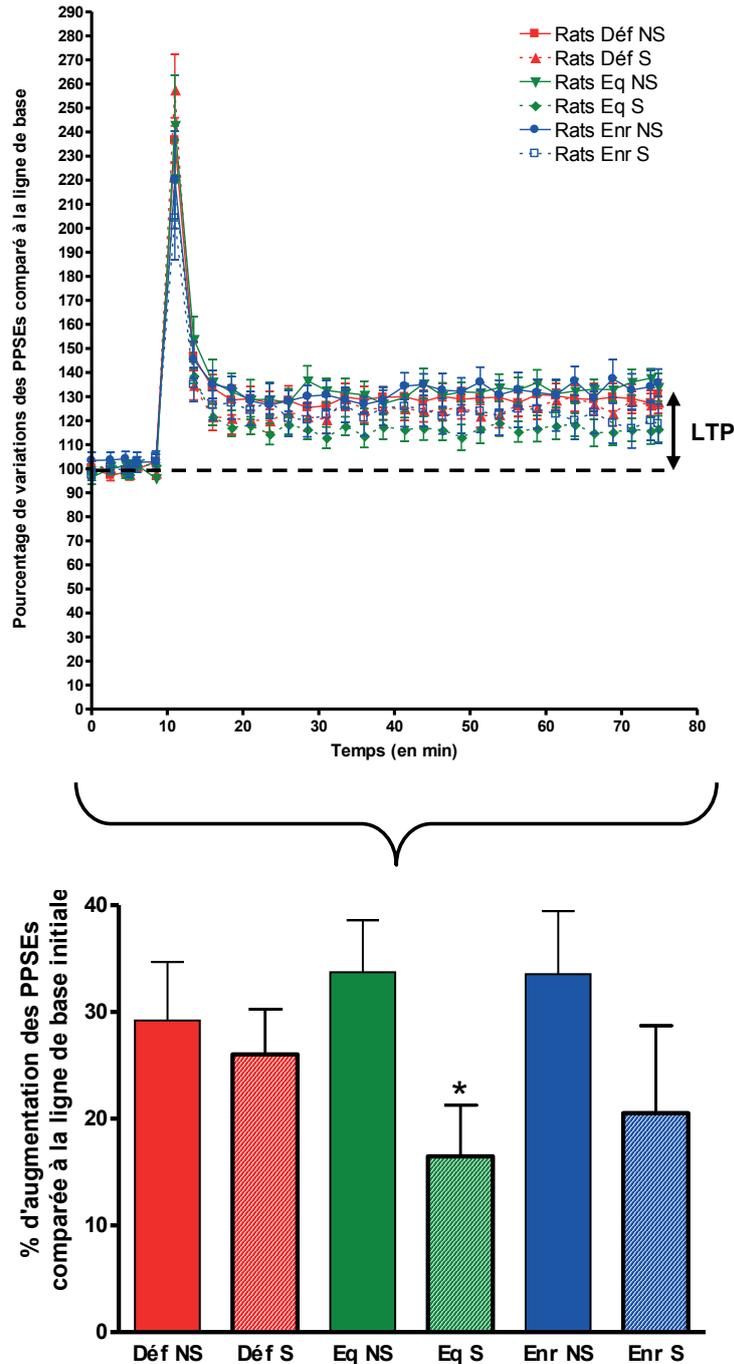
La mesure de la PPF renseigne sur la libération pré-synaptique de glutamate : plus le ratio de PPF est petit et proche de 1, plus la libération de glutamate lors du 1<sup>e</sup> stimulus est importante, générant une diminution du pool de vésicules de réserve et donc une moindre facilitation lors du 2<sup>e</sup> stimulus. Inversement, lorsque la probabilité de libération pré-synaptique de glutamate diminue, la quantité libérée lors du 1<sup>er</sup> stimulus est réduite et le pool de réserve est moins sollicité, favorisant ainsi une réserve plus importante et donc générant une plus grande facilitation lors d'un 2<sup>nd</sup> stimulus.

**a- Impact du régime chez les animaux non stressés :** Les animaux déficients en AGPI n-3 ne présentent pas de modification significative de la PPF (+ 7,7 en moyenne ; ns) par rapport aux rats équilibrés. Par contre, les rats recevant le régime enrichi en AGPI-LC n-3 ont une PPF significativement diminuée par rapport aux rats équilibrés (-11,7 % en moyenne ; p = 0,026) et déficients en AGPI n-3 (-17,7 % en moyenne ; p < 0,001), ce qui est donc associée à une capacité de libération pré-synaptique de glutamate plus importante dans ce lot alimentaire. L'évolution globale de la PPF suggère une augmentation de la capacité pré-synaptique de libération du glutamate avec l'augmentation des apports alimentaires en AGPI n-3.

**b- Impact du stress dans les différents lots alimentaires :** Chez les animaux équilibrés et enrichis en AGPI-LC n-3, le stress entraîne une augmentation significative de la PPF de respectivement 10% (p=0,028) et 15% (p=0,003) et donc une diminution de la libération pré-synaptique de glutamate. Aucun effet du protocole de stress n'est observé chez les rats déficients en AGPI n-3. Cependant, les animaux non stressés déficients en AGPI n-3 présentant une PPF légèrement supérieure à celle des autres groupes alimentaires, nos résultats suggèrent que, sur ce paramètre, le stress mime les effets d'une déficience alimentaire en AGPI n-3.

### III.1.3 Analyse de l'expression protéique des transporteurs vésiculaires du glutamate

Afin de comprendre les mécanismes pré-synaptiques impliqués, l'expression protéique des transporteurs vésiculaires du glutamate V-Glut 1 et 2 a été analysée par Western Blot (Figure 51). Quel que soit leur régime alimentaire ou leur état de stress, tous



**Figure 52 : Potentialisation à Long Terme (LTP) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Équilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La LTP a été mesurée sur les rats recevant les différents régimes (déficient en AGPI n-3, équilibré ou enrichi en AGPI-LC n-3), soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 14 par groupe) sont exprimés en pourcentage d'augmentation des PPSEs comparativement à la ligne de base initiale. L'analyse par ANOVA 2 (régime\*stress) révèle un effet global du stress ( $F(1,78)=5,65$  ;  $p=0,02$ ). Des tests post-hoc de Bonferroni ont permis de caractériser ces effets. \* : effet significatif du stress par rapport au témoin non stressé du même lot alimentaire ( $p<0,05$ )

les animaux présentent des niveaux d'expression des transporteurs vésiculaires du glutamate équivalents au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe.

### **III.2. Plasticité synaptique**

Contrairement aux expériences électrophysiologiques basales impliquant des chocs uniques, la plasticité synaptique dans l'aire CA1 de l'hippocampe est NMDA-dépendante. En effet, les stimulations utilisées dans cette partie sont assez fortes pour permettre la libération du bouchon magnésium bloquant les récepteurs NMDA et ainsi leur activation.

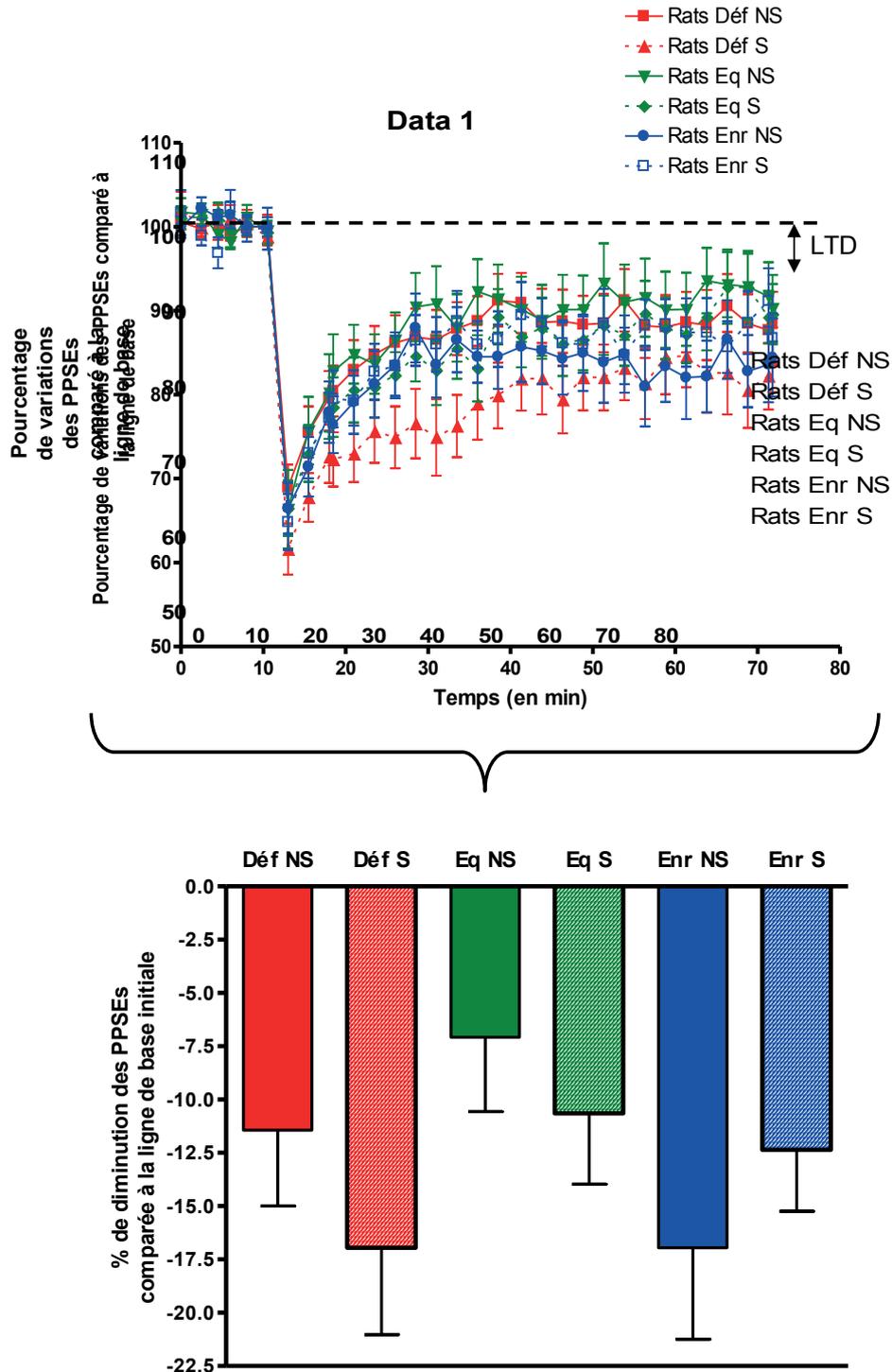
#### **III.2.1 Potentialisation à Long Terme (LTP)**

La LTP correspond à une augmentation à long terme de la transmission synaptique après une stimulation brève à haute-fréquence. Cette potentialisation de la transmission synaptique est considérée comme une des composantes du processus de mémorisation. Les résultats sont représentés dans la **Figure 52**.

**a- Impact du régime chez les animaux non stressés :** La LTP, exprimée en pourcentage d'augmentation des PPSEs comparativement à la ligne de base initiale, est de  $29,2 \pm 5,5 \%$ ,  $33,7 \pm 4,9 \%$  et  $33,5 \pm 5,9 \%$  respectivement chez les rats non stressés déficients en AGPI n-3, équilibrés et enrichis en AGPI-LC n-3, sans différence significative entre les trois groupes alimentaires.

**b- Impact du stress dans les différents lots alimentaires :** Le protocole de stress de contention induit une diminution globale de la LTP. Cet effet est notamment significatif chez les rats équilibrés, qui présentent une réduction de 51% de la LTP suite au stress chronique de contention

Si on fixe un seuil de LTP à 20% d'augmentation des PPSEs, on remarque que la proportion d'animaux effectuant une LTP est inférieure dans les groupes d'animaux stressés (test de  $\chi^2$ :  $\chi^2_{\text{obs}} = 7,804 > \chi^2_{2(0,95)} = 5,991$ ;  $p = 0,02$ ). Ainsi, si 73%, 85% et 71% respectivement des rats non stressés déficients en AGPI n-3, équilibrés ou enrichis en AGPI-LC n-3 présentent une LTP, seuls 64%, 36% et 43% respectivement de leurs équivalents stressés font de la LTP. La diminution de LTP observée suite au protocole de stress est ainsi liée à une diminution du nombre d'individus présentant une LTP.



**Figure 53 : Dépression à Long Terme (LTD) mesurée sur des tranches d'hippocampe de rats**

Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Équilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La LTD a été mesurée sur les rats recevant les différents régimes (déficient en AGPI n-3, équilibré ou enrichi en AGPI-LC n-3), soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 14 par groupe) sont exprimés en pourcentage de diminution des PPSEs comparativement à la ligne de base initiale. L'analyse par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni ne révèle aucun effet du régime ou du stress.

### III.2.2 Dépression à Long Terme (LTD)

La LTD correspond à une diminution à long terme de la transmission synaptique suivant une stimulation à basse fréquence. Les résultats sont représentés sous la forme d'une courbe d'évolution de l'amplitude des PPSEs au cours du temps, ainsi que sous la forme d'un histogramme représentant le pourcentage de variation comparativement à la ligne de base après stabilisation (**Figure 53**).

Aucun impact du régime alimentaire, ni du stress n'est mis en évidence. Ainsi, quel que soit le groupe expérimental considéré, la LTD, exprimée en pourcentage de diminution des PPSEs comparativement à la ligne de base initiale, est d'environ  $11,8 \pm 3,6$  %.

		Impact du régime chez les non stressés		Impact du protocole de stress		
		Impact de la défiance en AGPI n-3	Impact de l'enrichissement en AGPI-LC n-3	Chez les équilibrés	Chez les déficients en AGPI n-3	Chez les enrichis en AGPI-LC n-3
Transmission synaptique de base	Efficacité synaptique	-	<p>↑ 26% de l'efficacité synaptique</p> <p>↓ 36% du nombre de fibres nerveuses recrutées</p>	-	-	<p>↓ 22% de l'efficacité synaptique</p> <p>↑ 60% du nombre de fibres nerveuses recrutées</p>
	Libération pré-synaptique de glutamate	-	<p>↑ de la libération pré-synaptique de glutamate (PPF réduite de 12%)</p>	<p>Réduction globale de la libération pré-synaptique de glutamate chez les rats stressés sans modification de l'expression des transporteurs vésiculaires du glutamate V-Glut 1 et 2</p>		
				↓ car PPF augmentée de 10%		↓ car PPF augmentée de 15%
Plasticité synaptique	LTP	-	-	<p>Réduction globale de l'amplitude de la LTP chez les rats stressés</p>		
				↓ 51%	-	-
	LTD	-	-	-	-	-

Tableau 20 : Résumé de l'impact des apports alimentaires en AGPI n-3 et du stress chronique de contention sur les paramètres électrophysiologiques des rats

**En résumé,** le stress de contention a un effet délère sur l'efficacité synaptique et sur la capacité de libération pré-synaptique de glutamate et va ainsi à l'encontre des effets bénéfiques du régime enrichi en AGPI-LC n-3 sur ces paramètres. Ces phénomènes sont indépendants de l'expression protéique des transporteurs vésiculaires du glutamate. De plus, le protocole de stress inhibe les phénomènes de LTP, en particulier chez les rats équilibrés, sans modification des paramètres de LTD (**Tableau 20**).

#### **IV. Analyse de l'expression génique de marqueurs du stress et du fonctionnement synaptique**

Les analyses statistiques ont été réalisées sur les données exprimées en valeur absolue ( $2^{-\Delta CT}$ ) avec normalisation par rapport à la GAPDH. Puis, les résultats, représentés dans les **Figures 54 et 55**, ont été exprimés en expression relative ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ); avec normalisation par rapport au groupe équilibré non stressé (effet du régime), et par rapport au groupe non stressé dans chaque lot alimentaire (effet du stress).

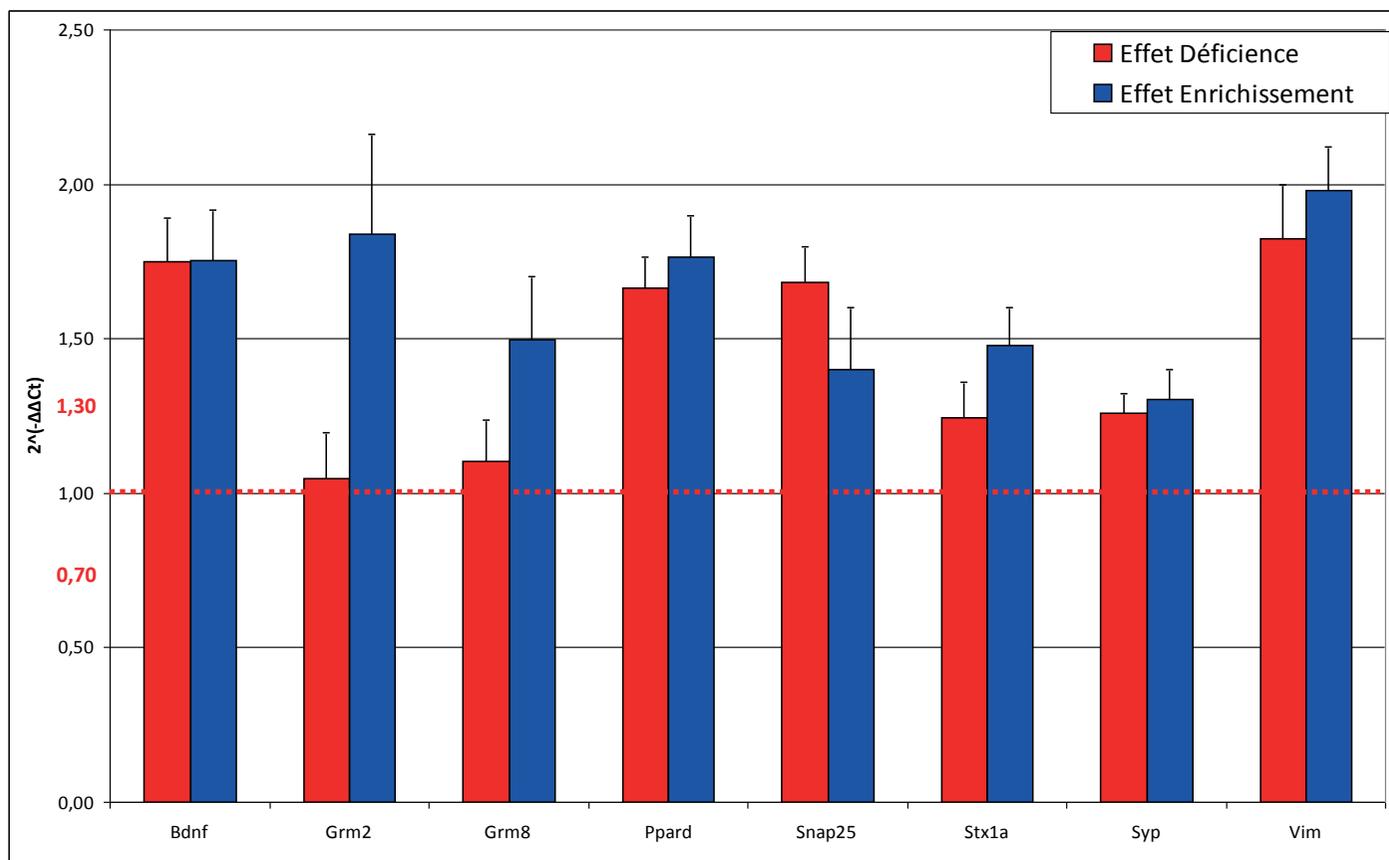
Seules les variations supérieures à 30% par rapport aux rats équilibrés NS pour l'effet du régime et par rapport aux rats NS du même lot alimentaire pour l'effet du stress ont été considérées. De plus, tous les gènes ayant nécessité un nombre de Ct supérieur à 30 sont considérés comme trop peu exprimés pour exploiter les données.

##### ***IV.1. Facteurs de croissance (BDNF, EGF, FGF2, GDNF, NGF)***

L'expression des ARNs EGF et GDNF est trop faible au niveau du CA1 de l'hippocampe pour être analysée. Globalement, FGF2 présente une expression absolue 12 fois plus importante que celle du BDNF ou du NGF.

Seule l'expression du BDNF est modulée dans les différents groupes expérimentaux. Chez les animaux non stressés, on observe une augmentation de 75% de l'expression du BDNF chez les déficients en AGPI n-3 ( $p=0,014$ ) et chez les enrichis en AGPI-LC n-3 ( $p=0,02$ ), comparativement aux équilibrés.

Le protocole de stress de contention induit de plus une augmentation significative de 65% de l'expression du BDNF chez le lot équilibré ( $p=0,022$ ), mimant ainsi l'effet de la déficience en AGPI n-3 ou de l'enrichissement en AGPI-LC n-3 sur ce paramètre.



**Figure 54 : Effet du régime alimentaire sur l'expression génique de différents marqueurs au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe**

Les résultats (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 5 par groupe) sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , où l'abondance du gène d'intérêt est normalisée par rapport à la GAPDH et par rapport aux animaux équilibrés non stressés. Ils ont été analysés par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni. Seuls les marqueurs modulés de manière significative ( $p < 0,05$ ) en fonction du régime alimentaire sont représentés.

## ***IV.2. Récepteurs du glutamate***

### ***IV.2.1 Récepteurs ionotropiques du glutamate (AMPA et NMDA)***

Les sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA sont exprimées dans les mêmes proportions dans la zone CA1 étudiée. Concernant les récepteurs AMPA, la sous-unité GluRA est majoritaire par rapport à la sous-unité GluRB.

L'expression génique des récepteurs ionotropiques du glutamate, quel que soit le type de récepteur et la sous-unité considérés, n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention.

### ***IV.2.2 Récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR 1 à 8 ou Grm 1 à 8)***

L'expression de l'ARN mGluR 6 est trop faible au niveau du CA1 de l'hippocampe pour être analysée. Les récepteurs métabotropiques majoritaires sont les récepteurs mGluR 3 et mGluR 5 dont l'expression absolue est en moyenne 11 fois plus élevée que celle des autres récepteurs métabotropiques du glutamate. Cependant, ces récepteurs majoritaires ne voient pas leur expression modulée ni par le stress, ni par le régime alimentaire. Seule l'expression des récepteurs mGluR2, mGluR7 et mGluR8 est modifiée de manière significative en fonction du groupe expérimental.

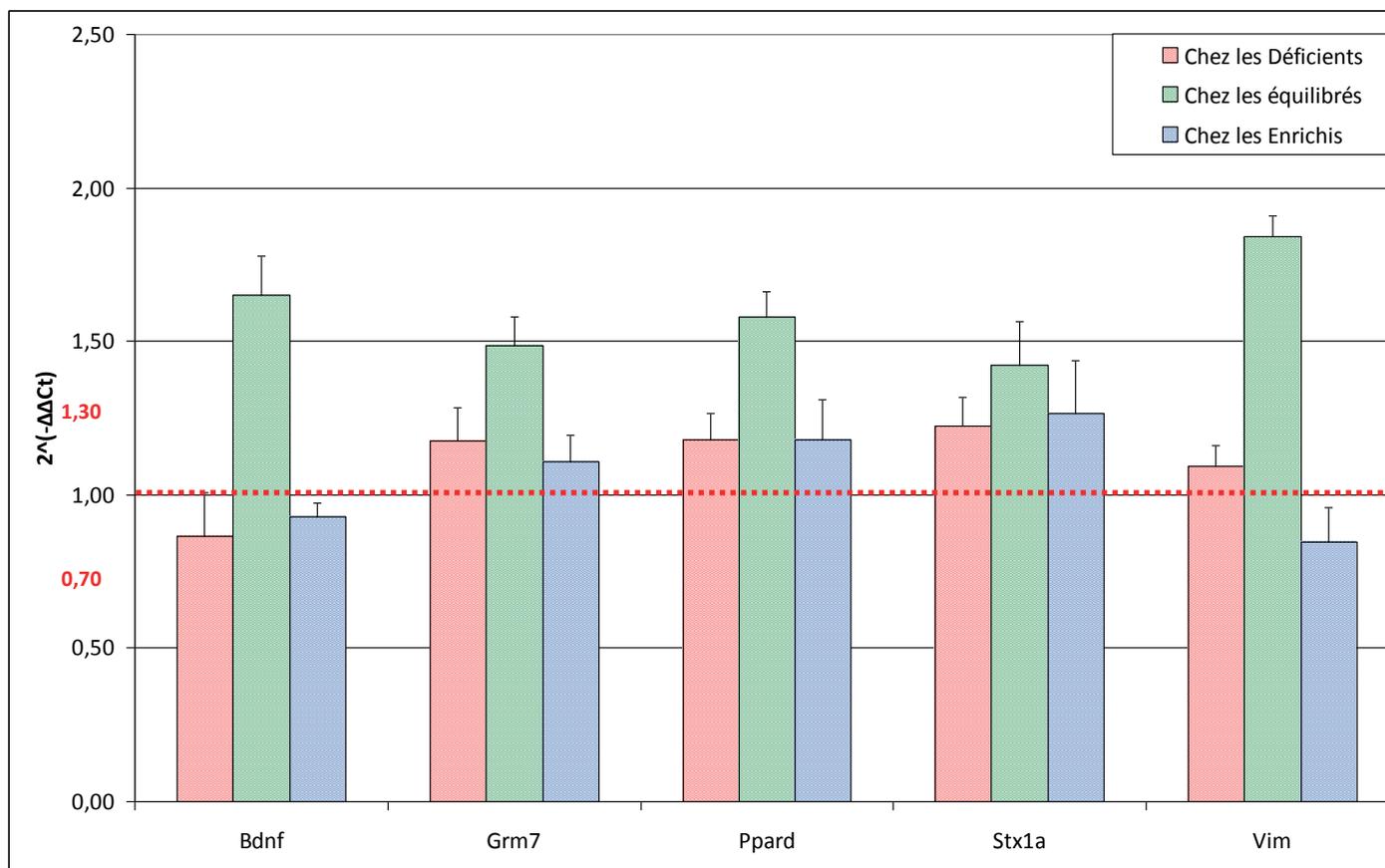
Ainsi, le régime enrichi en AGPI-LC n-3 induit une augmentation de 84% de l'expression génique de mGluR2 ( $p=0,001$ ) et de 50% de celle de mGluR8 ( $p=0,036$ ) comparativement aux rats équilibrés non stressés.

De plus, on observe un effet global du stress ( $F(1,28)=9,198$  ;  $p=0,005$ ) sur l'expression de mGluR7. Cet effet n'est significatif que chez les rats équilibrés, qui présentent une augmentation de 48% de l'expression génique de mGluR7 ( $p=0,015$ ).

## ***IV.3. Transporteurs du glutamate***

### ***IV.3.1 Transporteurs vésiculaires du glutamate (V-Glut 1 et 2)***

Le transporteur vésiculaire au glutamate V-Glut1 est largement majoritaire au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Ainsi, son expression génique est 57 fois plus importante que celle du transporteur V-Glut2.



**Figure 55 : Impact du protocole de stress sur l'expression génique de différents marqueurs au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe**

Les résultats (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 5 par groupe) sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , où l'abondance du gène d'intérêt est normalisée par rapport à la GAPDH et par rapport aux animaux non stressés du groupe alimentaire correspondant. Ils ont été analysés par ANOVA 2 (régime\*stress) suivie de tests post-hoc de Bonferroni. Seuls les marqueurs modulés de manière significative ( $p < 0,05$ ) en fonction du régime alimentaire sont représentés.

L'expression génique de ces 2 transporteurs vésiculaires n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention.

#### *IV.3.2 Transporteurs astrocytaires du glutamate (GLAST et GLT-1)*

Le transporteur astrocytaire au glutamate GLT-1 est largement majoritaire au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, son expression étant 3 fois plus importante que celle du transporteur GLAST.

L'expression génique de ces 2 transporteurs astrocytaires n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention.

#### ***IV.4. Marqueurs de l'exocytose***

Six marqueurs impliqués dans le processus d'exocytose ont été étudiés : la syntaxine 1A (Stx1A), SNAP 25 (synaptosomal-associated protein 25) et VAMP 2 (Vesicle-associated membrane protein 2), la synaptophysine (Syp), la synaptotagmine 1 (Syt 1) et la synapsine I (Syn1). Seules les expressions de la Stx1A, SNAP 25 et la Syp sont modulées de manière significative lors des différents traitements.

Comparativement aux animaux équilibrés, la déficience en AGPI n-3 induit une augmentation globale de 26% de l'expression de Syp ( $p=0,042$ ) et de 68% de celle de SNAP25 ( $p=0,003$ ), tandis que l'enrichissement en AGPI-LC n-3 a surtout un effet sur l'expression de la Stx1a qu'il augmente globalement de 48% ( $p=0,018$ ).

De plus, le stress chronique de contention exerce un effet global ( $F(1,28)=9,059$  ;  $p=0,005$ ) sur l'expression de la Stx1A. Ainsi, suite au stress, on observe une augmentation de l'expression de cette protéine de 22% chez les déficients (ns), de 42% chez les équilibrés ( $p=0,078$ ) et de 26% chez les enrichis ( $p=0,071$ ).

#### ***IV.5. Récepteurs aux corticoïdes (GR et MR)***

Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) est légèrement plus exprimé que le récepteur aux glucocorticoïdes, GR au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. L'expression génique des récepteurs GR et MR n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention.

## ***IV.6. Marqueurs du métabolisme lipidique***

### **IV.6.1 Facteurs de transcription (PPARs)**

L'expression de l'ARNm PPAR gamma est trop faible au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe pour être analysée. Les résultats montrent que l'expression de PPAR $\delta$  est triplée par rapport à celle de PPAR $\alpha$ . Seule l'expression de PPAR $\delta$  est modulée en fonction des différents groupes expérimentaux.

Comparativement aux animaux équilibrés, la déficience en AGPI n-3 et l'enrichissement en AGPI-LC n-3 induisent une augmentation de 66% ( $p=0,011$ ) et de 77% ( $p=0,003$ ) respectivement. Le stress de contention augmente l'expression de ce marqueur chez les rats équilibrés (+58% ;  $p=0,01$ ), mimant ainsi l'effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'un enrichissement en AGPI-LC n-3.

### **IV.6.2 Phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>)**

L'expression de l'ARNm sPLA<sub>2</sub> est trop faible au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe pour être analysée. L'expression génique de la iPLA<sub>2</sub> est multipliée par 6 par rapport à celle de la cPLA<sub>2</sub>.

L'expression des isoformes i et c des PLA<sub>2</sub> n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention.

### **IV.6.3 Cyclooxygénase (COX2) et lipoxygénases (Alox 5, 12 et 15)**

L'expression des ARNm Alox 12 et Alox 15 est trop faible au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe pour être analysée.

L'expression de l'Alox 5 ainsi que celle de la COX 2 ne sont modulées ni par le régime alimentaire, ni par le stress de contention.

## ***IV.7. Autres marqueurs***

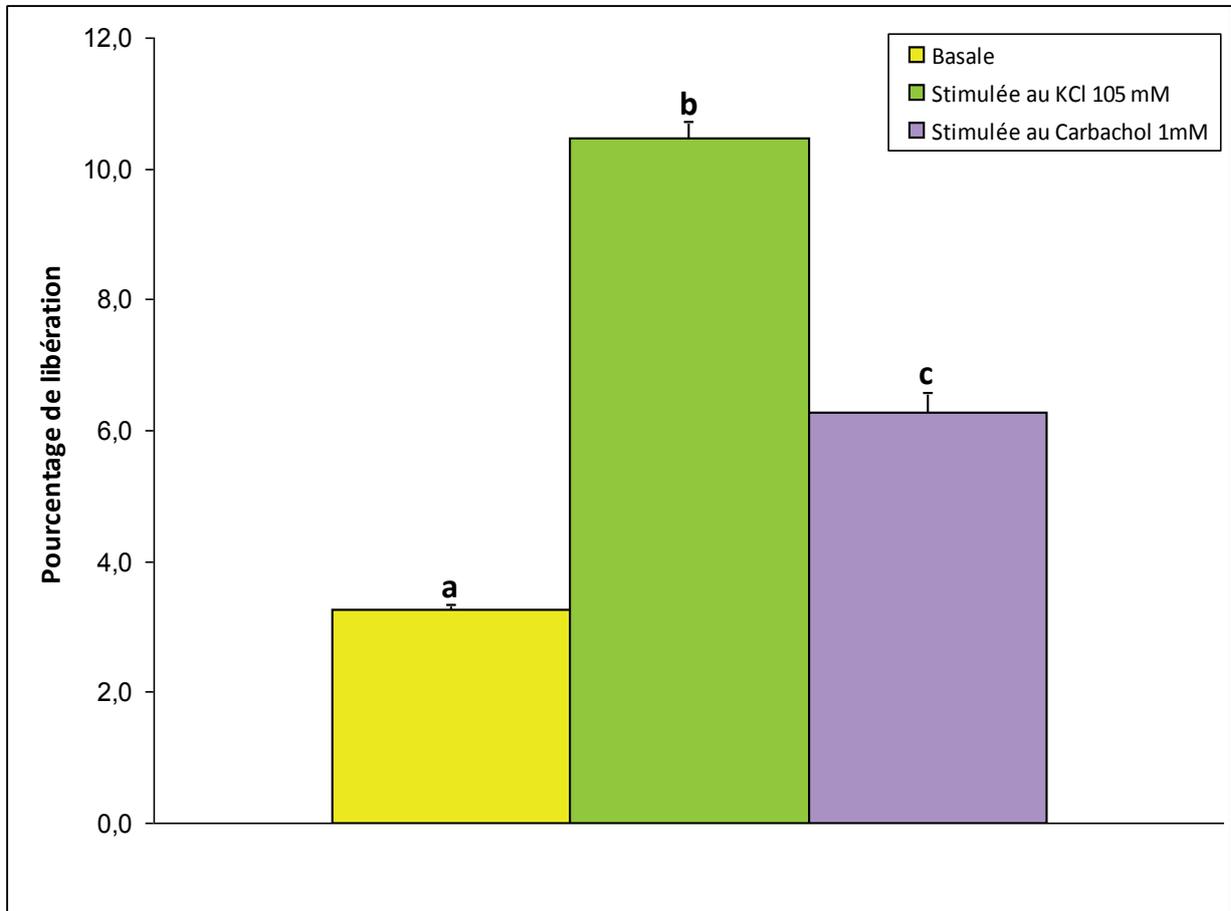
### **IV.7.1 Marqueurs astrocytaires : Sérine Racémase (SRR), Glutamine Synthase (Glul), S100 $\beta$ , GFAP et Vimentine**

L'expression génique des ARNm SRR, Glul, S100 $\beta$  et GFAP ne sont pas modulées ni par le régime alimentaire, ni par le stress de contention. Seule l'expression de la vimentine varie en fonction des différents groupes expérimentaux.

Ainsi, comparativement aux rats équilibrés, la déficience en AGPI n-3 et l'enrichissement en AGPI-LC n-3 induisent respectivement une augmentation globale de 82% ( $p=0,002$ ) et de 98% ( $p=0,002$ ) de l'expression de la vimentine. Le stress de contention augmente l'expression de ce marqueur chez les rats équilibrés uniquement(+84% ;  $p=0,001$ ), mimant ainsi l'effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'un enrichissement en AGPI-LC n-3.

#### IV.7.2 Marqueurs neuronaux : Map2

L'expression génique de Map2 n'est modulée ni par le régime alimentaire, ni par le protocole de stress de contention, ni par l'interaction entre les 2 facteurs.



**Figure 56 : Pourcentage de libération basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM de NA des cellules SH\_SY5Y en condition témoin**

La libération de NA par les cellules SH\_SY5Y a été étudiée sous 3 conditions de stimulation : basale qui correspond à la libération spontanée, stimulée au KCl 105mM qui induit une dépolarisation des membranes ou stimulée au Carbachol 1mM qui induit l'activation des récepteurs muscariniques couplés à des protéines G. Les résultats (Moyenne ± SEM ; n = 20), analysés par ANOVA 1 (stimulation) suivie de post-hoc tests de Bonferroni, révèlent un effet global des stimulations ( $F(2,140)=359,413$  ;  $p<0,001$ ). a, b, c : valeurs significativement différentes ( $p<0,05$ )

### **Partie 3 : Etude de la modulation de libération de noradrénaline par les AGPI et par les glucocorticoïdes sur un modèle de neuroblastomes humains SH\_SY5Y**

#### **I. Mesure de la libération de noradrénaline en conditions basale et stimulées**

L'effet des différentes stimulations (basale (KCl 5 mM) et stimulées (KCl 105 mM et carbachol 1 mM)) sur la libération de noradrénaline tritiée par les cellules SH\_SY5Y est résumé dans la **Figure 56**. La libération de NA par les cellules SH\_SY5Y a été étudiée sous 3 conditions de stimulation : basale qui correspond à la libération spontanée, stimulée au KCl 105mM qui induit une dépolarisation des membranes ou stimulée au Carbachol 1mM qui induit l'activation des récepteurs muscariniques couplés à des protéines G.

En condition basale, les cellules libèrent en moyenne  $3,3 \pm 0,1$  % de la noradrénaline qu'elles ont captée préalablement pendant 1h. La stimulation de la libération par l'ajout de KCl 105 mM ou de Carbachol 1mM augmente de manière significative cette libération. Ainsi, les cellules stimulées avec du KCl 105 mM voient leur libération triplée ( $p < 0,001$ ) et atteindre en moyenne  $10,5 \pm 0,3$  %. La stimulation au Carbachol 1mM induit une augmentation intermédiaire de l'amplitude de libération, atteignant en moyenne  $6,3 \pm 0,3$  %.

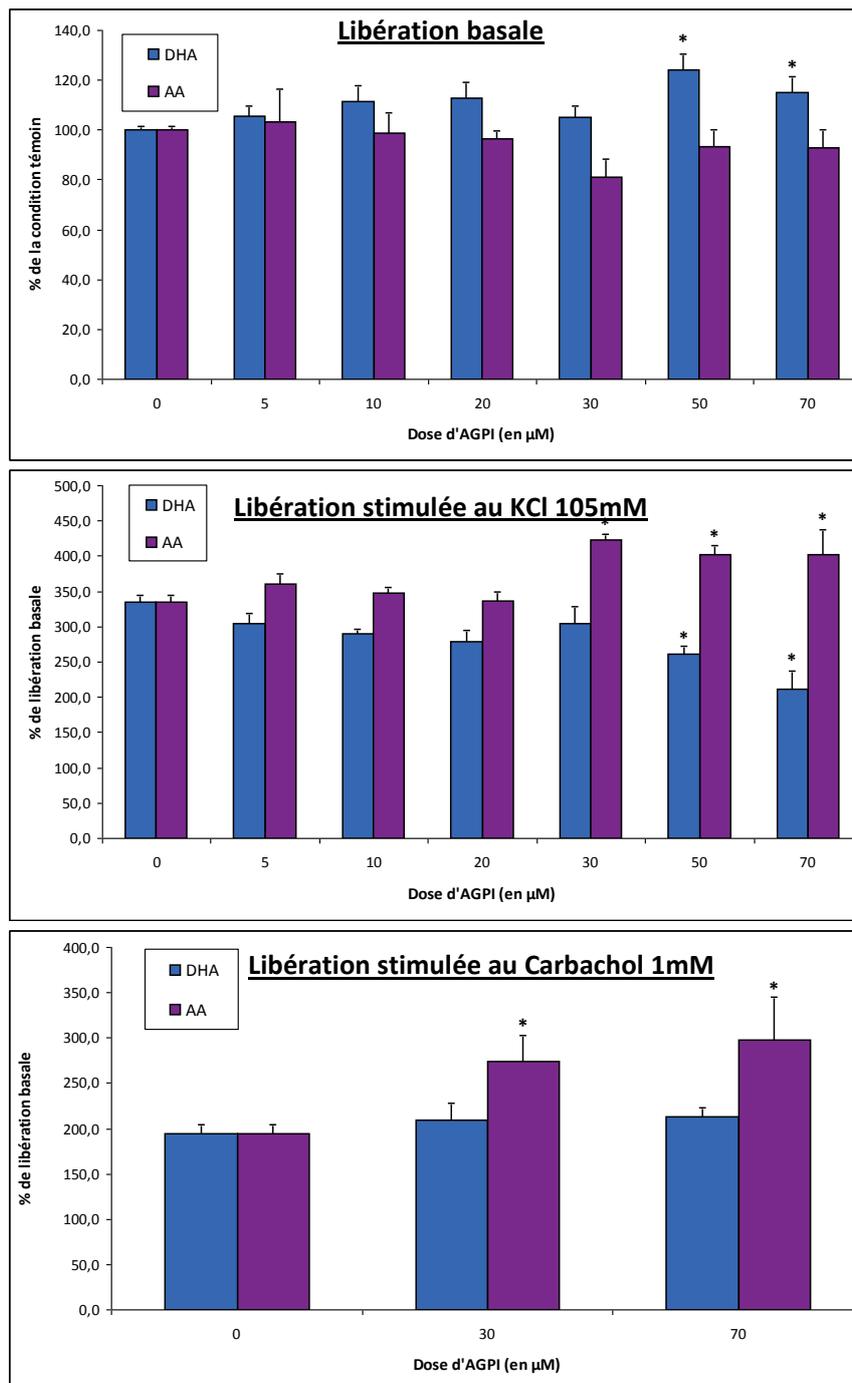
#### **II. Etude de l'effet-dose des AGPI sur la capture et la libération de noradrénaline**

Cette partie de l'étude vise à étudier l'effet dose-dépendant (0 à 70  $\mu$ M) de différents AGPI (DHA et AA) sur la capture et la libération de noradrénaline par les cellules SH\_SY5Y, d'une part lors d'une supplémentation à long terme (72h).

**Libération basale :** pour chaque dose (5 à 70  $\mu$ M) et chaque AGPI (DHA et AA), les résultats sont exprimés en % de libération basale mesurée pour des cellules témoins (en absence d'AGPI).

**Libération stimulée par le KCl 105 mM :** pour chaque condition de supplémentation en AGPI, les résultats sont exprimés en % de libération basale respective.

**Libération stimulée par le carbachol 1 mM :** pour chaque condition de supplémentation en AGPI, les résultats sont exprimés en % de libération basale respective.



**Figure 57 : Libération de NA basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM par les cellules SH\_SY5Y supplémentées d'AGPI (DHA, AA) pendant 72h**

La libération de NA par les cellules SH\_SY5Y a été étudiée sur des cellules supplémentées à des doses croissantes d'AGPI (DHA ou AA). Les résultats (Moyenne ± SEM ; n = 10), analysés par ANOVA 2 (AGPI\*concentration), révèlent un effet global du type d'AGPI utilisé sur la libération basale ( $F(1,204)=25,486$  ;  $p<0,001$ ), stimulée au KCl 105mM ( $F(1,206)=34,271$  ;  $p<0,001$ ) et stimulée au Carbachol 1mM ( $F(1,64)=9,001$  ;  $p=0,004$ ). Les effets ont ensuite été caractérisés par des tests post-hoc de Bonferroni. \* : pour un type d'AGPI, significativement différent de la condition témoin sans AGPI ( $p<0,05$ )

### ***II.1. Effet de la supplémentation en AGPI pendant 72h sur la capture de noradrénaline***

La capacité de capture des cellules est estimée en calculant le pourcentage de radioactivité totale captée par les cellules SH\_SY5Y à l'issue d'une heure d'incubation en présence de NA tritiée.

En moyenne, en absence d'AGPI, les cellules SH\_SY5Y captent  $9,0 \pm 0,2$  % de la radioactivité totale. L'ajout dans le milieu de culture de DHA ou d'AA à différentes doses (de  $5\mu\text{M}$  à  $70\mu\text{M}$ ) pendant 72h ne modifie pas la capacité de capture des cellules, quels que soient l'AGPI et la dose utilisée.

### ***II.2. Effet de la supplémentation en AGPI pendant 72h sur la libération de noradrénaline***

#### ***II.2.1 Etude de la libération basale (Figure 57)***

Comparativement aux cellules témoins (sans AGPI), la supplémentation du milieu de culture pendant 72h avec de l'AA ne modifie pas la libération basale des cellules, quelle que soit la concentration utilisée. Le DHA, quant à lui, induit une augmentation significative de 16% et de 12% de la libération basale de NA aux concentrations  $50\mu\text{M}$  ( $p=0,002$ ) et  $70\mu\text{M}$  ( $p=0,003$ ), respectivement.

#### ***II.2.2 Etude de la libération stimulée au KCl 105mM (Figure 57)***

Comparativement aux cellules témoins (sans AGPI), la supplémentation en DHA réduit le % de libération de NA, de façon significative à partir de la concentration  $50\mu\text{M}$  (-25%;  $p<0,01$ ). A l'inverse, la supplémentation en AA engendre une augmentation significative d'environ 23% de la libération de NA à partir de la concentration  $30\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ ).

#### ***II.2.3 Etude de la libération stimulée au Carbachol 1mM (Figure 57)***

Comparativement aux cellules témoins (sans AGPI), la supplémentation en DHA pendant 72h, quelle que soit la concentration, ne modifie pas la libération de NA stimulée au Carbachol 1mM des cellules SH\_SY5Y, tandis que la supplémentation en AA l'augmente significativement de 41 % ( $p=0,006$ ) et 53 % ( $p<0,001$ ), respectivement, aux concentrations 30 et  $70\mu\text{M}$ .

**En résumé,** lorsqu'ils sont incubés pendant 72h, les AGPI ont des effets spécifiques sur les différents types de libération. Ainsi, la supplémentation en DHA stimule la libération basale et inhibe la libération stimulée au KCl, tandis que la supplémentation en AA potentialise les libérations stimulées aussi bien au KCl qu'au Carbachol.

### **III. Etude des effets croisés d'une supplémentation en AGPI et d'un traitement par l'hormone du stress (hydrocortisone, OH-C)**

Les conditions de traitement par les AGPI testées dans cette partie de l'étude ont été la supplémentation à long terme (72h) en DHA ou en AA, aux doses de 30  $\mu$ M ou 70  $\mu$ M. La condition de stress a été mimée en traitant les cellules pendant 1h ou 24h avec de l'hydrocortisone 100nM, préalablement aux mesures de capture ou de libération de noradrénaline.

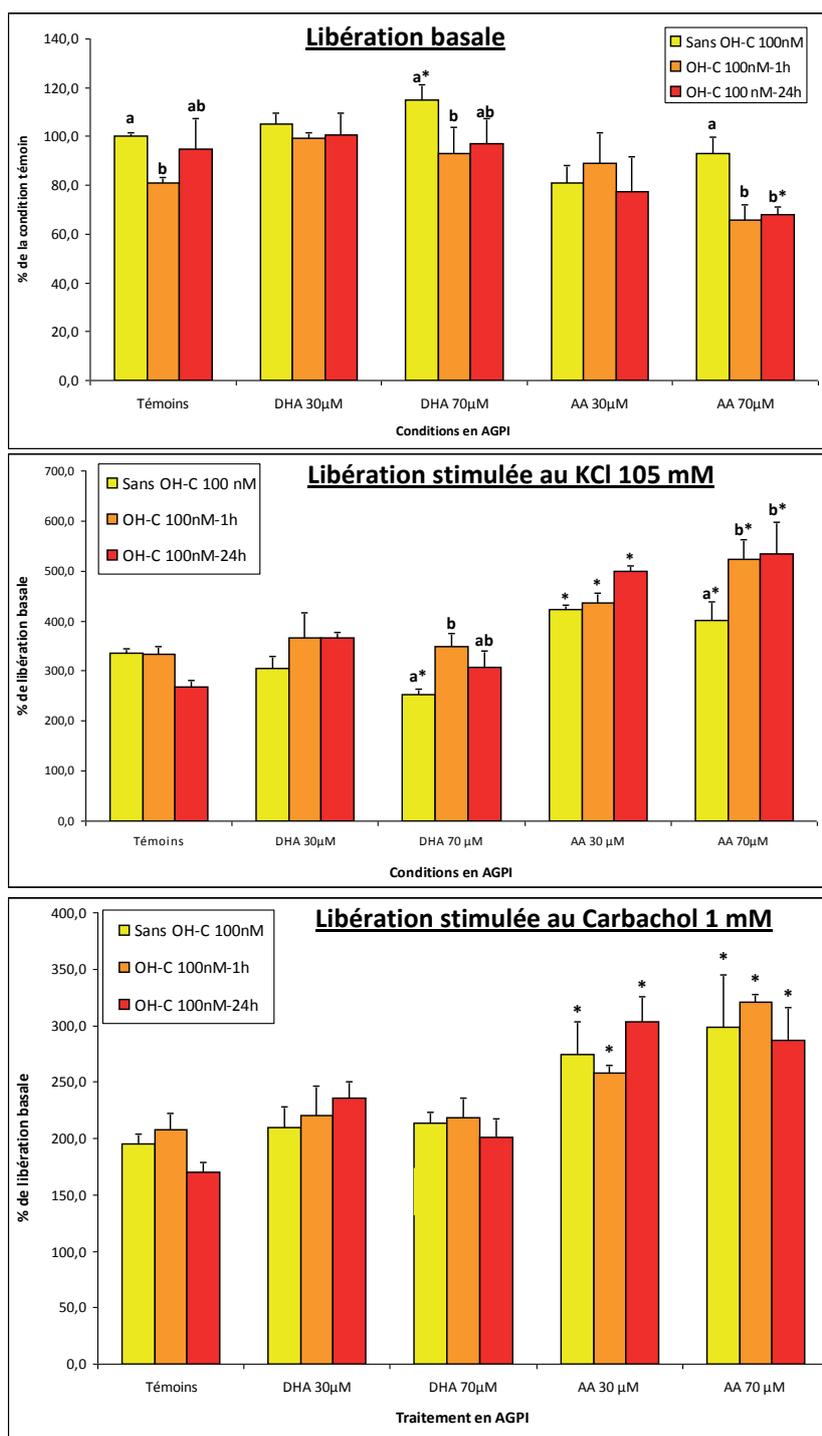
Après avoir déterminé l'effet de l'hydrocortisone seule par une ANOVA 1, les résultats obtenus ont été analysés, d'une part, pour déterminer l'effet croisé de la supplémentation en AGPI et du traitement par l'hydrocortisone pendant 1h ou 24h par une ANOVA 2 (supplémentation AGPI x traitement à l'hydrocortisone), d'autre part pour déterminer l'effet de la dose d'AGPI testée, pour chaque AGPI (dose d'AGPI x traitement à l'hydrocortisone). Toutes les analyses sont suivies de tests post-hoc de Bonferroni.

#### ***III.1. Mesure de la capture de noradrénaline***

L'analyse des résultats par ANOVA 1 révèle un effet global du traitement à l'hydrocortisone 100nM ( $F(2,481)=29,301$  ;  $p<0,001$ ), qui diminue de 20% la capture de noradrénaline par les cellules SH\_SY5Y ( $p<0,001$ ), quel que soit le temps d'incubation, comparativement aux cellules témoins. Cet effet est également observé sur des cellules supplémentées pendant 72h en DHA ou en AA, quelle que soit la concentration d'AGPI testée. L'effet inhibiteur de l'hydrocortisone sur la capture de noradrénaline par les cellules SH-SY5Y semble donc indépendant de leur statut membranaire en AGPI.

#### ***III.2. Mesure de la libération de noradrénaline : effet de l'hydrocortisone sur les cellules témoins (Figure 58)***

L'analyse par ANOVA 1 révèle un effet significatif du traitement par l'OH-C 100nM sur la libération basale de noradrénaline ( $F(2,79)=5,525$  ;  $p=0,006$ ). Ainsi, l'incubation des cellules pendant 1h en présence d'OH-C 100nM induit une diminution de 18% de la libération basale de noradrénaline ( $p=0,005$ ), comparativement aux cellules témoins ; en revanche, l'incubation de 24h est sans effet. En revanche, aucun effet de l'OH-C 100nM n'est mis en évidence sur la libération stimulée au KCl 105mM, ni sur la libération induite par le Carbachol 1mM, quelle que soit la durée de traitement.



**Figure 58 : Libération basale et stimulée au KCl 105mM et au Carbachol 1mM par les cellules SH\_SY5Y supplémentées en AGPI (DHA et AA) pendant 72h et/ou d’OH-C 100nM**

La libération de NA par les cellules SH\_SY5Y supplémentées avec différentes doses d’AGPI (DHA et AA) a été testée par incubation pendant 1h ou 24h avec de l’OH-C. Les résultats (Moyenne ± SEM ; n = 4) ont été analysés 1) par ANOVA 2 (Type d’AGPI x Temps d’incubation à l’OH-C) afin de caractériser l’effet croisé de l’OH-C et des AGPI et 2) pour chaque AGPI, par ANOVA 2 (Dose d’AGPI x Temps d’incubation à l’OH-C) afin de voir si l’effet croisé des AGPI avec l’OH-C est dépendant de la dose d’AGPI utilisée. Toutes ces analyses sont suivies de tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du traitement en OH-C 100nM au sein d’une même condition en AGPI ; \* : effet significatif du traitement en AGPI au sein d’un même temps d’incubation avec l’OH-C 100nM

### ***III.3. Mesure de la libération de noradrénaline : effet croisé de l'hydrocortisone et d'une supplémentation en AGPI pendant 72h***

Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à savoir si l'enrichissement préalable des cellules en AGPI (DHA ou AA) pouvait moduler les effets propres de l'incubation à l'OH-C.

#### **III.3.1 Etude de la libération basale (Figure 58)**

Nous avons vu que l'OH-C incubée pendant 1h induit une diminution de la libération basale de noradrénaline. Les résultats montrent que cette inhibition n'a pas lieu lorsque les cellules ont préalablement été supplémentées en AGPI (DHA ou AA) à la concentration de 30 $\mu$ M. En revanche, l'inhibition de la libération basale par l'OH-C est retrouvée sur des cellules supplémentées en AGPI (DHA ou AA) à la concentration de 70 $\mu$ M, aussi bien lors d'une incubation d'1h à l'OH-C ( $p < 0,001$ ) que lors d'une incubation de 24h ( $p = 0,007$ ).

Ainsi, si à une dose de 30 $\mu$ M, les AGPI semblent protéger la libération basale de noradrénaline des effets de l'OH-C, ces effets sont maintenus (DHA), voire renforcés (AA) lorsque les cellules sont cultivées en présence des AGPI pendant 72h à la concentration de 70 $\mu$ M.

#### **III.3.2 Etude de la libération stimulée au KCl 105mM (Figure 58)**

Nous avons vu que seule, l'OH-C ne modifie pas le % de libération stimulée de noradrénaline, quel que soit le temps d'incubation (1h ou 24h). Sur des cellules supplémentées en DHA ou en AA à la concentration 70 $\mu$ M, l'OH-C incubée pendant 1h ou pendant 24h induit une augmentation significative de la libération stimulée au KCl 105mM.

Ainsi, l'OH-C est sans effet sur la libération de noradrénaline stimulée par le KCl 105 mM dans des cellules témoins. En revanche, l'hydrocortisone potentialise l'effet stimulant de l'AA 70 $\mu$ M et annule l'effet inhibiteur du DHA 70 $\mu$ M sur la libération de noradrénaline.

#### **III.3.3 Etude de la libération stimulée au Carbachol 1mM (Figure 58)**

Nous avons vu que l'OH-C ne module pas la libération de noradrénaline après stimulation au Carbachol 1mM dans les cellules témoins. Les résultats sont identiques dans des cellules supplémentées en DHA ou en AA.

	Capture	Libération basale	Libération stimulée au KCl 105mM	Libération stimulée au Carbachol 1mM
Cellules témoins	9%	3,3%	10,5%	6,3%
Cellules supplémentées en DHA	–	↑ 12% dès 50µM	↓ 25% dès 50µM	–
Cellules supplémentées en AA	–	–	↑ 23% dès 30µM	↑ 41% dès 30µM
Cellules incubées avec de l'OH-C	↓ 20% quel que soit le temps d'incubation	↓ 18% uniquement suite à 1h d'incubation	–	–
Cellules supplémentées en DHA incubées avec de l'OH-C	Maintien de l'effet inhibiteur de l'OH-C	Effet de l'OH-C inhibé si DHA 30µM et maintenu si DHA 70µM	Effet de l'OH-C si DHA 70µM qui annule l'effet propre du DHA	–
Cellules supplémentées en AA incubées avec de l'OH-C	Maintien de l'effet inhibiteur de l'OH-C	Effet de l'OH-C inhibé si AA 30µM et renforcé si AA 70µM	Effet de l'OH-C si AA 70µM qui potentialise l'effet propre de l'AA	–

**Tableau 21 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'étude de la capture et de la libération de NA par les cellules SH\_SY5Y**

**En résumé,** l'OH-C incubée pendant 1h réduit la libération basale. Cet effet est inhibé lorsque les cellules sont supplémentées en AGPI (DHA ou AA) à 30 $\mu$ M et à l'inverse maintenu voire renforcé sur des cellules supplémentées en AGPI à 70 $\mu$ M. Sur des cellules témoins, l'OH-C ne module pas la libération stimulée au KCl. Cependant, lorsque les cellules ont été supplémentées en AGPI (DHA ou AA) à 70 $\mu$ M, l'OH-C augmente la libération stimulée au KCl 105mM, potentialisant l'effet de l'AA et à l'inverse, inhibant l'impact du DHA sur cette libération. De plus, quel que soit le statut lipidique des cellules, l'OH-C n'a aucun effet sur la libération stimulée au Carbachol, suggérant ainsi que son effet passe par la régulation des flux ioniques et notamment des canaux potassiques. Les résultats obtenus au cours de notre étude sur la lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y sont résumés dans le **Tableau 21**.



#### **Partie 4 : Etude de la modulation du fonctionnement astrocytaire par les AGPI et les glucocorticoïdes sur un modèle de culture primaire d'astrocytes de rats nouveau-nés**

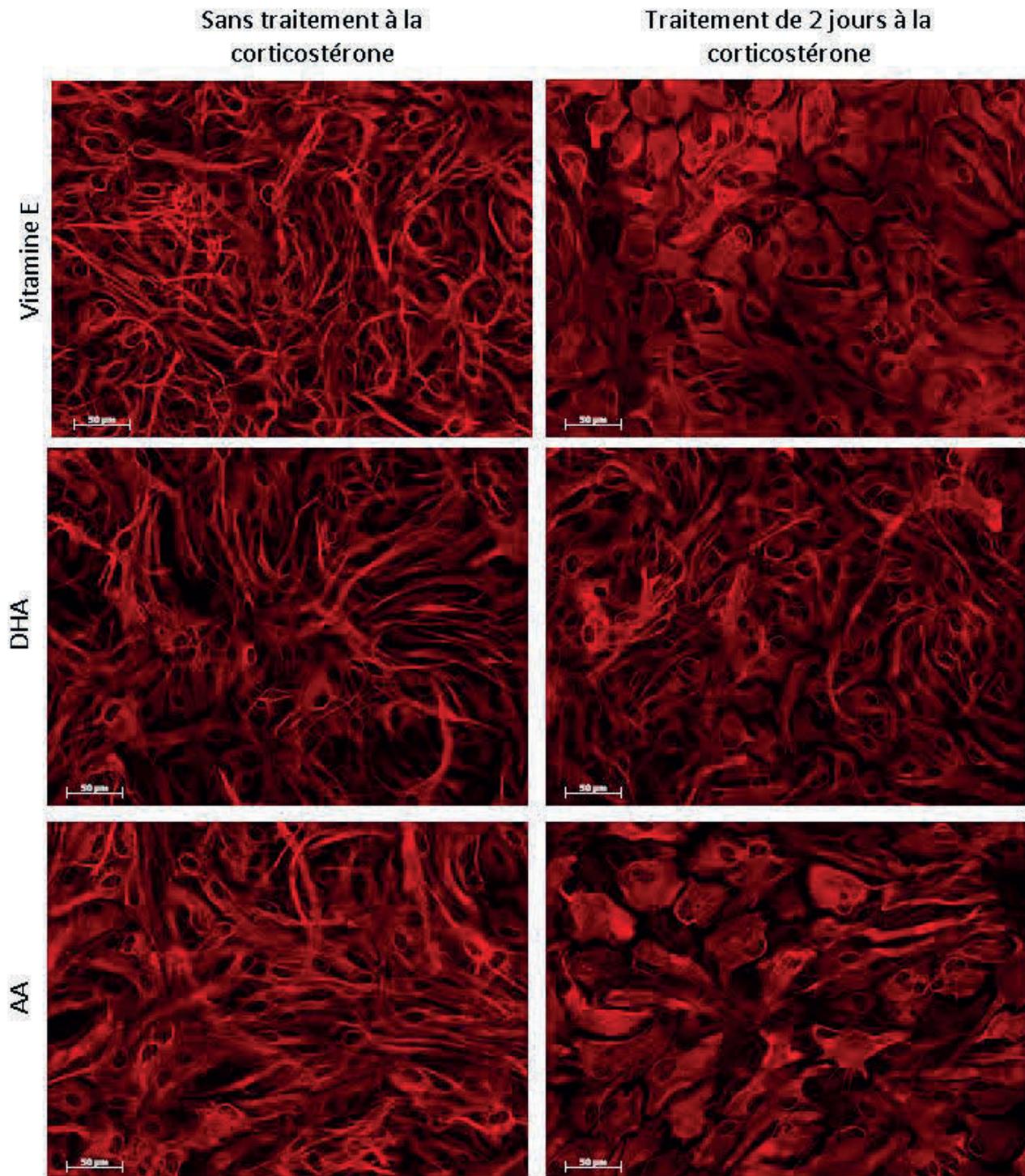
Nous avons évalué l'influence de la teneur membranaire en DHA et en AA en incubant les astrocytes avec du DHA ou AA (30  $\mu$ M) pendant toute la durée de la culture.

Pour évaluer un des impacts du stress sur les fonctions astrocytaires, nous avons incubé les cellules en présence de corticostérone, principale hormone du stress chez le rongeur, à 100 nM pendant 1h, 2 jours ou 6 jours. Selon les paramètres étudiés, nous ne présenterons que les résultats les plus caractéristiques, sachant que des effets similaires de la corticostérone ont été obtenus après 2 ou 6 jours d'incubation.

##### **I. Etude morphologique des astrocytes en culture par immunohistochimie**

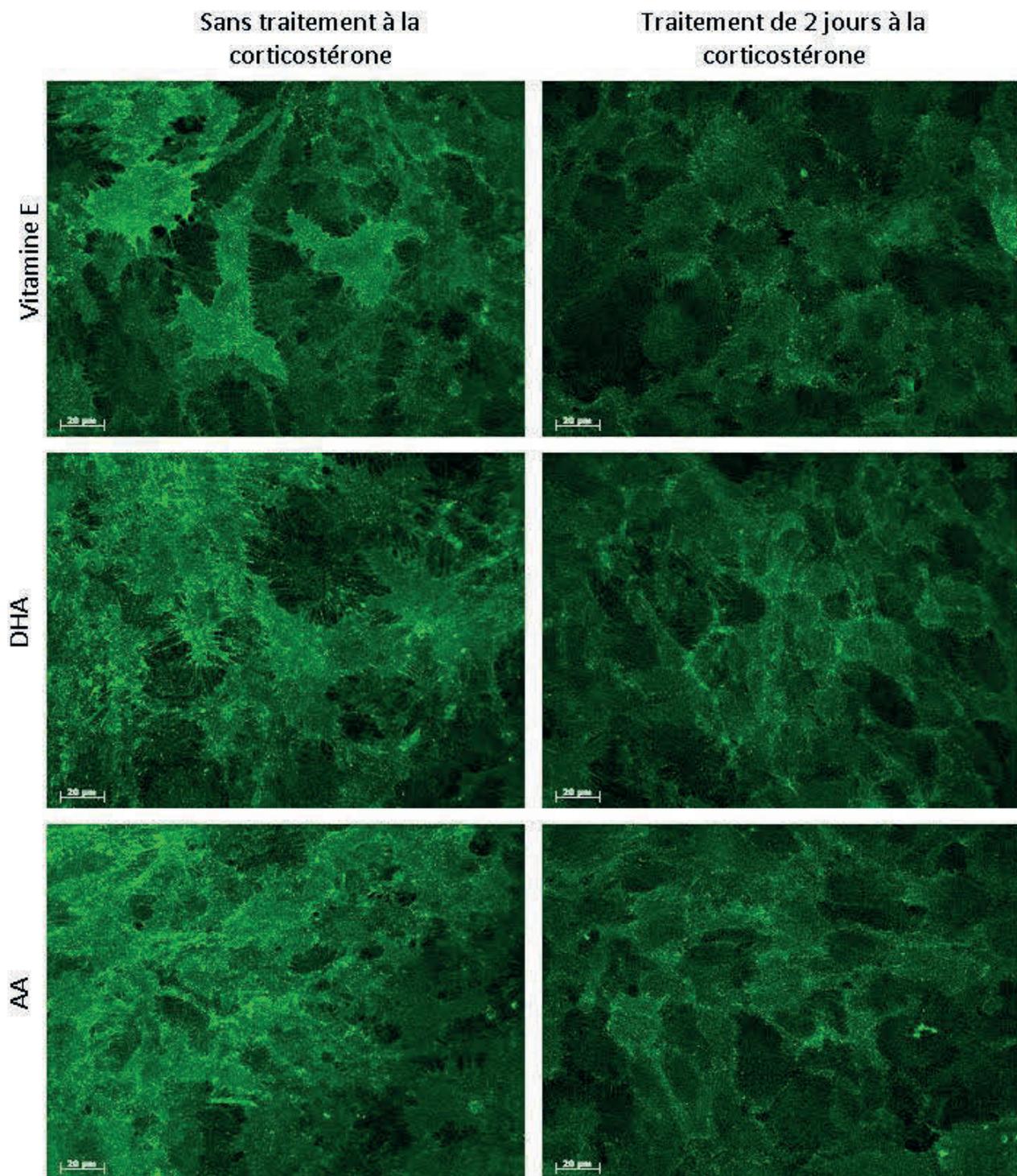
La plasticité morphologique des astrocytes joue un rôle important dans la régulation de la neurotransmission en modulant la présence astrocytaire autour des synapses. Elle est caractérisée par le déploiement ou la rétraction de prolongements principaux riches en GFAP et de filopodes périphériques dont le cytosquelette n'est constitué que d'eitrine qui appartient à la famille des protéines ERM reliant les filaments d'actine et la membrane plasmique.

Nous avons étudié la morphologie générale des astrocytes et l'émission de leurs prolongements principaux par marquage de la principale protéine des filaments intermédiaires astrocytaires, la GFAP (**Figure 59**). La capacité des cellules à émettre de fins filopodes périphériques a été caractérisée par le marquage de l'eitrine (**Figure 60**). Nous avons également évalué la motilité des filopodes astrocytaires en marquant l'activation des complexes d'adhérence focale. Ces complexes protéiques permettent à la cellule d'interagir avec la matrice extracellulaire. Ils sont constitués par l'association de nombreuses protéines, dont la vinculine, l' $\alpha$ -actinine, la taline, la paxiline, qui relie les intégrines (récepteurs des constituants de la matrice extracellulaire) aux fibres du cytosquelette d'actine. L'interaction de la cellule avec la matrice extracellulaire induit des signaux via les intégrines, induisant l'activation des complexes d'adhérence focale par tyrosine-phosphorylation (via la FAK : kinase d'adhérence focale) des protéines constitutives. Le niveau de tyrosine-phosphorylation des complexes d'adhérence focale reflète ainsi le niveau de motilité de la



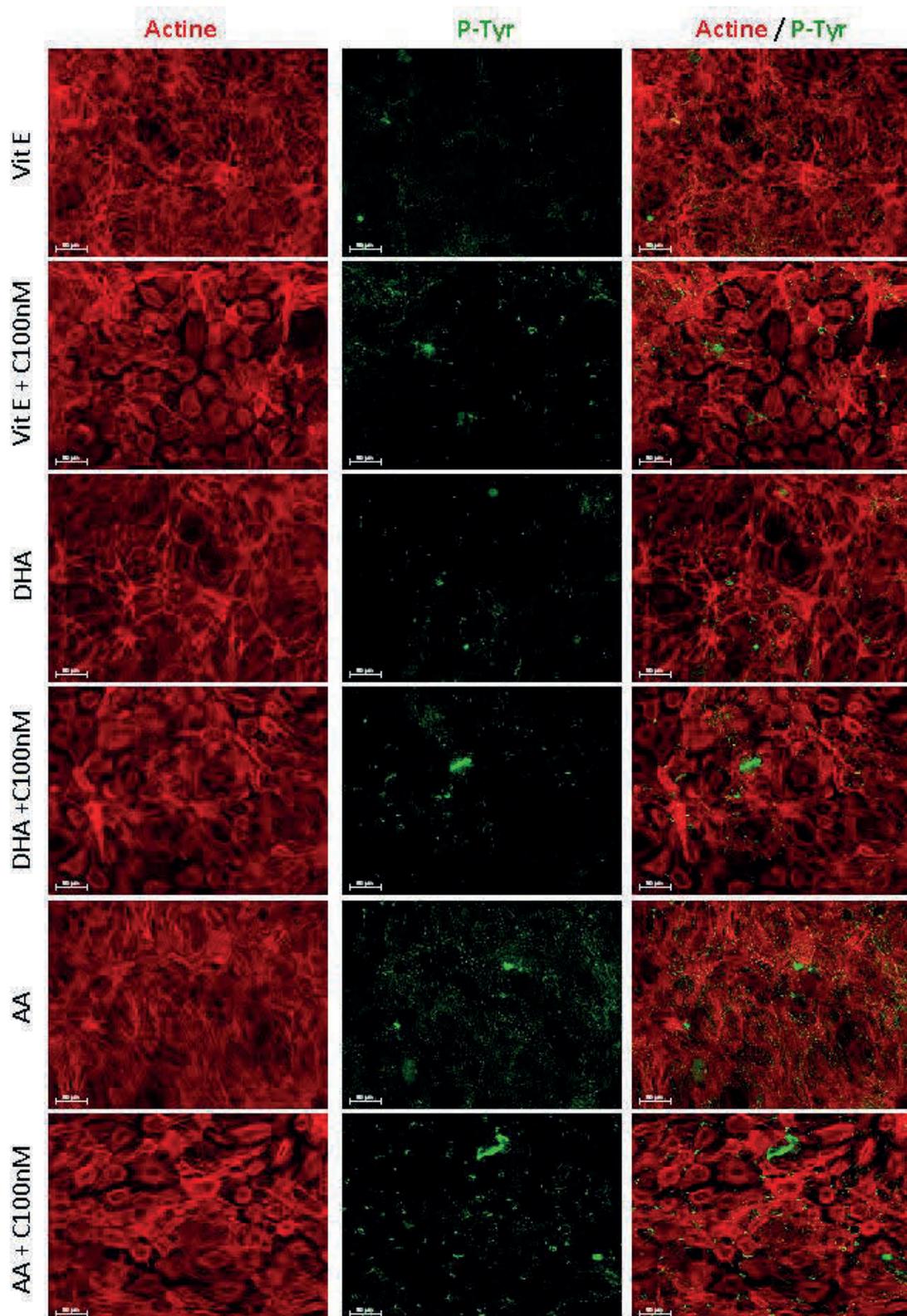
**Figure 59 : Immuno-marquage de la GFAP (filaments intermédiaires du cytosquelette) sur les astrocytes en culture primaire**

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1 % SVF). Les cellules ont ensuite été immuno-marquées pour la GFAP (rouge).



**Figure 60 : Immuno-marquage de l'ezrine (filopodes périphériques) sur les astrocytes en culture primaire.**

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30µM seule ou avec du DHA 30µM ou avec de l'AA 30 µM pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1 % SVF). Les cellules ont ensuite été immuno-marquées pour l'ezrine (vert).



**Figure 61 : Immuno-marquage de l'actine (cytosquelette) et P-Tyr (activation des complexes d'adhérence focale) sur les astrocytes en culture primaire**

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1 % SVF). Les cellules ont ensuite été immuno-marquées pour l'actine (rouge) et la Phospho-Tyrosine (vert).

cellule. La motilité cellulaire peut être liée à des processus de migration cellulaire, ou de changements morphologiques tels que l'émission de filopodes ou lamellipodes. L'immunomarquage de la phosphotyrosine met ainsi en évidence le niveau d'activation des complexes d'adhérence focale, localisés à l'extrémité des fibres d'actine, et permet d'estimer la capacité de motilité/formation des filopodes des astrocytes (**Figure 61**).

### ***1.1. Impact de la corticostérone sur la morphologie astrocytaire***

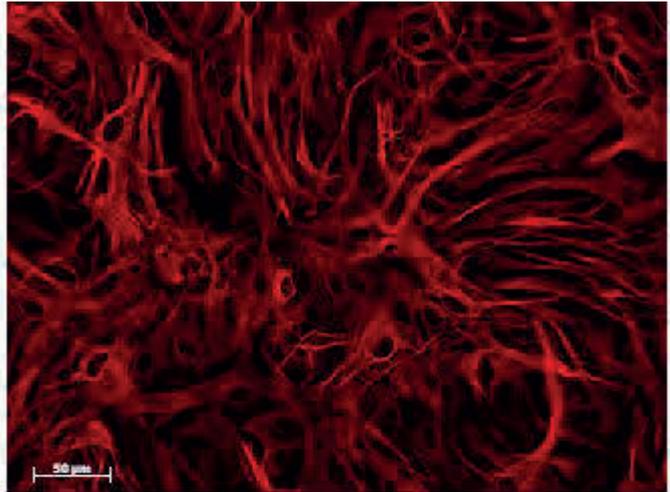
Après 15 jours de culture et en présence d'une teneur réduite en SVF (1%), les astrocytes témoins (sans AGPI, ni corticostérone) présentent un phénotype différencié, avec une forme stellaire caractérisée par l'émission de prolongements riches en GFAP. Le marquage à l'ézrine révèle l'émission de fins et courts filopodes sur la périphérie des cellules (**Figures 59 et 60**).

Le traitement par la corticostérone (100 nM, pendant 2 ou 6 jours) favorise au contraire une morphologie moins différenciée, dite pavimenteuse, s'apparentant à la morphologie des astrocytes en fin de phase de prolifération (avant la différenciation morphologique). La corticostérone s'oppose à l'émission de prolongements de GFAP, ainsi qu'à celle des fins filopodes marqués par l'ézrine (**Figures 59 et 60**). De plus, elle favorise l'organisation de l'actine en anneaux corticaux. Le marquage de la phospho-tyrosine est regroupé en amas, d'apparence peu fonctionnelle. Le marquage P-Tyr des complexes d'adhérence focale est normalement de taille plus faible, punctiforme ou en « batonnets » et situé à l'extrémité des fibres d'actine, ce qui n'est pas le cas sur les astrocytes traités à la corticostérone. Ceci suggère une désorganisation/disparition des complexes d'adhérence focale (**Figure 61**).

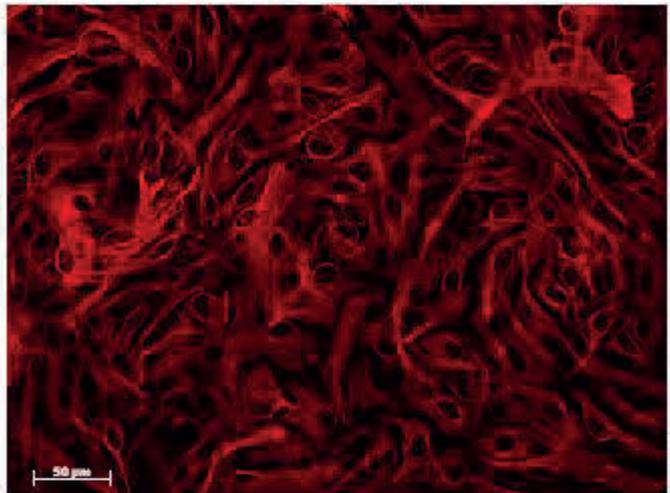
### ***1.2. Impact de l'enrichissement en AGPI sur la morphologie astrocytaire***

En milieu enrichi en DHA 30  $\mu$ M, les astrocytes adoptent une morphologie étirée. Ils présentent des prolongements principaux plus larges comparativement aux cellules témoins et ces prolongements prennent une orientation plus bipolaire que stellaire. Les cellules orientent leurs prolongements parallèlement les uns aux autres (**Figure 59**). Ces cellules enrichies en DHA émettent des filopodes périphériques (marquage de l'ézrine) plus nombreux et surtout plus allongés que les cellules témoins (**Figure 60**). De plus, le traitement au DHA 30 $\mu$ M favorise l'apparition de fibres de stress (marquage à l'actine) (**Figure 61**).

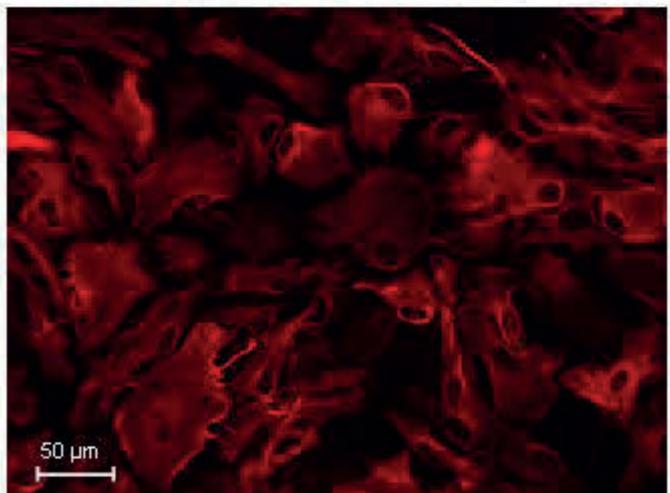
Astrocytes supplémentés en DHA 30 $\mu$ M



Astrocytes supplémentés en DHA 30 $\mu$ M  
+ 2 jours de traitement à la corticostérone



Astrocytes supplémentés en DHA 30 $\mu$ M  
+ 6 jours de traitement à la corticostérone



**Figure 62 : Evolution de la morphologie (marquage GFAP) des astrocytes supplémentés en DHA 30 $\mu$ M en fonction du temps d'exposition à la corticostérone**

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M avec du DHA 30 $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 ou 6 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1 % SVF). Les cellules ont été ensuite immuno-marquées pour la GFAP (rouge).

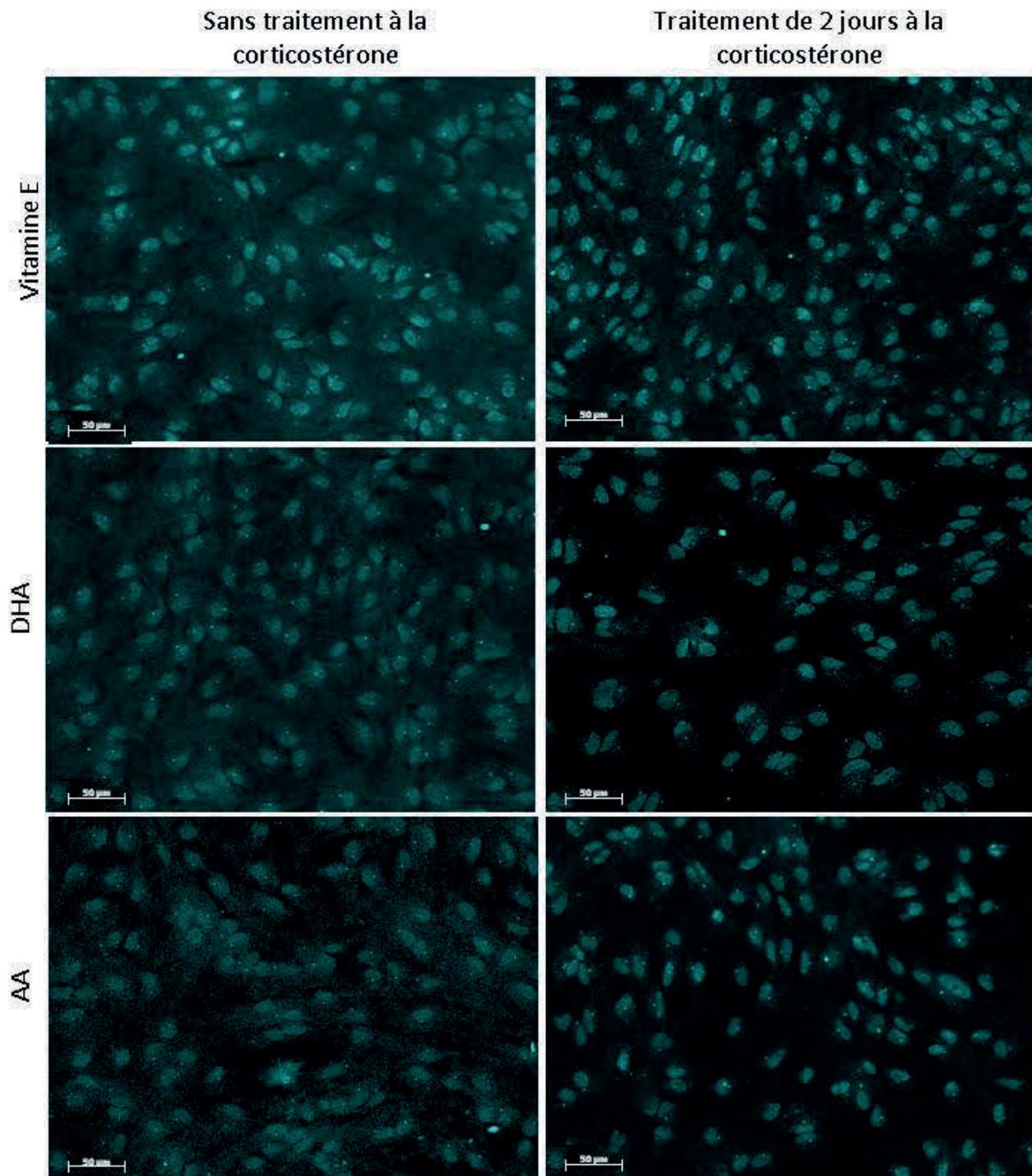
En milieu enrichi en AA 30 $\mu$ M, les astrocytes présentent une morphologie globalement similaire à celle des cellules témoins. Cependant, ils émettent moins de filopodes ; le marquage à l'ézrine est ainsi fortement condensé en petits points à la périphérie des cellules (**Figure 60**). Comparativement aux cellules témoins, les astrocytes enrichis en AA 30 $\mu$ M présentent également davantage de fibres de stress et cet effet est encore plus marqué que sur les cellules enrichis en DHA 30 $\mu$ M. Le traitement en AA favorise l'activation des complexes d'adhérence focale, avec une augmentation marquée des résidus P-Tyr à l'extrémité des fibres d'actine (**Figure 61**).

### ***1.3. Effet combiné de la corticostérone et des AGPI sur la morphologie astrocytaire***

Les astrocytes enrichis en DHA présentent une résistance partielle à l'effet de la corticostérone lorsque l'incubation est limitée à 2 jours. Lorsque la corticostérone est appliquée pendant 6 jours, l'effet morphologiquement dé-différenciateur de la corticostérone l'emporte (**Figure 62**).

En effet, après 2 jours d'incubation en présence de corticostérone, les cellules enrichies en DHA continuent à émettre des prolongements de GFAP orientés. Cependant, les filaments de GFAP apparaissent moins denses et plus fins qu'en absence de C100nM (**Figure 59**). De même, l'effet de la C100nM sur la formation d'anneaux corticaux est limité sur les cellules enrichies en DHA 30 $\mu$ M ; ces astrocytes présentent des anneaux d'actine corticale, mais également un grand nombre de fibres de stress d'actine (**Figure 61**). En revanche, la corticostérone supprime l'impact stimulant du DHA sur l'émission des filopodes périphériques : le marquage de l'ézrine périphérique est punctiforme et ne révèle plus de filopodes (**Figure 60**). L'impact d'une incubation de 2 jours à la C100nM est donc limité sur l'organisation de la GFAP et de l'actine au sein des astrocytes enrichis en DHA, mais restreint l'émission des fins filopodes. Lors d'une incubation plus longue (6 jours), l'impact de la C100nM sur la morphologie astrocytaire l'emporte et les astrocytes, bien qu'enrichis en DHA 30 $\mu$ M, présentent une morphologie pavimenteuse avec une forte réduction de l'émission des prolongements de GFAP, une organisation préférentielle de l'actine en anneaux corticaux et l'inhibition de l'émission de filopodes.

Les astrocytes enrichis en AA 30 $\mu$ M présentent une réponse morphologique de dé-différenciation à la corticostérone qui s'apparente à celle des cellules témoins (après 2 ou 6



**Figure 63 : Immuno-marquage des récepteurs aux glucocorticoïdes GR sur les astrocytes en culture primaire**

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1 % SVF). Les cellules ont ensuite été immuno-marquées pour les récepteurs GR (bleu cyan)

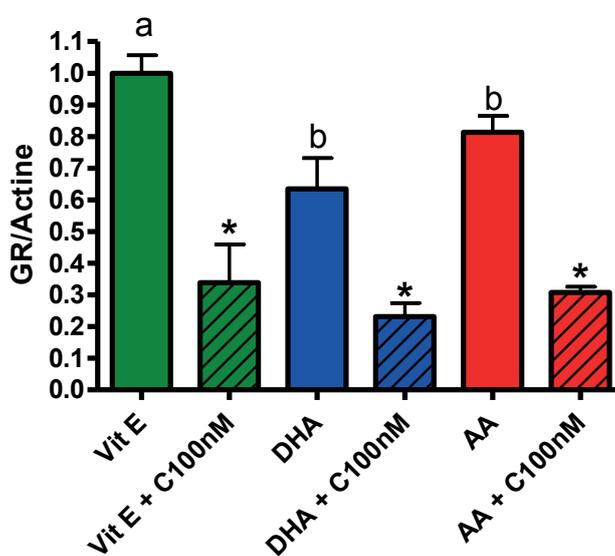
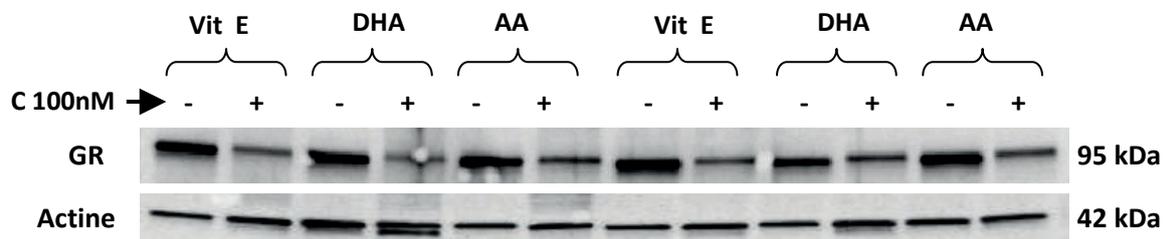
jours d'incubation). Comme l'enrichissement en AA induit une activation des complexes d'adhérence focale, la désorganisation de ces complexes par la corticostérone est d'autant plus évidente au niveau du marquage qui se présente en gros amas, très nombreux et d'apparence peu fonctionnelle, comme observé sur les cellules témoins traitées par la corticostérone (**Figure 61**).

## **II. Etude des récepteurs aux glucocorticoïdes**

### ***II.1. Localisation des différents types de récepteurs par immunohistochimie (Figure 63)***

L'étude par immunomarquage du récepteur MR ne révèle aucun effet de la supplémentation en AGPI ou du traitement à la corticostérone. Les récepteurs MR sont répartis de manière diffuse au sein du cytoplasme des cellules.

Le récepteur GR est, quant à lui, réparti entre le cytoplasme et le noyau sur des cellules témoins. Le traitement des astrocytes à la corticostérone, induit un renforcement de la répartition nucléaire de ce récepteur : le marquage apparaît plus intense dans le noyau, et plus faible dans le cytoplasme. Cet effet peut indiquer soit d'une translocation du récepteur au niveau nucléaire, soit d'une diminution de l'expression de ce dernier au niveau cytoplasmique.



**Figure 64 : Expression protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes GR sur les astrocytes en culture primaire**

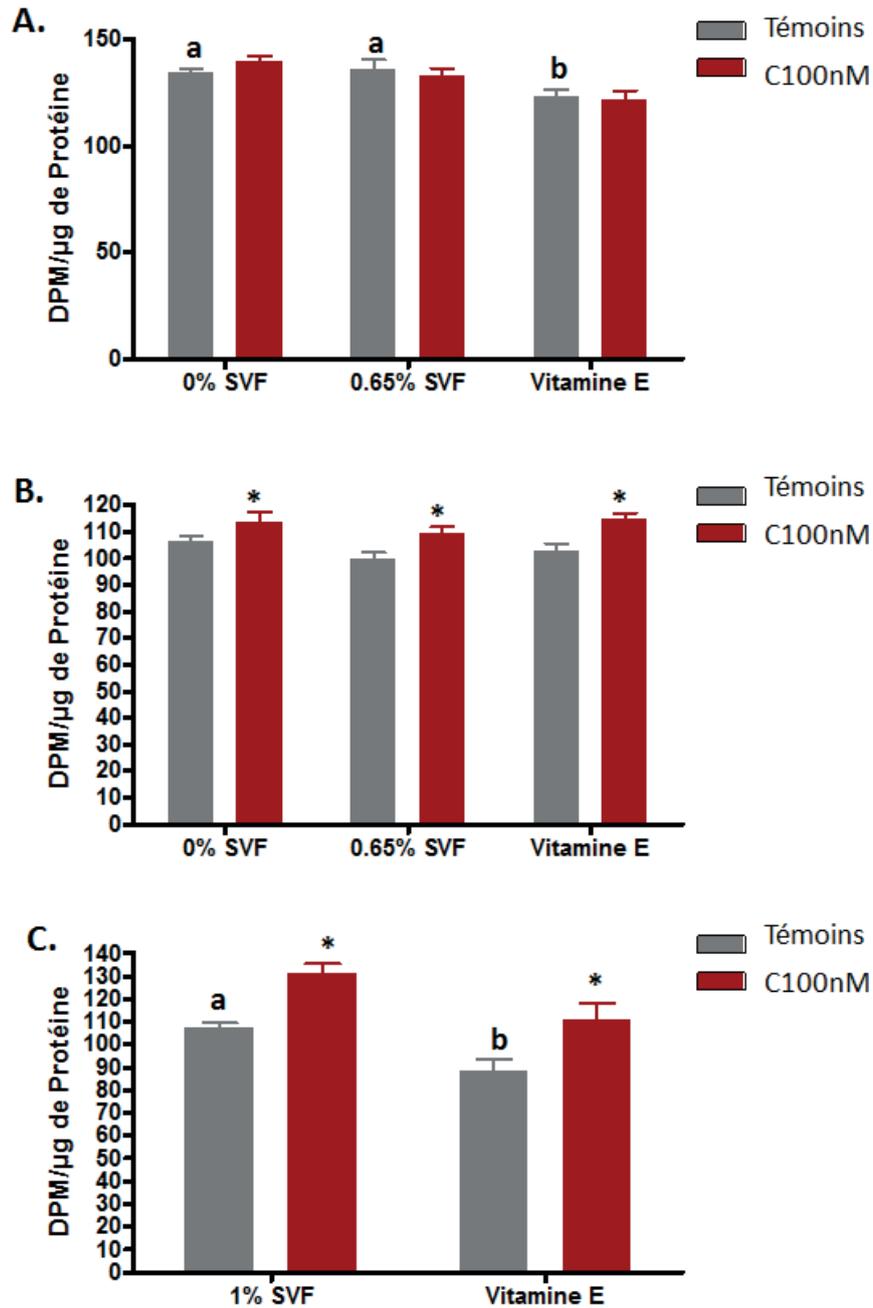
Vit E : Vitamine E 30  $\mu$ M ; DHA : Vitamine E 30  $\mu$ M + DHA 30 $\mu$ M ; AA : Vitamine E 30  $\mu$ M + AA 30 $\mu$ M

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30 $\mu$ M seule ou avec du DHA 30 $\mu$ M ou avec de l'AA 30  $\mu$ M pendant toute la durée de la culture. Pendant les 2 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1% SVF). Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 3 par groupe) correspondent au ratio d'intensité GR sur actine, exprimé en pourcentage de la valeur obtenue pour les cellules témoins (Vit E) sur le même gel. L'analyse par ANOVA 2 (AGPI x traitement à la corticostérone) révèle un effet des traitements aux AGPI ( $F(2,18)=4,924$  ;  $p=0,02$ ) et à la corticostérone ( $F(1,18)=82,563$  ;  $p<0,001$ ), sans interaction entre les 2 facteurs. Des tests post-hoc de Bonferroni ont permis de préciser les effets. a, b : effet significatif du traitement en AGPI sur les cellules cultivées sans corticostérone ; \* : pour chaque condition en AGPI, effet significatif du traitement à la corticostérone.

## ***II.2. Etude de l'expression protéique de GR par Western Blot***

L'étude immunohistochimique révélant des modulations de la répartition de GR au sein des astrocytes en fonction des différents traitements, nous avons choisi de compléter cette étude en analysant par Western Blot l'expression protéique de ce récepteur aux glucocorticoïdes (**Figure 64**).

La réponse des astrocytes à la corticostérone (100 nM, 2 jours d'incubation) se caractérise par une forte diminution de l'expression de GR (-66% ;  $p < 0.001$ ). Le traitement aux AGPI, DHA ou AA, induit également une diminution ( $p = 0,02$ ), plus faible, de l'expression de GR (-36% pour le DHA, -23% pour l'AA). La réponse à la corticostérone inhibitrice sur son propre récepteur est néanmoins maintenue sur les astrocytes enrichis en DHA (-63% ;  $p = 0,002$ ) ou en AA (-62% ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, quel que soit le statut lipidique des astrocytes, le traitement à la corticostérone réduit fortement l'expression protéique des transporteurs GR.



**Figure 65 : Capacité de capture du glutamate des astrocytes cultivés dans différentes conditions de culture (0%SVF, 0,65%SVF, 1% SVF, Vitamine E) et/ou de Corticostérone 100nM pendant 1h (A.), 24h (B.), ou 6 jours (C.)**

Afin de vérifier l'impact de nos conditions de culture, l'effet de la corticostérone 100nM (C100nM) a été appréhendé sur des astrocytes, cultivés en milieu déplété en sérum SVF (0%, 0,65% ou 1%) en présence ou non de Vitamine 30μM pendant 1h, 24h ou 6 jours. Les résultats (Moyenne ± SEM ; n = 6 par condition) sont exprimées en dpm/μg de protéines. L'analyse par ANOVA 2 (condition de culture\*treatment C100nM) pour chaque temps d'incubation révèle un effet global du traitement à la C100nM pendant 24h ( $F(1,39)=15,735$  ;  $p<0,001$ ) et pendant 6 jours ( $F(1,34)=23,374$  ;  $p<0,001$ ). Les différents effets ont été caractérisés par des tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif de la condition de culture en absence de C100nM ; \* : effet significatif de C100 nM au sein d'une même condition de culture

### **III. Etude des capacités de capture du glutamate**

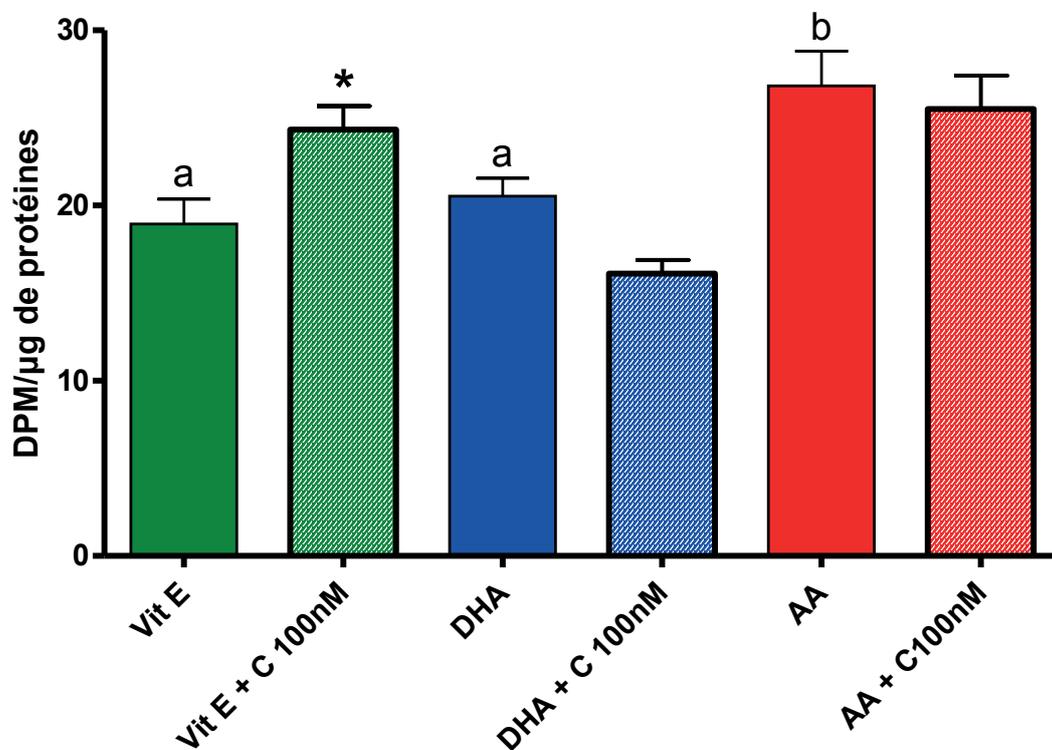
#### ***III.1. Impact d'un traitement en 100nM sur les capacités de capture du glutamate en fonction de la supplémentation en sérum et/ou Vitamine E du milieu***

Pour caractériser l'effet de la corticostérone sur la capture du glutamate, nous avons d'abord vérifié l'impact des conditions de culture imposées par les différents traitements, c'est-à-dire la présence de SVF, nécessaire pour prévenir la dégradation cellulaire, et la présence de Vit E nécessaire pour limiter la peroxydation lipidique.

Nous avons montré que la présence de SVF (1% ou 0.65% versus 0%) n'influence pas le niveau de capture du glutamate (**Figure 65**). En revanche la présence de Vitamine E (30  $\mu$ M) réduit faiblement la capture du glutamate (-10% à -15%, comparativement aux cellules **Figure 65 A et C**).

Le traitement d'une heure à la corticostérone 100 nM (**Figure 65A**) n'a pas d'effet sur la capture du glutamate. En revanche, le traitement à la corticostérone 100 nM, à plus long terme, induit une augmentation significative de la capture du glutamate (+10% après 2 jours d'incubation, **Figure 65B** ; +25% après 6 jours d'incubation, **Figure 65C**).

Nous avons montré également que la concentration en Sérum du milieu (1%, 0.65% ou 0%), ou la présence de Vit E (30  $\mu$ M) n'influencent pas l'effet de la corticostérone sur la capture du glutamate (**Figure 65**).



**Figure 66 : Capacité de capture du glutamate des astrocytes cultivés en présence d'AGPI (DHA et AA) et/ou de Corticostérone 100nM pendant 6 jours**

Vit E : Vitamine E 30 µM ; DHA : Vitamine E 30 µM + DHA 30µM ; AA : Vitamine E 30 µM + AA 30µM

Les astrocytes ont été supplémentés en Vitamine E 30µM seule ou avec du DHA 30µM ou avec de l'AA 30 µM pendant toute la durée de la culture. Pendant les 6 derniers jours, les astrocytes ont été incubés avec de la corticostérone à 100 nM en milieu partiellement déplété en sérum (1% SVF). Les résultats de la capture de glutamate par les cellules (Moyenne ± SEM ; n = 8 par groupe) sont exprimés en dpm/µg de protéines. Et ont été analysés par ANOVA 2 (AGPI x traitement à la corticostérone) suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b : effet significatif du traitement en AGPI sur les cellules cultivées sans corticostérone ; \* : pour chaque condition en AGPI, effet significatif du traitement à la corticostérone.

### ***III.1. Impact croisé des AGPI et de la C100nM sur les capacités de capture du glutamate par les astrocytes en culture***

Les mises au point précédentes montrent l'absence d'interférence de la concentration en sérum et de la présence de vitamine E sur l'impact de la corticostérone sur la capture du glutamate. Nous avons donc pu évaluer l'influence croisée des AGPI et de la corticostérone sur la capture du glutamate dans le milieu de culture utilisé habituellement et contenant 30  $\mu$ M de vitamine E et 0.65% de SVF (apport de SVF associé à la vit E, dont la préparation impose la dilution dans du SVF). L'effet de la corticostérone étant maximal après 6 jours d'incubation, nous n'avons testé l'influence de l'enrichissement en DHA ou AA que dans cette situation (6 jours d'incubation en présence de corticostérone à 100 nM) (**Figure 66**).

#### **A- IMPACT DE L'ENRICHISSEMENT EN AGPI DU MILIEU DE CULTURE**

L'enrichissement du milieu de culture en DHA 30 $\mu$ M ne modifie pas les capacités de capture de glutamate par les astrocytes, comparativement aux cellules témoins (Vit E seule). Par contre, l'enrichissement du milieu de culture en AA 30 $\mu$ M augmente les capacités de capture du glutamate des cellules comparativement à celle des cellules témoins (+41% ;  $p=0,027$ ) ou enrichies en DHA (+30% ;  $p=0,008$ ).

#### **B- IMPACT DE L'ENRICHISSEMENT DU MILIEU DE CULTURE EN C100NM**

Comme nous l'avons observé lors des mises au point des conditions de culture, la corticostérone (6 jours de traitement, 100nM) induit une augmentation significative de 28% de la capture du glutamate sur les cellules témoins, cultivées en présence de Vit E seule ( $p=0,038$ ). L'enrichissement des astrocytes en DHA ou en AA inhibe la réponse à la corticostérone : on n'observe plus d'augmentation de la capture du glutamate sur les cellules enrichies en DHA ou en AA. Au contraire, la corticostérone tend à réduire la capture du glutamate sur les astrocytes enrichis en DHA 30 $\mu$ M (-21% ;  $p=0,058$ ).



## Discussion



Depuis plusieurs décennies, les populations occidentales connaissent un déséquilibre alimentaire croissant des apports en AGPI n-6 et AGPI n-3, pouvant réduire la disponibilité des AGPI n-3 et en particulier du DHA aux tissus (Astorg *et al*, 2004 ; Ailhaud *et al*, 2006). Le cerveau étant un des organes les plus riches en DHA, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact du déséquilibre alimentaire en AGPI n-3 sur le fonctionnement cérébral et les capacités cognitives. Il a notamment été montré qu'une déficience en AGPI n-3 pouvait altérer les capacités d'apprentissage des individus (Fedrorova *et al*, 2007 ; Fedrorova *et al*, 2009 ; Su, 2010) et favoriser les comportements anxieux (Ross *et al*, 2009 ; DeMar *et al*, 2006). A l'inverse, une supplémentation en AGPI n-3 semble faciliter les processus de mémorisation (Vinot *et al*, 2011 ; Chung *et al*, 2008) et réduire l'anxiété (Vinot *et al*, 2011 ; Trofimiuk et Braszko, 2011).

Des études épidémiologiques chez l'Homme ont montré une corrélation entre le statut sanguin des individus en AGPI n-3 et la prévalence de pathologies telles que la dépression et l'anxiété (Perica et Delas, 2011 ; Freeman et Rapaport, 2011 ; Liperoti *et al*, 2009 ; Ross *et al*, 2009). L'incidence et le développement de ces pathologies pouvant être influencées par l'état de stress des individus (Ising et Holsboer, 2006 ; Christoffel *et al*, 2011), des études se sont intéressées à la régulation de la réponse au stress par les AGPI n-3 (Pervanidou et Chrousos, 2011).

Dans ce travail, l'objectif était d'étudier la modulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI n-3. Pour cela, la composition lipidique membranaire de différents partenaires cellulaires a été analysée en fonction des apports en AGPI et du stress. Une approche *in vivo* a, dans un premier temps, permis de décrire la réponse au stress de rats recevant différents apports en AGPI n-3 et soumis à l'âge adulte à un stress chronique de contention. Les variations de poids corporel, la concentration plasmatique de corticostérone, l'expression génique et protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes, ainsi que le comportement émotionnel et les capacités d'apprentissage des rats ont été étudiés. Afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans la modulation des fonctions cérébrales au cours du stress, nous nous sommes intéressés, par des mesures électrophysiologiques ainsi que par l'analyse génique et protéique de marqueurs du fonctionnement synaptique, à une structure cérébrale particulière : la synapse tripartite glutamatergique de la zone CA1 de l'hippocampe (Halassa *et al*, 2007), qui est fortement

impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation et dont l'activité est sensible aux apports en AGPI n-3 et au stress. Puis, dans un deuxième temps, une approche *in vitro* a été utilisée afin de caractériser la réponse spécifique des différents partenaires cellulaires de la synapse tripartite glutamatergique aux variations d'apports en AGPI d'une part, et à l'action des glucocorticoïdes d'autre part. La libération de neurotransmetteurs a été étudiée sur des lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y, tandis que les modulations de la physiologie astrocytaire ont été appréhendées sur un modèle de culture primaire d'astrocytes de rats.

Dans une première partie, nous discuterons des effets des apports en AGPI sur la composition lipidique membranaire cellulaire. Puis nous décrirons la réponse au stress chez le rat et sa modulation par les apports alimentaires en AGPI n-3 avant de discuter les résultats obtenus sur les modèles cellulaires.

## **Partie 1 : Modulation de la composition lipidique membranaire des différents partenaires cellulaires**

La composition lipidique des phospholipides membranaires a été caractérisée dans nos trois modèles d'études. En effet, après avoir étudié la composition lipidique des échantillons de cortex frontaux prélevés sur le rat, nous avons caractérisé grâce aux modèles cellulaires les modulations de la composition lipidique spécifiques des différents partenaires cellulaires impliqués dans la synapse tripartite glutamatergique, les astrocytes et les neurones.

### **I. Impact des apports en AGPI sur la composition lipidique membranaire cellulaire**

#### ***1.1 Modulation de la composition lipidique cérébrale par les apports alimentaires en AGPI n-3 chez le rat***

La déficience en AGPI n-3 est caractérisée par un effondrement des teneurs cérébrales en DHA dans toutes les classes de phospholipides membranaires. Celui-ci est compensé par une augmentation massive de la proportion en DPA (22 :5 n-6), qui, chez des rats recevant un régime équilibré, est quasiment absent des membranes cérébrales. Cet

impact d'une déficience alimentaire en AGPI n-3 sur la composition lipidique des membranes cérébrales a, depuis longtemps, été caractérisé dans des modèles de déficience chronique en ALA (C18 :3 n-3) sur une ou plusieurs générations (Aïd *et al*, 2003 ; Mathieu *et al*, 2008 ; Pifferi *et al*, 2005 ; Ximenes da Silva *et al*, 2002). Le DPA n-6, possédant le même nombre de carbones que le DHA, permet une compensation structurelle de la chute de DHA dans les membranes (Murthy *et al*, 2002). Ainsi, la déficience induit une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans les membranes cérébrales.

A l'inverse de la déficience, l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 préformés (DHA et EPA) induit une augmentation du contenu cérébral en AGPI n-3, notamment en DHA, accompagnée d'une chute de la proportion en AA, comparativement aux rats équilibrés recevant le précurseur ALA. L'EPA étant très minoritaire dans les membranes cérébrales, son contenu n'est que très légèrement augmenté, malgré un apport par l'huile de poisson. De tels résultats ont été retrouvés au niveau plasmatique chez des primates non humains (Vinot *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent que l'apport en AGPI-LC n-3 préformés permet une meilleure incorporation de ces derniers dans les membranes cérébrales, comparé à l'apport du précurseur ALA (Talahalli *et al*, 2010). Ainsi, l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 préformés induit une diminution du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans les membranes cérébrales.

### ***1.2 Modulation de la composition lipidique membranaire par les apports en AGPI sur les modèles cellulaires***

Afin de caractériser les modifications de la composition lipidique des différents partenaires cellulaires de la synapse tripartite, deux modèles de culture cellulaire ont été utilisés : la lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y pour le compartiment neuronal et la culture primaire d'astrocytes de rats nouveau-nés pour le compartiment astrocytaire.

Nos résultats montrent qu'en l'absence d'AGPI, ces deux modèles cellulaires sont caractérisés par une teneur faible en AGPI n-6 et AGPI n-3, qui ne représentent qu'environ 40% des AGT au niveau de la PE. Cette déficience en acides gras essentiels est compensée par une augmentation de la teneur en AGMI et AGPI n-9 sur le modèle de lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y (Langelier *et al*, 2005 ; Mathieu *et al*, 2010), ainsi que sur la culture primaire d'astrocytes (Champeil-Potokar *et al*, 2006 ; Champeil-Potokar *et al*, 2004). De plus, malgré un faible contenu en AGPI essentiels, les AGPI n-6 (AA et DPA n-6)

sont majoritaires comparés aux AGPI n-3 (DHA et EPA), avec un rapport membranaire AGPI n-6/AGPI n-3 dans la PE autour de 1,1 dans les SH\_SY5Y et de 1,7 dans les astrocytes. Ainsi, les cellules SH\_SY5Y et les astrocytes non supplémentés en AGPI présentent un profil lipidique proche de celui observé *in vivo* chez le rat recevant un régime déficient en AGPI n-3 (Alessandri *et al*, 2003 ; Champeil-Potokar *et al*, 2006).

La composition lipidique membranaire a ensuite été analysée d'une part sur des cellules SH\_SY5Y ayant reçu une supplémentation en AGPI à 70µM (DHA ou AA) pendant 72h et d'autre part sur des astrocytes supplémentés tout au long de la culture cellulaire en AGPI à 30µM (DHA ou AA). Nos résultats montrent que dans les 2 modèles cellulaires, l'enrichissement du milieu de culture en DHA ou en AA favorise l'incorporation membranaire de ces acides gras respectifs.

Ainsi, la supplémentation du milieu de culture en DHA induit une forte augmentation du contenu en AGPI n-3 dans toutes les classes de phospholipides. Dans les 2 modèles cellulaires, on observe ainsi une augmentation dans les membranes cellulaires de l'incorporation de DHA, mais également d'EPA suite à la rétroconversion du DHA, que l'on n'observait pas dans les membranes issues de cortex frontal (Alessandri *et al*, 2003 ; Champeil-Potokar *et al*, 2006). L'augmentation du contenu membranaire en AGPI n-3 étant associée à une chute de plus de 50% des AGPI n-6, en particulier AA et DPA n-6, le ratio membranaire AGPI n-6/AGPI n-3 atteint, suite à l'enrichissement du milieu de DHA, la valeur de 0,2 dans les 2 modèles cellulaires. Ainsi, la composition lipidique des membranes des cellules SH\_SY5Y ainsi que des astrocytes en culture supplémentés en DHA présente un profil lipidique proche de celui observé *in vivo* chez le rat recevant un régime équilibré (Alessandri *et al*, 2003 ; Champeil-Potokar *et al*, 2006).

La supplémentation du milieu de culture en AA induit, dans les 2 modèles cellulaires, une réduction du contenu en AGPI n-3, associée à une forte augmentation de la proportion en AGPI n-6 dans les membranes cellulaires. Comme dans le cortex frontal de rats, la chute du contenu en DHA dans les membranes des 2 types cellulaires est compensée par une augmentation du DPA n-6. Ces modifications du contenu lipidique par la supplémentation en AA induisent une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3, qui atteint des valeurs comprises entre 3 et 4 dans la PE des 2 modèles cellulaires. Ainsi, les cellules SH\_SY5Y et les

astrocytes enrichis en AA présentent un profil lipidique déficient en AGPI n-3 encore plus marqué que les cellules cultivées en absence d'AGPI.

Ainsi, la supplémentation en AGPI des cellules en culture permet de modéliser les modifications du profil lipidique observé *in vivo* dans les membranes du cortex frontal, dans le cas d'une déficience en AGPI n-3 ou d'un régime équilibré en AGPI n-3 et n-6.

## **II. Impact du stress sur la composition lipidique membranaire cellulaire**

### ***II.1 Modulation de la composition lipidique corticale chez le rat***

#### **II.1.1 Le stress chronique de contention réduit la proportion en AGPI n-3 des membranes cérébrales chez les rats équilibrés**

Chez les rats équilibrés, le stress de contention engendre une réduction de 13% de la proportion en AGPI n-3, en particulier en DHA, dans les membranes corticales, sans modification de la proportion des autres acides gras. Des études antérieures, menées sur différents modèles de stress chronique, ont déjà suggéré que le stress pouvait altérer la composition lipidique cérébrale. Ainsi, une diminution de la composition en DHA des membranes cérébrales est retrouvée en proportion équivalente chez la souris soumise à un stress chronique imprédictible (Vancassel *et al*, 2008), et au niveau de l'hippocampe de rat ayant subi un stress précoce de séparation maternelle, mais dans une proportion réduite (Mathieu *et al*, 2008). Cette modulation du statut lipidique des individus par le stress a pu être retrouvée au niveau périphérique. Ainsi, un stress psychosocial de séparation familiale est associé à une augmentation du ratio entre AGPI n-6/AGPI n-3 au niveau des phospholipides plasmatiques chez le rat (Clarke *et al*, 2009), ainsi que chez le singe (Laugero *et al*, 2011). Tous ces résultats suggèrent une régulation du métabolisme lipidique par le stress chronique, favorisant l'augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3.

Les AGPI-LC n-3, comme le DHA, sont particulièrement sensibles au phénomène de peroxydation lipidique (Catala, 2010). Or, de nombreuses études ont mis en évidence qu'un stress psychologique favorisait cette voie du métabolisme au niveau cérébral (Kumar *et al*, 2011 ; Fontella *et al*, 2005 ; Zafir et Banu, 2009 ; Lucca *et al*, 2009), comme le montre l'augmentation de la concentration de malondialdéhyde, produit secondaire de la peroxydation lipidique. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact d'un stress

chronique sur les produits spécifiques de la dégradation des AGPI n-6 et n-3, soit respectivement HNE (4-hydroxy-2-nonenal) et HHE (4-hydroxy-hexenal).

Afin de mieux comprendre les processus impliqués dans la modulation de la composition lipidique cérébrale par le stress, il serait intéressant d'effectuer une étude métabolique plus complète, en analysant la composition lipidique au niveau du plasma et du foie, et en étudiant des enzymes clés du métabolisme lipidique. Au niveau cérébral, il serait notamment intéressant de doser l'activité des différentes isoformes des phospholipases A2, qui permettent la libération des AGPI des phospholipides membranaires et qui génèrent des dérivés actifs.

### 1.2.1 L'impact du stress sur la composition lipidique cérébrale est modulé par le régime alimentaire

Nos résultats ont montré chez les rats équilibrés que le stress chronique réduisait le taux d'AGPI n-3 et en particulier de DHA dans les membranes cérébrales. Cet effet est également retrouvé chez les animaux enrichis en AGPI-LC n-3, dans des proportions moindres. Ces résultats suggèrent que l'apport alimentaire en AGPI-LC n-3 préformés pourrait en partie prévenir cette altération de la composition lipidique cérébrale chez les rats stressés. En effet, l'impact du stress observé sur la composition lipidique cérébrale pourrait refléter une altération du métabolisme lipidique et en particulier de la synthèse de DHA à partir de son précurseur, l'apport de DHA préformé pourrait donc limiter cet effet.

La réduction du taux de DHA chez les rats stressés est plus importante dans les groupes présentant des teneurs élevées de cet AGPI dans les membranes cérébrales, c'est-à-dire chez les équilibrés et les enrichis en AGPI-LC n-3. Ainsi, chez les rats déficients en AGPI n-3, aucun effet du stress sur la proportion en AGPI n-3 et en DHA n'a été observé. Chez ces animaux, la proportion en AGPI n-3 et plus particulièrement en DHA étant faible, on peut supposer que des mécanismes de protection se mettent en place afin de maintenir un taux minimal d'AGPI n-3 au niveau cérébral expliquant cette absence d'effet du stress. Des études ont notamment montré une augmentation de la demie-vie du DHA au niveau des phospholipides cérébraux en cas de déficience alimentaire en AGPI n-3 (Demar *et al*, 2004). Ainsi, des mécanismes tels qu'une réduction de l'activité de la iPLA2 ou de la COX 1, enzymes clés du métabolisme du DHA, permettent chez ces animaux déficients en AGPI n-3 de limiter la perte en DHA membranaire (Kim *et al*, 2011).

## ***II.2 Modulation de la composition lipidique membranaire cellulaire dans les modèles cellulaires***

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation par le stress de la composition lipidique, nous avons cherché à caractériser cet effet sur des modèles neuronaux et astrocytaires. Nous nous sommes intéressés à l'impact de l'une des principales hormone impliquée dans la réponse au stress : la corticostérone pour les astrocytes issus de rats et l'hydrocortisone (OH-C) pour les neuroblastomes humains. A notre connaissance, aucune étude jusqu'alors ne s'est intéressée à la modulation de la composition lipidique cellulaire par les hormones du stress sur des modèles *in vitro*.

### **II.2.1 La corticostérone favorise une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 dans la culture primaire d'astrocytes**

Sur le modèle de culture primaire d'astrocytes, le stress a été mimé par l'incubation pendant 6 jours des cellules témoins ou enrichies en DHA ou AA avec la principale hormone du stress chez le rat, la corticostérone.

Nos résultats montrent une légère modification de la composition lipidique suite au traitement à la corticostérone, principalement marqué au niveau de la PE, dans les cellules témoins et dans les cellules enrichies en AA ou en DHA. Ainsi, quel que soit le statut lipidique des astrocytes, on observe une augmentation globale du contenu en DPA n-6 après traitement à la corticostérone. Cet effet est d'autant plus marqué sur les astrocytes enrichis en AA, qui présentent les plus fortes concentrations en AGPI n-6 et plus particulièrement en DPA n-6.

De plus, le traitement à la corticostérone réduit globalement le contenu en EPA de la PE des astrocytes enrichis en DHA. Cet effet est spécifique des cellules supplémentées en DHA, car l'EPA est quasiment absent des membranes cellulaires des astrocytes témoins ou supplémentés en AA.

Ainsi, la chute du contenu membranaire en DHA observée dans les membranes corticales des rats soumis au stress chronique de contention n'est pas retrouvée sur le modèle de culture primaire d'astrocytes après une incubation de 6 jours à la corticostérone 100nM. Cependant, sur ce modèle cellulaire, la corticostérone semble favoriser une

augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 en augmentant le contenu en AGPI n-6, en particulier en DPA n-6 et en réduisant le contenu en AGPI n-3, en particulier en EPA.

### II.2.2 L'hydrocortisone favorise l'incorporation des AGPI dans les lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y

Sur le modèle de lignées de neuroblastomes humains SH\_SY5Y, le stress a été mimé par une incubation de 24h avec la principale hormone du stress chez l'Homme, l'hydrocortisone (OH-C) (lignée d'origine humaine). L'incubation de 24h à l'OH-C a été réalisée soit en amont, soit en aval d'une supplémentation en AGPI (DHA et AA), afin de d'apprécier l'impact de l'hormone du stress respectivement sur l'incorporation et sur la dégradation des acides gras dans les membranes cellulaires.

Nos résultats n'ont montré aucune modulation de la composition lipidique des membranes des cellules SH\_SY5Y par l'incubation à l'OH-C lorsque celle-ci succède à la supplémentation en AGPI, suggérant une absence d'effet du stress sur les AGPI incorporés dans les phospholipides membranaires. Ces résultats sont à mettre en lien avec l'impact restreint du stress chronique de contention sur la composition lipidique corticale des rats recevant le régime enrichi en AGPI-LC n-3.

En revanche, lorsque le traitement à l'OH-C précède la supplémentation en AGPI, il semble favoriser l'incorporation des AGPI dans les membranes. Nos résultats montrent notamment une accumulation accrue des AGPI n-3 dans les cellules enrichies en DHA et à l'inverse une accumulation des AGPI n-6 dans les cellules enrichies en AA. Ainsi, l'OH-C semble favoriser l'incorporation dans les membranes des AGPI disponibles.

Cependant, cette étude de la modulation de la composition lipidique des cellules SH\_SY5Y par l'hormone du stress est une étude préliminaire qui n'a été réalisée qu'une seule fois. Il est donc important de répéter et compléter les expérimentations, afin de confirmer les effets de l'OH-C sur l'incorporation des AGPI dans les membranes cellulaires. De plus, il pourrait être intéressant de mesurer en temps réel, à l'aide de radio-traceur, l'incorporation des différents AGPI dans les membranes cellulaires.

**En résumé,** la modulation des apports alimentaires en AGPI n-3 permet de modifier la composition cérébrale chez le rat. Ces effets peuvent être mimés sur des cultures cellulaires, telles que la lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y ou la culture primaire d'astrocytes, en supplémentant le milieu de culture en AGPI. Chez le rat, le stress chronique de contention réduit le contenu membranaire en AGPI n-3 et plus particulièrement en DHA. Ainsi, le stress chronique favoriserait une augmentation du ratio membranaire AGPI n-6/AGPI n-3. De tels résultats sont également retrouvés sur la culture primaire d'astrocytes, où l'incubation à la corticostérone facilite l'accumulation de DPA n-6 et à l'inverse réduit le contenu en EPA. *In vivo*, nous avons mis en évidence que les effets du stress chronique sur la composition corticale en AGPI n-3 sont réduits en condition d'enrichissement en AGPI-LC n-3 et annulés dans le cas d'une déficience en AGPI n-3, situation de faible teneur en AGPI n-3. Notre approche préliminaire sur les cellules SH\_SY5Y suggère que l'hormone du stress pourrait favoriser l'accumulation dans les membranes des AGPI disponibles. Ainsi, chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, on peut supposer que l'incorporation facilitée du DHA et EPA préformés présent dans le régime permet de limiter les effets du stress. Chez les rats déficients en AGPI n-3, il est possible qu'il existe des mécanismes d'adaptation visant à limiter une perte accrue de DHA membranaire.

## **Partie 2 : Modulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI n-3 chez le rat**

La réponse au stress a été caractérisée chez des rats recevant différents régimes alimentaires (déficient en AGPI n-3, équilibré ou enrichi en AGPI-LC n-3) suite à un stress chronique de contention (6h/jour pendant 21 jours). Dans une première partie, nous discuterons des effets du stress de contention observés sur les différents paramètres étudiés chez les rats recevant le régime équilibré en AGPI. Puis, dans une deuxième partie, nous nous intéresserons à la régulation de cette réponse au stress par la modulation des apports alimentaires en AGPI.

## **I. Caractérisation des effets du stress chronique de contention chez les rats équilibrés**

### ***1.1 Le stress chronique de contention module la croissance pondérale et la concentration plasmatique de corticostérone***

Nos résultats montrent une perte de poids significative des rats après 21 jours de contention, en accord avec les données de la littérature (McLaughlin *et al*, 2007 ; Conrad *et al*, 2004 ; Cordero *et al*, 2005 ; Kittraki *et al*, 2004 ; Hageman *et al*, 2009). Au cours des 6h quotidiennes de mise en contention, les rats stressés n'ont accès ni à l'eau, ni à la nourriture. L'étude de la consommation alimentaire nous a permis de voir que sur la période des 21 jours de stress, les animaux stressés consomment significativement moins de nourriture que les non stressés, ce qui peut, en partie, expliquer leur perte de poids. Cependant, une baisse de poids similaire est observée chez des animaux soumis à des injections quotidiennes de corticostérone n'engendrant aucune restriction d'accès à la nourriture (Coburn-Litvak *et al*, 2003 ; Kalynchuk *et al*, 2004 ; Marks *et al*, 2009), suggérant un effet propre du stress sur la croissance pondérale. Par ailleurs, la perte de poids associée au stress chronique de contention est également observée chez des rats dont la ration alimentaire est maintenue équivalente à celle de témoins non stressés (Harris *et al*, 2002).

Des études ont montré que cette perte de poids induite par le stress chronique pouvait être liée à une altération de la balance énergétique, caractérisée par une diminution de la prise alimentaire, associée à une augmentation de la dépense énergétique (Harris *et al*, 2006 ; Harris *et al*, 2002). En effet, l'axe corticotrope participe à la régulation de la balance énergétique (Nieuwenhuizen et Rutters, 2008). Il interagit par exemple avec des voies de signalisation telle que NPY (Neuropeptide Y) et POMC (ProOpioMelanoCortin) (Chen *et al*, 2008 ; Sweerts *et al*, 2001 ; Hotta *et al*, 1991), qui participent à la régulation de l'appétit. Suite à un stress chronique, l'activation de l'axe corticotrope perturbe les mécanismes de régulation de la balance énergétique, engendrant une réduction de la capacité de l'organisme à s'adapter aux modifications de son équilibre métabolique.

La procédure de stress de contention induit une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone, caractérisée par un pic de la concentration dès 30 minutes après la mise en contention suivie d'une stabilisation jusqu'à l'issue des 6 heures. Cet effet

persiste tout au long des 21 jours de stress. Cette évolution du taux de corticostérone au cours d'une journée de contention a déjà été mise en évidence dans d'autres études, qui montrent un pic de la concentration en corticostérone dans les 30 à 60 minutes qui suivent la mise en contention, suivie d'une stabilisation ou d'une diminution (Barnum *et al*, 2007 ; Mizoguchi *et al*, 2001). Cette augmentation de la concentration plasmatique reflète l'activation de l'axe corticotrope par le stress de contention.

La corticostérone exerce son effet *via* deux types de récepteurs, les GR et les MR. Nous avons donc étudié la régulation par le stress de l'expression génique et protéique de ces récepteurs au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Nos résultats n'ont montré aucune modulation de leur expression chez les rats stressés. Les données de la bibliographie suggèrent une diminution de l'expression génique de GR au niveau de l'hippocampe suite à un stress chronique de contention, sans modification du contenu en MR (Hageman *et al*, 2009 ; Kitraki *et al*, 2004 ; Chen *et al*, 2008). Cependant, ces relevés ont été effectués dans les 24h suivant la dernière session du stress, contrairement à notre étude où les tissus ont été prélevés une semaine après la dernière session de stress. En effet, des études menées sur les conséquences à long-terme d'un stress chronique imprédictible a montré que si un stress pouvait induire des changements rapides de l'expression des récepteurs GR et MR, des mécanismes sont mis en place rapidement après l'arrêt du stress pour normaliser les niveaux d'expression des récepteurs (Paskitti *et al*, 2000 ; Llorente *et al*, 2011 ; Romeo *et al*, 2008). Ainsi, nos résultats sont en accord avec une régulation appropriée des récepteurs GR pour permettre une normalisation rapide et un maintien de l'homéostasie (Herman et Spencer, 1998). De plus, l'exposition répétée à des stimuli homotypiques, comme c'est le cas au cours d'un stress chronique de contention, peut générer des phénomènes d'adaptation et d'habituation des rats (Grissom et Bhatnagar, 2009), aboutissant à une réduction voire une annulation des effets du stress sur divers paramètres. Ce processus d'adaptation est notamment caractérisé par une régulation de l'axe corticotrope et une réduction de la réponse de la corticostérone (Grissom et Bhatnagar, 2009 ; Bhatnagar *et al*, 2002). Dans notre étude, les résultats ont montré que l'amplitude du pic de la corticostérone plasmatique était maintenue tout au long des 21 jours de stress, les rats ne semblant donc pas développer de mécanismes d'adaptation. Cependant, l'étude de l'expression des récepteurs GR à différents stades du protocole de stress, et immédiatement après la

dernière session de contention est nécessaire afin de mieux caractériser les processus mis en place dans leur régulation au cours du stress chronique.

## ***1.2 Le stress chronique de contention module le comportement émotionnel, mais pas les capacités d'apprentissage***

### ***1.2.1 L'activité locomotrice est réduite chez les rats stressés***

Nos résultats mettent en évidence une diminution de l'activité locomotrice chez les rats stressés. Dans le test de l'openfield, l'activité globale définie comme la somme des déplacements horizontaux (traversées) et verticaux (redressements) est globalement réduite chez les rats stressés. Dans le labyrinthe en croix surélevée, le stress diminue significativement le nombre d'entrées effectuées, paramètre reflétant leur activité motrice. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant une réduction du nombre de traversées dans un test d'openfield (Huynh *et al*, 2011 ; Cruz *et al*, 2012) ou bien du nombre d'entrées totales dans les bras d'un labyrinthe en croix surélevée (Bowman *et al*, 2009) suite à un stress chronique de contention. En revanche, notre étude ne montre aucune différence entre les groupes sur l'activité dans le test d'actimétrie.

Les données de la littérature concernant l'impact d'un stress chronique sur l'activité locomotrice des animaux sont assez disparates. D'autres études n'ont montré aucun effet d'un stress chronique de contention sur l'activité locomotrice mesurée dans l'openfield (Trofimiuk et Braszko, 2011 ; D'Aquila *et al*, 2000 ; Gregus *et al*, 2005). Ainsi, aucun effet clair du stress chronique sur l'activité locomotrice ne peut être défini.

Les différences de résultats que nous observons entre les différents tests comportementaux peuvent être liées au caractère anxiogène des dispositifs utilisés. En effet, l'openfield (Prut et Belzung, 2003), mais plus encore le labyrinthe en croix surélevée (Walf et Frye, 2007), ont été conçus afin d'évaluer le degré d'anxiété des animaux, contrairement au test d'actimétrie peu stressant. La diminution d'activité observée dans l'openfield et dans le labyrinthe en croix surélevée suggère ainsi une sensibilité accrue à un environnement anxiogène chez les rats stressés. Ainsi, plus le test comportemental est anxiogène, plus les rats réduisent leur activité locomotrice.

### 1.2.2 La réponse émotionnelle des rats est modulée chez les rats stressés

La réponse émotionnelle a été appréciée à travers la mesure du temps de toilettage dans l'openfield, la visite des bras ouverts considérés comme anxiogènes dans le labyrinthe en croix surélevée, la préférence au sucrose, l'acquisition et l'extinction d'une peur conditionnée et le réflexe de sursaut.

Nos résultats ont montré une augmentation importante du temps de toilettage au cours du test de l'openfield chez les animaux stressés. Le toilettage constitue un rituel important chez le rongeur, lui permettant de maintenir l'hygiène de son corps, mais ce comportement est fortement influencé par l'environnement extérieur et notamment par la survenue d'évènements stressants (Kalueff et Tuohimaa, 2005 ; Spruijt *et al*, 1992 ; Van Erp *et al*, 1994 ; Kompagne *et al*, 2008 ; D'Aquila *et al*, 2000), bien que le mécanisme exact mis en jeu n'ait pas encore pu être déterminé. Nous pouvons ainsi considérer dans notre étude que l'augmentation du temps de toilettage reflète une augmentation de l'anxiété chez les rats stressés ; cela est en accord avec les résultats obtenus sur les résultats obtenus dans l'openfield et le labyrinthe en croix surélevée qui reflétaient une sensibilité accrue à l'environnement anxiogène des animaux stressés. En effet, une stimulation du comportement de toilettage peut être observée dans deux types de situations extrêmes : en situation non stressante, où elle est associée à un caractère de confort et de relaxation, et à l'inverse, après un stress intense, où elle est considérée comme un marqueur de l'état d'anxiété des animaux (Kalueff, 2000). Des analyses plus poussées des modulations de ce comportement ont mis en place un algorithme d'analyse chez les rongeurs permettant de déterminer leur état de stress (Kalueff et Tuohimaa, 2005 ; Kalueff et Tuohimaa, 2004). Ces études ont permis d'associer l'augmentation du temps de toilettage en condition de stress à des interruptions plus nombreuses du rituel de toilettage et des erreurs dans sa réalisation qui obéit à une organisation céphalo-caudale (débutant par le toilettage de la tête et finissant par la queue), reflétant ainsi une altération d'un comportement quotidien.

Par la suite, l'état d'anxiété des rats a été davantage caractérisée par la mesure des entrées et du temps passés dans les bras ouverts sur le vide d'un labyrinthe en croix surélevée, qui sont considérés comme anxiogènes (Walf et Frye, 2007). Cependant, les rats, quel que soit leur état de stress, n'ont passé en moyenne que 6-7% du temps de test dans les bras ouverts, contrairement au 20-30% habituellement observé dans ce test (Carobrez et

Bertoglio, 2005). L'étude de Trofimiuk et Braszko, 2011 présente des résultats similaires et montre que les rats de souche Wistar n'effectuent en moyenne que 1-2 entrées dans les bras ouverts et n'y passent qu'environ 2-3% du temps de test. Nous avons donc décidé d'étudier l'intérêt des rats pour les bras ouverts du labyrinthe en comptabilisant le nombre d'entrées effectuées par leurs 2 pattes antérieures, les rats restant en effet souvent au début du bras, sans s'y engager totalement. Nos résultats révèlent alors une réduction globale du nombre d'entrées dans les bras ouverts chez les rats stressés comparativement aux rats non stressés, sans modification du pourcentage d'entrées dans les bras ouverts/entrées totales. Ainsi, si la réduction du nombre d'entrées dans les bras ouverts peut en partie refléter une augmentation de l'anxiété des rats, comme cela a déjà été montré (Huynh *et al*, 2011 ; Bowman *et al*, 2009), il semble qu'elle est aussi particulièrement liée à une diminution globale de leur activité.

L'analyse de la préférence au sucrose, de l'acquisition et de l'extinction d'une peur conditionnée et de la réaction au sursaut ne révèlent aucune différence entre les rats non stressés et stressés. Les données de la littérature sur l'effet du stress chronique sur la réponse émotionnelle sont très divergentes en fonction des protocoles de stress étudiés (Buynitsky et Mostofsky, 2009). Ainsi, contrairement à nos résultats, des études montrent qu'un stress chronique de contention stimule l'acquisition et à l'inverse inhibe l'extinction d'une peur conditionnée (Wilber *et al*, 2011). De même, le stress pourrait réduire la préférence au sucrose (Veena *et al*, 2009) et stimuler l'inhibition du sursaut au son (PPI) lorsque celui-ci est précédé d'un son d'intensité plus faible (Chen *et al*, 2010). Il est probable que le faible impact du stress chronique de contention dans notre étude reflète une habituation des rats aux répétitions quotidiennes de la procédure de mise en contention. Il semble à ce stade intéressant d'étudier la réponse émotionnelle des animaux à un stade intermédiaire du stress ; par exemple en effectuant un test dans un labyrinthe en croix surélevée à l'issue des 10 premiers jours de contention.

Des études précédentes menées au laboratoire ont cherché à caractériser la réponse émotionnelle des rats soumis à un autre paradigme de stress : la séparation maternelle précoce. Dans ce contexte, les rats stressés présentaient à l'âge adulte une augmentation de l'impulsivité et de l'anxiété dans un openfield et un labyrinthe en croix surélevée et une augmentation de la préférence au sucrose, sans modification de leur réaction lors d'un test

de peur conditionnée (Mathieu *et al*, 2008 ; Mathieu *et al*, 2011). Ces résultats diffèrent des nôtres par la nature du stress et notamment par la période au cours de laquelle il a lieu. Ainsi, au cours du développement, les rats semblent plus sensibles aux évènements stressants, qui auront des répercussions à long terme. En revanche, les rats semblent capables de développer plus facilement des processus d'adaptation au stress lorsque celui-ci est effectué à l'âge adulte, comme c'est le cas dans notre étude. Tous ces résultats montrent qu'un stress chronique, quel qu'en soit la nature, module de manière complexe la réponse émotionnelle des rats. Dans notre étude, le stress répété de contention a été choisi dans le but de pouvoir le reproduire périodiquement tout au long de la vie de l'animal dans le cadre du projet plus large NeurΩ3 (ANR 2010-2013) dont l'objectif est d'étudier l'impact du stress chronique sur le vieillissement cérébral en fonction des apports nutritionnels en AGPI n-3. L'utilisation de ces différents paradigmes de stress, l'un essentiellement de nature psychologique (séparation maternelle) et l'autre associant une forte composante physique (contention), permet de révéler et de discriminer des différences de sensibilité des sujets selon leur statut en AGPI n-3.

### 1.2.3 Les capacités d'apprentissage dans le labyrinthe de Barnes sont maintenues chez les rats stressés

Nos résultats n'ont mis en évidence aucune modification des capacités d'apprentissage spatial des rats par le stress chronique de contention dans le labyrinthe de Barnes. Des données bibliographiques montrent, à l'inverse, une augmentation du nombre d'erreurs et du temps d'apprentissage dans le labyrinthe en Y (McLaughlin *et al*, 2007 ; Ramkumar *et al*, 2008), la piscine de Morris (Sandi *et al*, 2003), ou le labyrinthe radiaire (Srikumar *et al*, 2007 ; Veena *et al*, 2009), suggérant une altération des capacités d'apprentissage. Tous ces tests sont basés sur la motivation des animaux à échapper à une situation aversive (restriction alimentaire ou immersion dans l'eau (Morris, 1984). Dans notre étude, nous avons choisi de tester les capacités d'apprentissage dans le labyrinthe de Barnes, équivalent « sec » de la piscine de Morris (Barnes, 1979). Dans ce test, le stimulus aversif, constitué par un éclairage intense de la plateforme associé à un bruit inhospitalier, est moins aversif que celui des autres tests. Ainsi, les résultats concernant l'impact d'un stress chronique sur ce type de test sont plus mitigés et si certains mettent en évidence une réduction des capacités d'apprentissage des animaux (Trofimiuk et Braszko, 2011 ; Trofimiuk

et Braszko, 2007), d'autres études n'ont mis aucun effet du stress de contention en évidence (Walesiuk et Braszko, 2010 ; Wielgat *et al*, 2011). L'analyse des paramètres moteurs des rats nous a permis de voir que le stress chronique de contention accentuait la sensibilité des rats à un environnement stressant, en réduisant davantage leur activité locomotrice dans les labyrinthes les plus anxiogènes. Le labyrinthe de Barnes ne constitue donc peut être pas un environnement suffisamment anxiogène pour pouvoir dégager des effets du stress.

### ***1.3 Le stress chronique de contention module les paramètres électrophysiologiques***

#### ***1.3.1 La probabilité de libération pré-synaptique de glutamate est réduite chez les rats stressés***

Nos résultats montrent que le stress chronique de contention augmente la PPF, suggérant une réduction de la libération stimulée pré-synaptique de glutamate. Cette réponse a également été observée suite à un stress chronique imprédictible chez le rat (Alfarez *et al*, 2003). En revanche, l'analyse de la courbe d'intensité-réponse n'a mis en évidence aucune modulation de l'efficacité synaptique par le stress chronique de contention. Quelle que soit l'intensité de stimulation, le stress ne modifie pas le nombre de fibres nerveuse recrutées (reflétées par la mesure de la VA), ni la réponse globale (reflétée par la mesure des PPSEs) ou propre à chaque fibre nerveuse (reflétée par le ratio PPSEs/VA) lors de stimulations uniques.

L'augmentation de la PPF suggère une modulation des phénomènes pré-synaptiques. Les modifications du niveau d'expression des transporteurs vésiculaires du glutamate, V-Glut 1 & 2, sont fortement impliquées dans les variations de libération pré-synaptique de glutamate (Moechars *et al*, 2006 ; Wilson *et al*, 2005). Ainsi, une forte expression des transporteurs vésiculaires est associée à une probabilité de libération du glutamate plus importante. Dans notre étude, l'analyse de l'expression génique et protéique des transporteurs vésiculaires V-Glut 1 & 2 n'a pas mis en évidence de variations significatives chez les rats stressés, suggérant une régulation de la libération pré-synaptique de glutamate indépendante de l'expression de ces transporteurs et donc du chargement des vésicules pré-synaptiques en neurotransmetteurs. Nos résultats ne permettent pas cependant d'exclure des modifications de fonctionnalité de ces transporteurs.

Ces résultats sur la libération pré-synaptique de glutamate vont à l'encontre de la majorité des données de la littérature, qui suggère que le stress chronique et les glucocorticoïdes ont un effet stimulateur sur la libération de glutamate (de Vasconcellos-Bittencourt *et al*, 2011 ; Fontella *et al*, 2004 ; Wang et Wang, 2009), favorisant son accumulation dans la fente synaptique et ainsi les phénomènes d'excitotoxicité (Mogghadam *et al*, 1994 ; Lowy *et al*, 1993). Cependant, ces effets sont plus particulièrement liés à une augmentation de la libération basale de glutamate, et non à celle de la libération stimulée (Fontella *et al*, 2004). Il serait donc intéressant de compléter ces études par des mesures de libération spontanée du glutamate.

De plus, toutes les expérimentations décrites dans la bibliographie ont été menées dans les 24h suivant la dernière exposition à l'agent stressant, contrairement à notre protocole dans lequel les mesures électrophysiologiques ont été réalisées 72h après la dernière exposition au stress, les conditions d'expérimentation nécessitant le transport puis l'habituation des rats dans un nouvel environnement. On peut alors supposer que l'organisme, afin de pallier à l'excès de glutamate extracellulaire lié au stress (Mogghadam *et al*, 1994 ; Lowy *et al*, 1993), met en place des mécanismes de rétrocontrôle visant à réduire la libération de glutamate pré-synaptique. Deux systèmes de régulation ont notamment été décrits : l'un direct faisant intervenir des récepteurs pré-synaptiques au glutamate et l'autre indirect faisant intervenir les endocannabinoïdes. Ainsi, les extrémités neuronales pré-synaptiques expriment des autorécepteurs, permettant une boucle d'autorégulation de la libération de neurotransmetteurs ainsi que de la plasticité à court terme (Kwon et Castillo, 2008). Parmi ces récepteurs, les récepteurs métabotropiques du glutamate, notamment mGluR 7, ont été décrits comme ayant une action inhibitrice sur la libération de glutamate (Martin *et al*, 2007 ; Martin *et al*, 2008 ; Pelkey *et al*, 2005). L'augmentation de l'expression génique de ces récepteurs observée chez les rats stressés pourrait ainsi contribuer à la modulation de la libération de glutamate comme nous le décrivons plus tard.

Le second mécanisme de régulation fait intervenir la voie des endocannabinoïdes, qui est activée suite à un stress chronique répété, tel celui utilisé dans l'étude (Patel et Hillard, 2008 ; Rademacher *et al*, 2008). Les endocannabinoïdes, *via* leur récepteurs pré-synaptiques CB1, ont été décrits comme inhibant la neurotransmission glutamatergique, notamment au niveau du système limbique (Lafourcade *et al*, 2007 ; Domenici *et al*, 2006 ; Maejima *et al*,

2001). Les analyses effectuées au cours de notre étude ne permettent pas de déterminer si cette voie de signalisation contribue aux variations de la libération pré-synaptique de glutamate observées suite au protocole de stress et reste aujourd'hui à étudier.

### 1.3.2 La plasticité synaptique, en particulier la LTP, est modulée chez les rats stressés

Dans notre étude, le stress de contention réduit de manière significative la LTP, sans modification de la LTD. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, qui montrent, au niveau de l'hippocampe, une altération de l'induction de la LTP chez des animaux soumis à un stress chronique imprédictible (Krugers *et al*, 2006 ; Alfarez *et al*, 2003), à un stress répété de contention (Pavlidis *et al*, 2002) ou à des injections répétées de corticostérone (Bodnoff *et al*, 1995 ; Pavlidis *et al*, 1993).

Il a été suggéré que l'impact d'un stress chronique sur la LTP fait intervenir l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes GR. Ainsi, après un stress chronique, le blocage de ces récepteurs par des antagonistes spécifiques restaure rapidement les propriétés de plasticité cérébrale au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (Krugers *et al*, 2006). Nos résultats ne permettent pas de vérifier cette hypothèse. Aucune modulation de l'expression génique ou protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes, GR et MR, n'a été mise en évidence. Cependant, nous ne nous sommes pas intéressées à l'activité de ces récepteurs. Afin de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu, il serait intéressant d'étudier la modulation des paramètres électrophysiologiques de la synapse glutamatergique hippocampique en présence d'antagonistes spécifiques des différents récepteurs aux glucocorticoïdes.

La réduction de la LTP par le stress chronique de contention peut impliquer différents mécanismes. Tout d'abord, elle pourrait être liée à une modification des propriétés membranaires des cellules. En effet, une modification du potentiel de repos ou de la résistance de la membrane pourrait modifier le seuil d'activation des récepteurs post-synaptiques au glutamate, AMPA et NMDA, et ainsi compromettre les phénomènes de LTP (Bliss et Collingridge, 1993). Cependant, l'étude de la courbe intensité-réponse ne montrant pas de modification de l'efficacité synaptique, ni du recrutement des fibres nerveuses par le protocole de stress, cette hypothèse est peu probable.

Par ailleurs, l'induction et le maintien de la LTP nécessite l'intervention de deux types de récepteurs ionotropiques au glutamate : les récepteurs NMDA et AMPA (Citri et Malenka, 2008). L'analyse de l'expression génique des différentes sous-unités de ces récepteurs n'a pas permis de mettre en évidence une modulation par le stress. Cependant, les données de la littérature suggèrent que le stress chronique affecte peu l'expression génique ou protéique des récepteurs AMPA et NMDA (Liu *et al*, 2006), en accord avec nos résultats. Il semble que la corticostérone affecte davantage la mobilité et le trafic des récepteurs, notamment AMPA, entre la membrane plasmique et le cytoplasme (Martin *et al*, 2009 ; Groc *et al*, 2008). Ainsi, si notre étude ne montre aucune modulation de l'expression génique des récepteurs, il serait intéressant de compléter ces données avec la mesure de l'expression protéique d'une part, mais surtout avec des mesures permettant d'appréhender la fonctionnalité des récepteurs comme par exemple leur taux d'expression à la membrane.

Enfin, la diminution de la LTP chez les rats stressés pourrait impliquer une perturbation des phénomènes secondaires au niveau du neurone post-synaptique, tels que les flux calciques cellulaires ou les cascades de réaction impliquées dans la génération de la LTP. Les glucocorticoïdes modulent notamment l'influx calcique cellulaire au niveau du système limbique et plus particulièrement de l'hippocampe (Joëls et Karst, 2011). Des études ont ainsi montré que l'activation des récepteurs GR après un stress chronique imprédictible engendrait une augmentation de l'amplitude des courants calciques au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe (Karst et Joëls, 2007). De plus, des études ont montré une altération par le stress chronique des voies de signalisation activées au cours de la LTP, telles que les voies de la CaMKII (Aleisa *et al*, 2006 ; Gerges *et al*, 2004) ou de la MAPK (Liu *et al*, 2011 ; Li *et al*, 2009 ; Meller *et al*, 2003).

#### ***1.4 Le stress chronique de contention module l'expression génique de certains marqueurs de la synapse tripartite glutamatergique***

##### ***1.4.1 L'expression génique de BDNF est augmentée chez les rats stressés***

Nos résultats montrent une augmentation de 65% de l'expression génique de BDNF chez les rats stressés, sans modification de l'expression des autres facteurs de croissance. Les données de la littérature concernant l'impact d'un stress chronique sur l'expression de BDNF sont assez disparates. Ainsi, une augmentation de l'expression génique et/ou

protéique de BDNF a été retrouvée au niveau de différentes structures cérébrales telles que l'hippocampe et l'hypothalamus après un stress chronique de contention (Naert *et al*, 2011) ou un stress chronique imprédictible (Li *et al*, 2007 ; Bergström *et al*, 2008 ; Larsen *et al*, 2010). A l'inverse, d'autres études ne montrent aucune variation (Lee *et al*, 2006 ; Lucca *et al*, 2008 ; Allaman *et al*, 2008) ou même une diminution (Cieslik *et al*, 2011 ; Song *et al*, 2006 ; Gronli *et al*, 2006) de l'expression de BDNF avec le stress. Cette grande variabilité de résultats peut s'expliquer par la grande variabilité des protocoles utilisés ; il a notamment été montré que l'expression génique ou protéique de BDNF variait en fonction de l'âge et de l'espèce des individus, de la durée et de la répétition du stress, ainsi que du type d'agents stressants (Nair *et al*, 2007 ; O'Mahony *et al*, 2011 ; Shao *et al*, 2010).

Le BDNF est une protéine de la famille des neurotrophines, importante pour la survie, le maintien et la croissance des neurones. Il semble notamment jouer un rôle dans la plasticité synaptique (Waterhouse et Xu, 2009 ; Lu *et al*, 2008 ; Gottmann *et al*, 2009). En effet, synthétisé et sécrété en fonction des besoins de l'activité synaptique, le BDNF est impliqué dans l'induction et le maintien de la LTP. L'augmentation de l'expression génique de BDNF que nous observons pourrait avoir différentes conséquences. Tout d'abord, elle pourrait favoriser la perte de poids des animaux soumis au stress de contention, en modulant les voies métaboliques impliqués dans la prise alimentaire (Rosas-Vargas *et al*, 2011). Ainsi, des injections paracérébroventriculaires de BDNF réduisent l'appétit des animaux et ainsi leur prise alimentaire, engendrant une perte de poids (Toriya *et al*, 2010 ; Pellemounter *et al*, 1995). De plus, le BDNF a un effet protecteur vis-à-vis des altérations neuronales, astrocytaires, et comportementales induites par le stress (Radecki *et al*, 2005 ; Ye *et al*, 2011) et participe notamment aux phénomènes de résilience au stress chronique (Taliaz *et al*, 2011 ; Feder *et al*, 2009). Par exemple, un modèle de KD (Knock-Down) de BDNF favorise les phénotypes dépressifs, tandis qu'une surexpression de BDNF inhibe l'effet anhédonique d'un stress chronique. Une augmentation de l'expression de BDNF semble ainsi refléter une adaptation des animaux au stress.

#### 1.4.2 L'expression génique du récepteur métabotrope du glutamate mGluR7 est augmentée chez les rats stressés

Nos résultats montrent une augmentation de 48% de l'expression génique du récepteur métabotrope du glutamate mGluR7, sans modification de l'expression des autres récepteurs métabotropiques du glutamate.

L'activation des récepteurs mGluR7 par un agoniste spécifique augmente la concentration plasmatique en hormones du stress, telles que la corticostérone et l'ACTH (Mitsukawa *et al*, 2005). Ces résultats suggèrent fortement que les récepteurs mGluR7 participent à la réponse au stress (O'Connor *et al*, 2010).

Le récepteur mGluR7 est abondamment exprimé au niveau des zones cérébrales impliquées dans les manifestations de l'anxiété, telle que l'hippocampe, l'amygdale et le locus coeruleus (Kinoshita *et al*, 1998). Des modèles de souris KO en mGluR7 présentent un niveau d'anxiété réduit dans des tests comportementaux tels que le labyrinthe en croix surélevée, ainsi qu'une diminution des comportements dépressifs comme l'immobilisation dans le test de nage forcée ou bien de suspension par la queue (Cryan *et al*, 2003 ; Stachowicz *et al*, 2008). Ainsi, l'augmentation de son expression est cohérente avec les modulations de la réponse émotionnelle observée chez les rats stressés au cours de l'étude comportementale. En effet, nos résultats ont mis en évidence chez les rats stressés, une augmentation de l'anxiété, ainsi que de la sensibilité aux environnements anxiogènes.

Par ailleurs, les récepteurs mGluR7, principalement exprimés au niveau des membranes pré-synaptiques, inhibent la libération pré-synaptique de glutamate (Martin *et al*, 2007 ; Martin *et al*, 2008 ; Millan *et al*, 2002) et l'augmentation de son expression pourrait ainsi en partie expliquer les résultats obtenus en électrophysiologie, qui montrent une augmentation de la PPF et donc une réduction de la libération pré-synaptique de glutamate chez les rats stressés.

#### 1.4.3 L'expression génique de la syntaxine 1a est augmentée chez les rats stressés

Nos résultats montrent une augmentation de 42% de l'expression génique de la syntaxine 1a au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe chez les rats stressés. Des études précédentes ne montrent aucune modulation de l'expression génique ou protéique de la syntaxine 1a au niveau de l'hippocampe entier après un stress chronique de contention

(Müller *et al*, 2011 ; Gao *et al*, 2006). Cela suggère une régulation très spécifique de l'expression de la syntaxine 1a par le stress au sein de l'hippocampe, visible au niveau de la zone CA1 et non de l'hippocampe entier.

La syntaxine 1a est une protéine ancrée dans la membrane plasmique des neurones, qui, avec les protéines VAMP2 et SNAP 25, participent à la formation du complexe SNARE et à l'exocytose des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Une augmentation de son expression pourrait correspondre à une facilitation des phénomènes d'exocytose et ainsi une augmentation de la libération de neurotransmetteur. Cependant, cette hypothèse semble peu probable, nos résultats n'ayant montré aucune modulation de l'expression génique des autres protéines impliquées dans la formation du complexe SNARE (VAMP2 et SNAP25) et dans le processus d'exocytose (Synaptophysine, Synaptotagmine, Synapsine). De plus, les mesures électrophysiologiques effectuées suggèrent davantage une réduction de la libération pré-synaptique de glutamate, plutôt qu'une augmentation.

Des études ont montré une interaction directe entre la syntaxine 1a et les canaux potassiques voltage-dépendants membranaires d'une part (Fili *et al*, 2001 ; Regev *et al*, 2009 ; Michaelievski *et al*, 2007) et les canaux calciques d'autre part (Keith *et al*, 2007 ; Jarvis *et al*, 2000 ; Davies *et al*, 2011) impliqués dans les propriétés d'excitabilité des cellules et de libération des neurotransmetteurs. Ces interactions engendrent une réduction des flux ioniques et une inactivation des canaux. Ces phénomènes pourraient contribuer à la régulation de la libération pré-synaptique de neurotransmetteur en condition stimulée (Keith *et al*, 2007) et ainsi aux modulations de la PPF observées chez les rats stressés, bien que les mécanismes mis en jeu restent imprécis.

#### 1.4.4 L'expression génique du facteur de transcription PPAR $\delta$ est augmentée chez les rats stressés

Nos résultats montrent une augmentation de 58% de l'expression génique de PPAR $\delta$  chez les rats stressés au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, sans modification de l'expression génique des autres PPAR. Les PPAR sont des récepteurs nucléaires ayant un rôle de facteurs de transcription et qui participent notamment à la régulation du métabolisme lipidique. Les PPAR $\delta$  sont, comme nous avons pu le vérifier, les plus représentés au niveau cérébral (Braissant *et al*, 1996 ; Gofflot *et al*, 2007 ; Hall *et al*, 2008) et leur délétion

spécifique induit des perturbations dans le développement cérébral murin (Peters *et al*, 2000). Ils participent notamment à la différenciation neuronale (Hall *et al*, 2008) et astrocytaire (Cimini *et al*, 2007).

Le rôle le plus connu des PPAR $\delta$  est la modulation du métabolisme lipidique. Une augmentation de son expression favorise les processus de  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Grimaldi, 2007 ; Dreyer *et al*, 1993 ; Hall *et al*, 2008), qui participe à la dégradation des acides gras, mais également à la synthèse de DHA. Ainsi, l'augmentation de l'expression génique de PPAR $\delta$  pourrait soit favoriser le catabolisme des AGPI et ainsi contribuer à la diminution du contenu cérébral en AGPI n-3, soit promouvoir la synthèse de DHA et ainsi refléter la mise en place d'un mécanisme compensatoire face à la réduction des AGPI n-3 membranaire.

L'activité de PPAR nécessite une dimérisation avec RXR avant de se fixer à une séquence d'ADN spécifique appelée PPAR Response Element (PPRE) (Devergnès et Wahli, 1999). Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant d'étudier d'une part l'expression de RXR et d'autre part la fixation du facteur de transcription à l'ADN, afin de déterminer si cette augmentation de l'expression de PPAR $\delta$  peut être associée à des modulations fonctionnelles.

#### 1.4.5 L'expression génique de la vimentine, marqueur du cytosquelette des astrocytes, est augmentée chez les rats stressés

Nos résultats montrent, suite au protocole de stress, une augmentation de 84% de l'expression génique de la vimentine au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe des rats stressés, sans modification de l'expression génique de l'autre marqueur du cytosquelette astrocytaire, la GFAP.

La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires. Son expression varie au cours du développement. Initialement exprimée dans les précurseurs cellulaires tels que les cellules gliales radiaires (Götz *et al*, 2002), elle est progressivement remplacée par les neurofilaments au niveau neuronal et par la GFAP au niveau astrocytaires. Dans le cerveau adulte, elle est principalement exprimée par les cellules gliales radiaires, les astrocytes immatures ou activés, ainsi que par les cellules épendymaires (Schnitzer *et al*, 1981 ; Seri *et al*, 2004 ; von Bohlen und Halbach, 2011). Afin de mieux caractériser l'impact de

l'augmentation de son expression, il faudrait caractériser le type de cellules concernées par co-marquage en immunohistochimie entre la vimentine et des protéines spécifiques des types cellulaires telles que la GFAP pour les astrocytes.

Au niveau astrocytaire, la vimentine est exprimée de manière détectable dans les situations d'astrogliose. En effet, la surexpression de la vimentine et de la GFAP constituent des marqueurs de la réaction astrocytaire (Pekny et Pekna, 2004 ; Bramanti *et al*, 2010). Ainsi, des études sur souris KO en Vim et GFAP (Wilhelmsson *et al*, 2004) ou suite à une transfection par rétrovirus (Lin et Cai, 2004) ont pu mettre en évidence le rôle joué par la vimentine sur l'hypertrophie astrocytaire caractéristique de l'astrogliose, ainsi que sur la formation de la cicatrice gliale. Ainsi, une augmentation de l'expression de la vimentine peut traduire une stimulation de l'activation astrocytaire. Cependant, dans notre étude, l'augmentation de l'expression génique de vimentine n'est pas associée à une augmentation de la GFAP. Ce type de résultats a déjà été observé chez le rongeur, suggérant une réponse plus rapide et plus sensible de la vimentine comparée à celle de la GFAP après un trauma (Ekmark-Lewen *et al*, 2010 ; Pasinetti *et al*, 1993).

La vimentine est également exprimée au niveau des cellules souches cérébrales (Sillaber *et al*, 2008) et l'augmentation de son expression, en parallèle de celle du BDNF, pourrait refléter une augmentation de la neurogenèse. Cependant, le stress a plutôt un effet inhibiteur sur la neurogenèse hippocampique (Malberg et Duman, 2003), cette hypothèse semble donc peu probable.

#### 1.4.6 L'expression génique des autres marqueurs étudiés de la synapse tripartite glutamatergique n'est pas modulée par le stress chronique de contention

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'expression génique des récepteurs du glutamate AMPA et NMDA, ainsi que des transporteurs vésiculaires V-Glut 1 et 2 n'est pas modulée par le stress chronique de contention. Nous nous sommes également intéressés à d'autres marqueurs, tels que des marqueurs du métabolisme lipidique, du fonctionnement astrocytaire ou bien des neurones.

Tout d'abord, nous n'avons pas observé de modification, sous l'effet du stress, de l'expression génique de marqueurs du métabolisme lipidique telle que les phospholipases A2, la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et les lipoxygénases 5, 12 et 15 (Alox 5, 12 et 15). Les

phospholipases A2 sont impliquées dans la libération des AGPI des phospholipides membranaires (Farooqui et Horrocks, 2006), tandis que la COX2 et les Alox participent à la synthèse, à partir des AGPI, de dérivés oxygénés tels que les prostaglandines, les thromboxanes, les neuroprotectines (Farroqui *et al*, 2007 ; Orr et Bazinet, 2008). Des études ont montré qu'une augmentation de l'activité de la iPLA2, impliquée dans le métabolisme du DHA (Green *et al*, 2008) intervient suite à un trauma aigu tel que l'ischémie (Strokin *et al*, 2006). En permettant la libération de DHA des phospholipides membranaires et la synthèse subséquente de dérivés tels que la neuroprotectine D1 (NPD1), la iPLA2 pourrait participer à des processus neuroprotecteurs au cours de pathologies telles que l'ischémie ou la dépression (Strokin *et al*, 2006 ; Lee *et al*, 2011). De plus, au niveau du cortex, il a été montré qu'un stress de contention stimulait l'activité de la COX-2 et ainsi la synthèse de PGE2 (Madrigal *et al*, 2003). Afin de compléter nos résultats et pouvoir faire un lien avec la composition lipidique membranaire, il serait nécessaire d'une part d'étudier l'expression génique de ces marqueurs au niveau du cortex et d'autre part d'étudier la composition lipidique de l'hippocampe. De plus, il est important de compléter ces données par l'analyse protéique de ces marqueurs et par l'étude de leur activité, par exemple celle des phospholipases A2 impliquées dans la libération des AGPI.

Nous avons également étudié des marqueurs de la régulation astrocytaire de la synapse glutamatergique, telle que la sérine racémase (enzyme catalysant la synthèse de D-sérine à partir de la L-sérine) et la glutamine synthétase (qui participe au cycle du glutamate dans l'astrocyte). Des études ont montré un rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de l'expression génique et protéique de la glutamine synthétase (Vardimon *et al*, 1999 ; Vardimon, 2000), suggérant un rôle de ces hormones dans la régulation astrocytaire du cycle du glutamate. Cependant, aucune étude, jusqu'à présent, ne s'est intéressée à la régulation de ces enzymes dans des conditions de stress chronique. Nos résultats ne montrent, au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, aucune modification de l'expression génique de ces enzymes après un stress chronique.

Enfin, nous avons évalué l'expression génique d'un marqueur du cytosquelette neuronal, MAP2. Le stress étant connu pour induire une rétraction des dendrites dans certaines régions cérébrales, l'hippocampe en particulier (McLaughlin *et al*, 2007 ; Orłowski *et al*, 2011 ; Ramkumar *et al*, 2008), l'étude de ce marqueur, particulièrement concentré

dans les dendrites, semblait appropriée. Cependant, nos résultats n'ont pas mis en évidence de variation de l'expression génique de MAP2 par le stress chronique de contention. Les données de la littérature sur ce paramètre sont assez disparates. Ainsi, si certains ne montrent aucune modification de l'expression génique de MAP2 au niveau des différentes régions de l'hippocampe par un stress chronique de contention (Kuroda et McEwen, 1998), d'autres études mettent en évidence une réduction de l'expression protéique de MAP2 dans le cortex, ainsi que dans différentes zones de l'hippocampe (Yan *et al*, 2010). Ainsi, il semblerait que le stress chronique affecte l'expression protéique et non génique de la protéine MAP2, suggérant davantage une régulation post-transcriptionnelle. De plus, l'équipe de Yan *et al* (2010) montre par immunohistochimie une modification de la répartition de la protéine MAP2. Après un stress chronique, sa concentration est réduite au niveau des dendrites et augmentée au niveau du soma de certains neurones. Nos résultats sur l'expression génique nécessitent donc d'être complétés par une étude protéique de ce marqueur, ou d'autres marqueurs neuronaux.

**En résumé,** les effets du stress chronique de contention chez les rats recevant un régime équilibré en AGPI n-3 et AGPI n-6 se caractérisent par une réduction de la croissance pondérale des rats et un pic de la concentration plasmatique de corticostérone. Les rats stressés présentent une sensibilité accrue aux environnements anxiogènes et une réduction de l'activité locomotrice associée à une augmentation de la réponse émotionnelle. D'un point de vue électrophysiologique, la réponse au stress chronique de contention se caractérise par une réduction de la libération pré-synaptique de glutamate et des phénomènes de LTP. Ces modifications des paramètres comportementaux et électrophysiologiques pourraient en partie être expliquées par l'augmentation de l'expression génique de certains marqueurs étudiés au niveau de la synapse tripartite glutamatergique, tels que mGluR7, la syntaxine 1a ou encore la vimentine. Cependant, les réactions liées au stress restent relativement réduites, suggérant une habituation, une adaptation des rats au protocole de stress auquel ils ont été soumis. Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation de l'expression génique du BDNF, connu pour participer aux phénomènes de résilience suite à un stress chronique.

De nombreuses études ayant suggéré un effet anti-stress du DHA (Takeuchi *et al*, 2003 ; Vinot *et al*, 2011), nous avons émis l'hypothèse que, les effets du stress chronique de contention pouvaient être modulés par les apports alimentaires en AGPI n-3. Dans la suite de l'exposé, nous discuterons donc de l'impact des AGPI n-3 (déficience ou enrichissement) sur la réponse au stress des rats.

## **II. Modulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI**

### ***II.1 Perte de poids corporel et pic de concentration plasmatique de corticostérone induites par le stress chronique de contention***

#### **II.1.1 La perte de poids liée au stress chronique est réduite chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3**

Nos résultats ont montré une perte de poids significative des animaux équilibrés soumis à un stress chronique de contention. Si une réduction comparable est observée chez les animaux déficients en AGPI n-3, les rats enrichis en AGPI-LC n-3 perdent significativement moins de poids au cours des 21 jours de contention, malgré une prise alimentaire équivalente.

L'étude de la croissance pondérale réalisée de la naissance au début de la procédure de stress a mis en évidence qu'en dépit d'une prise alimentaire équivalente, les rats enrichis en AGPI-LC n-3 présentaient un poids significativement supérieur à celui des autres lots alimentaires, avant la mise en contention. Ces résultats vont à l'encontre des données de la littérature qui suggèrent un effet anti-obésité des AGPI-LC n-3 (Buckley et Howe, 2009 ; Tai et Ding, 2010). Ainsi, il a été montré que l'incorporation d'AGPI-LC n-3 dans le régime alimentaire réduit l'accumulation de masse grasseuse et la prise de poids. Cependant, cet effet n'a été testé que dans des conditions alimentaires faisant appel à des régimes hyperlipidiques induisant l'obésité (Ruzickova *et al*, 2004 ; Hainault *et al*, 1993) et aucune étude n'a été menée sur l'impact des AGPI-LC n-3 sur la croissance pondérale dans le cadre d'une alimentaire normale équilibrée. De plus, des études cliniques suggèrent que les AGPI n-3 ont un effet anti-cachexie, prévenant l'affaiblissement de l'organisme et en particulier la perte de poids liée à un stress physique intense, notamment en limitant la lipolyse et la dépense

énergétique (Sauer *et al*, 2000). Cet effet anti-cachexie des AGPI n-3 pourrait en partie expliquer la perte de poids limitée des rats stressés enrichis en AGPI-LC n-3.

II.1.2 Le pic de corticostérone plasmatique induit par le stress de contention est réduit chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, sans modification de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR)

Nos résultats ont montré, chez les rats équilibrés, un pic de la concentration plasmatique en corticostérone dès 30 minutes après la mise en contention. Si un pic d'amplitude comparable est observé chez les rats déficients en AGPI n-3 au cours des 21 jours de contention, les rats enrichis en AGPI-LC n-3 présentent un pic de corticostérone significativement réduit dès le 7<sup>e</sup> jour de mise en contention. Une telle réduction de la concentration plasmatique de corticostérone chez des rats stressés recevant une supplémentation en huile de poisson a déjà été observée (Ferraz *et al*, 2011). Les données de la littérature suggèrent d'ailleurs que les AGPI n-3 ont un rôle bénéfique sur la réponse au stress, notamment en limitant l'activation de l'axe corticotrope. Ainsi, chez le rongeur, une supplémentation en AGPI n-3 prévient l'augmentation de la corticostérone plasmatique et du taux de noradrénaline en réponse à un stress aigu, tel qu'un test de nage forcée ou une injection d'IL-1 (Borsonelo *et al*, 2011 ; Song *et al*, 2003 ; Song *et al*, 2008). Un tel effet bénéfique des apports alimentaires en AGPI n-3 sur l'activation de l'axe corticotrope a également été retrouvé chez l'Homme, en situation de stress mental (Hamazaki *et al*, 2000 ; Delarue *et al*, 2003). Ces résultats, associés à la réduction de la perte de poids observée chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, suggèrent que les apports alimentaires en AGPI n-3 favorisent l'adaptation des animaux au stress chronique.

La réduction du pic de corticostérone chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 n'est pas accompagnée d'une modulation de l'expression génique ou protéique des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et MR au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Peu d'études se sont intéressées à la régulation des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et MR par les apports alimentaires en AGPI n-3. L'équipe de Gomez-Pinilla et Ying (2010) a récemment montré une légère augmentation de l'expression de GR chez des rats recevant un régime enrichi en DHA en condition non stressante, tandis que Bhatia *et al* (2011) relève une augmentation suite à une déficience en AGPI n-3. Cependant, les variations d'expression sont relativement restreintes et ont été mesurées sur l'hippocampe entier, sans distinction des différentes

zones. L'ensemble de ces données ne permet donc pas de mettre en évidence un effet clair des apports alimentaires en AGPI n-3 sur l'expression des récepteurs GR et MR au niveau de l'hippocampe, aussi bien en condition basale que stressante.

## ***II.2 Comportement émotionnel et capacités d'apprentissage spatial***

### ***II.2.1 Activité locomotrice et réponse émotionnelle***

Chez les rats équilibrés, la réponse au stress chronique de contention est caractérisée par une réduction de l'activité locomotrice, associée à une augmentation de la réponse émotionnelle mesurée dans l'openfield et le labyrinthe en croix surélevée.

#### **- Effets propres de la déficience en AGPI n-3 :**

Chez les rats non stressés, nos résultats ont montré un effet propre de la déficience en AGPI n-3, réduisant l'activité motrice dans le labyrinthe en croix surélevée. Les données de la littérature suggèrent un effet complexe de la déficience en AGPI n-3 sur l'activité motrice des rats, dépendant notamment de l'amplitude de réduction du taux de DHA dans les membranes cérébrales et de l'âge des sujets (Levant *et al*, 2010). Ainsi, si on considère l'ensemble de la période de développement (du jour post-natal P21 à P70), l'activité locomotrice n'est pas modifiée chez des sujets soumis à une déficience de 1<sup>e</sup> génération, induisant une chute du DHA cérébral de 50%, alors qu'elle est augmentée chez des animaux déficients de 2<sup>e</sup> génération chez qui le déficit en DHA peut atteindre 80% (Levant *et al*, 2010). Les individus les plus jeunes se montrent les plus sensibles à cette augmentation. En revanche, des études menées à un âge plus avancé ont montré une réduction de l'activité locomotrice chez les déficients, d'autant plus prononcée que la chute de DHA était importante (supérieure à 50%) (Levant *et al*, 2006 ; Enslin *et al*, 1991). Parallèlement, ces études n'ont montré aucune altération de l'activité locomotrice chez des rats ayant reçu un régime enrichi en AGPI n-3 (Levant *et al*, 2006). Ainsi, il semble que l'activité motrice soit spécifiquement affectée par la chute cérébrale en DHA (Levant *et al*, 2006).

La déficience en AGPI n-3 est également caractérisée par une modification de la réponse émotionnelle dans le test de réaction au sursaut. Ainsi, les rats déficients en AGPI n-3 présentent une accentuation du sursaut au son de 120 dB comparativement aux équilibrés

et aux enrichis en AGPI-LC n-3. L'équipe de Fedorova *et al* (2009) a montré que la déficience en AGPI n-3 altère le processus d'habituation dans ce test, avec un maintien de l'amplitude de sursaut tout au long des sessions. La réponse au sursaut représente une réponse réflexe à un stimulus intense et soudain et son amplitude peut être modulée par un grand nombre de paramètres physiologiques ou pathologiques (Koch, 1999). Chez l'Humain, l'augmentation de la réaction de sursaut est associée à des troubles anxieux et est notamment retrouvée chez des individus souffrant du syndrome de stress post-traumatique (Grillon *et al*, 1991 ; Orr *et al*, 1995 ; Asmundson et Carleton, 2010 ; Siegelaar *et al*, 2006). Ainsi, l'augmentation de la réaction de sursaut au son de 120 dB que nous observons chez les rats déficients en AGPI n-3 suggère une sensibilité accrue à l'anxiété ou un déficit dans les processus d'habituation. En revanche, aucun effet du régime déficient en AGPI n-3 n'est observé sur les différentes phases du conditionnement de peur. Il a été préalablement montré au laboratoire que des rats déficients en AGPI n-3 de 2<sup>e</sup> génération ne présentaient pas de modification significative de leur capacité d'extinction d'une peur conditionnée (Mathieu *et al*, 2011).

Chez les rats stressés, la déficience en AGPI n-3 exacerbe les modifications comportementales observées chez les rats équilibrés, avec une activité locomotrice d'autant plus réduite et un temps de toilettage et une consommation de sucrose augmentés, suggérant une sensibilité accrue au stress. Des données en ce sens ont également été obtenues précédemment au laboratoire dans le modèle de stress de séparation maternelle, montrant un phénotype plus anxieux, plus impulsif et une amplification des modifications de réponse à la récompense chez des rats déficients comparativement aux équilibrés (Mathieu *et al*, 2011 ; Mathieu *et al*, 2008). Une augmentation de l'anxiété chez la souris déficiente en AGPI n-3 a par ailleurs été rapportée en réponse à un stress chronique imprédictible (Harauma et Moriguchi, 2011). Ainsi, bien que les agents stressants soient différents, toutes ces études suggèrent une régulation complexe de la réponse au stress par le statut en AGPI n-3 et plus particulièrement, une vulnérabilité accrue des rats soumis à un régime déficient en AGPI n-3. En revanche, si un effet synergique d'une déficience en AGPI n-3 de 2<sup>e</sup> génération et d'un stress précoce de séparation maternelle a été mis en évidence préalablement au laboratoire (Mathieu *et al*, 2011), cet effet n'est pas retrouvé lors d'un

stress chronique de contention chez des rats adultes déficients de 1<sup>e</sup> génération, chez qui la chute du contenu cérébral en DHA est moins importante.

### **- Effets propres de l'enrichissement en AGPI-LC n-3 :**

Nos résultats ont également montré, chez les rats non stressés, un effet propre de la l'enrichissement en AGPI-LC n-3 dans le test de conditionnement de peur. Dans ce test, le rat apprend à associer un stimulus neutre (un son) à un stimulus aversif (un choc électrique) auquel ils ne peuvent échapper et développent alors un comportement typique de freezing, correspondant à une immobilité complète excepté les mouvements respiratoires et considéré comme une réponse de peur (Blanchard et Blanchard, 1969). Si l'acquisition de cette peur conditionnée est identique dans tous les lots expérimentaux, la phase d'extinction est spécifiquement modifiée chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 qui présentent une réduction significative du temps de freezing, notamment au cours de la 2<sup>e</sup> session. Il faut cependant noter que cette extinction est restreinte dans tous les groupes expérimentaux, leur temps de freezing restant globalement élevé à la fin des 2 sessions d'extinction. Néanmoins, ces résultats, en accord avec ceux de l'étude de Takeuchi *et al* (2003), suggérant que l'enrichissement alimentaire en AGPI-LC n-3 favorise les processus impliqués dans l'extinction d'une peur conditionnée.

Chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, la réponse comportementale au stress chronique de contention est atténuée. Ainsi, nous n'observons pas de modification d'activité locomotrice, l'augmentation du temps de toilettage est moindre et l'anxiété est moins marquée chez les rats stressés enrichis en AGPI n-3, comparativement aux rats stressés des 2 autres lots alimentaires. L'effet bénéfique des AGPI n-3 sur les manifestations de l'anxiété ont d'ailleurs déjà été montré chez des primates non humains (Vinot *et al*, 2011). De plus, nos résultats suggèrent que l'enrichissement en AGPI-LC n-3 favorise l'adaptation des rats chroniquement stressés à des situations de stress aigu. Ainsi, lors de la phase d'extinction de peur conditionnée, les rats stressés enrichis en AGPI-LC n-3 présentent un temps de freezing réduit comparé aux autres lots, reflétant une extinction plus rapide. Ainsi, on peut poser l'hypothèse que chez des rats chroniquement stressés, l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 permet de réduire les manifestations d'anxiété et les troubles locomoteurs et à l'inverse favorise l'apprentissage de comportements permettant une meilleure adaptation

au stress aigu. Cette hypothèse est confortée par des résultats récents montrant qu'une supplémentation en AGPI n-3 permet de réduire le comportement anxieux des rats dans un labyrinthe en croix surélevée et de diminuer leur résignation dans un test de nage forcée suite à un stress chronique de contention (Ferraz *et al*, 2011).

### II.2.2 Apprentissage spatial

Chez les rats équilibrés, nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du stress chronique de contention sur les capacités d'apprentissage spatial. Cette absence d'effet du stress est également observée chez les rats enrichis en AGPI n-3, les rats stressés et non stressés présentant les mêmes capacités d'apprentissage. Certaines données de la littérature suggèrent pourtant que la supplémentation en AGPI-LC n-3 stimule les capacités d'apprentissage dans des tests tels que la piscine de Morris (Chung *et al*, 2008) et le labyrinthe radiaire (Tanabe *et al*, 2004). L'équipe Trofimiuk et Braszko (2011) montre par ailleurs que la supplémentation en huile de poisson riche en AGPI n-3 est sans effet sur les performances des rats dans un labyrinthe de Barnes en condition non stressante, alors qu'elle s'avère bénéfique chez des rats soumis à un stress chronique de contention.

Concernant les effets de la déficience en AGPI n-3, nous avons observé un effet spécifique dans la phase du changement de consignes dans le test de Barnes, avec une augmentation du temps d'apprentissage et un plus grand nombre d'erreurs que dans les autres lots alimentaires. L'équipe de Fedorova *et al* (2009) a montré que les performances de rats déficients en AGPI n-3 sont peu altérées dans un apprentissage spatial classique, alors qu'ils présentent un important déficit lors d'un inversement de règles (Fedorova *et al*, 2009). Si l'apprentissage spatial est hippocampe-dépendant, la flexibilité comportementale permettant l'adaptation à un changement de consignes constitue une tâche corticale (Oualian et Gisquet-Verrier, 2010). Ces modifications des performances d'apprentissage chez les rats déficients en AGPI n-3 peuvent être sous-tendues par des perturbations de la neurotransmission dopaminergique, qui ont été décrites au niveau du cortex frontal. Il a ainsi été montré que la déficience en AGPI n-3 engendre une diminution du nombre de vésicules dopaminergiques et une augmentation de la concentration des dérivés de la dopamine, reflétant une augmentation du métabolisme dopaminergique dans cette région cérébrale (Zimmer *et al*, 2000 ; Zimmer *et al*, 2002). Ces modifications du métabolisme

dopaminergique sont associées à une réduction de l'expression des récepteurs dopaminergiques D2 (Delion *et al*, 1994 ; Delion *et al*, 1996 ; Chalon, 2006).

Chez les rats soumis au stress chronique de contention, nos résultats montrent que cet effet spécifique de la déficience en AGPI n-3 sur l'apprentissage cortex-dépendant est annulé. Ainsi, les rats stressés déficients présentent les mêmes performances d'apprentissage lors de l'inversion de consigne que les rats équilibrés et enrichis en AGPI n-3. Les données de la littérature suggèrent un effet du stress chronique sur le métabolisme dopaminergique au niveau cortical, en stimulant la formation de dérivés de la dopamine sans modification du contenu en dopamine (Torres *et al*, 2002 ; Gamaro *et al*, 2003). Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire d'étudier la neurotransmission dopaminergique cortico-frontale chez les rats des différents lots alimentaires et soumis au stress chronique de contention.

### ***II.3 Paramètres électrophysiologiques***

#### ***II.3.1 L'enrichissement en AGPI-LC n-3 module l'efficacité synaptique et la probabilité de libération pré-synaptique de glutamate et cet effet est inhibé par le protocole de stress***

Chez les rats équilibrés, les effets du stress chronique de contention sont caractérisés par une augmentation de la PPF reflétant une réduction de la libération stimulée pré-synaptique de glutamate, sans modification des paramètres de l'efficacité synaptique illustrée par la courbe intensité-réponse. Nos résultats montrent par ailleurs que ces effets du stress sont modulés par l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 mais non par la déficience en AGPI n-3.

Chez les rats non stressés, l'enrichissement du régime en AGPI-LC n-3 augmente l'efficacité synaptique. En effet, les résultats de la courbe d'intensité-réponse montrent pour un même nombre de fibres nerveuses stimulées, une intensité de réponse plus élevée (PPSEs/VA) chez les rats enrichis comparativement aux équilibrés et aux déficients. L'effet bénéfique du DHA sur l'activité synaptique au niveau de l'hippocampe a déjà été montré sur des modèles de cultures de neurones (Cao *et al*, 2009). Cet effet peut être lié à des modulations des paramètres pré-synaptiques comme nous le décrirons par la suite lors de l'analyse des résultats de la PPF, mais également des paramètres post-synaptiques, tels que la régulation des récepteurs post-synaptiques du glutamate, en particulier les récepteurs

AMPA. Des études ont en effet montré une stimulation de l'expression protéique des récepteurs AMPA en présence de DHA chez l'adulte (Cao *et al*, 2009), ainsi que chez des individus âgés (Dyall *et al*, 2007). Notre étude n'a montré aucune modification de l'expression génique des récepteurs AMPA par l'enrichissement en AGPI-LC n-3. Cependant, ces mesures devront être complétées par l'étude de l'expression protéique de ces récepteurs.

Malgré une meilleure efficacité synaptique, l'analyse de l'amplitude des PPSEs et de la VA montre chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 une réponse globalement moins forte (amplitude des PPSEs), liée notamment à un moindre nombre de fibres nerveuses recrutées (amplitude de la VA). Des études menées sur des tranches d'hippocampe de souris ont montré que les AGPI n-3 (EPA ou DHA) peuvent modifier les propriétés membranaires de repos et ainsi réduire le seuil d'excitabilité des neurones (Xiao et Li, 1999). Par ailleurs, les rats enrichis en AGPI-LC n-3 présentent une augmentation de la libération pré-synaptique de glutamate comme le montre la diminution de la PPF, sans modification de l'expression des transporteurs vésiculaires V-Glut 1 et 2, suggérant un processus indépendant du stockage présynaptique du neurotransmetteur. En tant que constituant important des membranes neuronales, le DHA régule un certain nombre d'activités enzymatiques, de récepteurs et de canaux ioniques, pouvant être impliqués dans la libération de neurotransmetteurs. La supplémentation en AGPI n-3 stimule par exemple l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/ATPase (Horrocks et Farooqui, 2004 ; Gerbi *et al*, 1994 ; Tsutsumi *et al*, 1995). De plus, une fois libéré des membranes sous l'action des phospholipases A2, le DHA peut réguler la transcription de gènes impliqués dans l'exocytose. Ainsi, comme nous le décrivons par la suite, l'enrichissement du régime en AGPI-LC stimule l'expression génique de protéines telles que la syntaxine 1a, la synaptophysine ou SNAP 25 qui entrent dans la formation du complexe SNARE et régulent l'exocytose.

En résumé, nos résultats suggèrent que l'enrichissement membranaire en DHA, en modifiant les propriétés des membranes neuronales, induit un moindre recrutement de fibres nerveuses lors de l'arrivée d'un stimulus mais une libération de glutamate plus importante et une réponse synaptique plus efficace.

Nos résultats montrent que ces effets sont totalement inhibés par le stress chronique de contention. Les rats stressés enrichis en AGPI-LC n-3 présentent ainsi une efficacité synaptique équivalente à celle des autres lots expérimentaux. Nous avons déjà vu, chez les rats équilibrés en AGPI n-3, que le stress a un effet inhibiteur sur la libération pré-synaptique de glutamate ; il contrecarre ainsi les effets de l'enrichissement membranaire en DHA.

### II.3.2 L'impact du stress sur la plasticité synaptique est indépendant des apports en AGPI n-3

Nos résultats ont montré que le stress chronique de contention diminue la LTP, de manière équivalente dans les 3 régimes alimentaires. Ainsi l'effet du stress sur la plasticité synaptique (LTP) n'est pas modulé par les apports en AGPI-LC n-3.

Des données de la littérature suggèrent un rôle bénéfique des AGPI n-3 sur l'induction et le maintien des processus de LTP (Cao *et al*, 2009 ; Kawashima *et al*, 2010 ; Su, 2010). A l'inverse, il a été montré que la déficience en AGPI n-3 chez de jeunes souris réduit la LTP, notamment en agissant sur l'expression des récepteurs du glutamate AMPA et NMDA (Cao *et al*, 2009). La LTP est un phénomène de la plasticité synaptique fortement impliqué dans la mémorisation et l'apprentissage spatial (Lynch, 2004). En accord avec l'absence de modification de la plasticité synaptique, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression génique des récepteurs AMPA et NMDA par le régime alimentaire, ni de modification des capacités d'apprentissage dans le labyrinthe de Barnes dans les différents lots alimentaires.

## **II.4 Modulation de l'expression génique des marqueurs étudiés**

### II.4.1 La déficience ou l'enrichissement du régime alimentaire en AGPI n-3 ont des effets similaires à ceux du stress chronique

#### **- Expression du BDNF :**

Nos résultats ont montré une augmentation de 65% de l'expression génique de BDNF avec le stress chez les rats équilibrés. Une telle augmentation de l'expression génique de BDNF est également observée chez les rats non stressés recevant le régime déficient en AGPI n-3 ou enrichi en AGPI-LC n-3, comparativement aux rats équilibrés, sans modification de

l'expression des autres facteurs de croissance. Ainsi, il semble que la déficience en AGPI n-3 et l'enrichissement en AGPI-LC n-3 ont des effets similaires à ceux du stress chronique de contention sur l'expression génique du BDNF. Dans ces 2 lots alimentaires, l'expression du BDNF est ainsi équivalente entre les rats stressés et non stressés.

Dans la littérature, il a été montré que l'expression génique et protéique du BDNF était augmentée dans l'hippocampe de sujets recevant une supplémentation chronique en AGPI n-3 (Wu *et al*, 2008 ; Venna *et al*, 2009), et diminuée chez des rats déficients (Rapoport *et al*, 2007 ; Levant *et al*, 2008 ; Bhatia *et al*, 2011 ; Rao *et al*, 2007). L'augmentation de BDNF observée à la fois chez les enrichis et chez les déficients est donc surprenante. Cependant, les variations d'expression du BDNF sont dépendantes de la souche de rats, de la région cérébrale et de la méthode de dosage utilisée (Bhatia *et al*, 2011). Comme nous l'avons décrit précédemment, le BDNF joue un rôle important dans le fonctionnement du SNC et notamment dans les phénomènes de plasticité cérébrale (Waterhouse et Xu, 2009 ; Lu *et al*, 2008 ; Gottmann *et al*, 2009). Il exerce son action biologique en se fixant à son récepteur TrkB (Klein *et al*, 1991). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de ce récepteur, ainsi que l'interaction entre les 2 partenaires, afin de rechercher des différences impliquant les voies de signalisation associées au BDNF et qui pourraient expliquer nos résultats.

#### **- Expression de PPAR $\delta$ :**

Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression génique de PPAR $\delta$  avec le stress chez les rats équilibrés. Une augmentation de 66% chez les rats déficients et de 77% chez les enrichis est également observée, sans effet du stress. Ainsi, les régimes déficient et enrichi en AGPI-LC n-3 ont des effets similaires à ceux du stress quant à l'expression génique des facteurs de transcriptions PPAR. PPAR $\delta$  est un récepteur nucléaire impliqué notamment dans la régulation du métabolisme lipidique dont son expression est modulée par les apports alimentaires en nutriments et plus particulièrement en lipides, comme le montre l'utilisation de régime hyper-lipidique (Buaud *et al*, 2010). Plus précisément, des études ont montré que PPAR $\delta$  pouvait être activé aussi bien par des AGPI de la famille des n-6, que par ceux de la famille des n-3 (Lim *et al*, 1999 ; Yu *et al*, 1995). Ainsi, sur un modèle de culture cellulaire, la réduction des apports en ALA, précurseur des AGPI n-3, stimule l'expression de PPAR $\delta$  afin, *via* l'activation de la transcription d'enzymes

spécifiques de la  $\beta$ -oxydation, de favoriser la synthèse de DHA et ainsi pallier à la déficience (Langelier *et al*, 2003). Il a également été montré que l'augmentation des apports en AGPI favorise aussi la synthèse et l'activation de PPAR $\delta$  au niveau de tissus, tels que le foie, le tissu adipeux ou le cœur (Kjaer *et al*, 2008 ; Yu *et al*, 2010 ; Di Nunzio *et al*, 2009). Ainsi, la modulation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3, quel qu'en soit le sens, induit l'augmentation de l'expression et de l'activation de PPAR $\delta$  dans les tissus, qui participe à la régulation de l'homéostasie énergétique et en particulier du métabolisme lipidique. Il semble donc logique que l'effet des régimes déficients ou enrichi en AGPI n-3 utilisés ici soit identique quant à la modification d'expression de PPAR $\delta$ . Les conséquences de cette augmentation d'expression, dans chaque situation, restent néanmoins à étudier.

#### **- Expression de la vimentine et de la GFAP :**

Nos résultats ont montré une augmentation de 84% de l'expression génique de la vimentine avec le stress chez les rats équilibrés. Une telle augmentation est également observée sous l'effet du régime déficient en AGPI n-3 et du régime enrichi en AGPI-LC n-3, comparativement au lot équilibré. Ainsi, le déficit d'apport ou la supplémentation en AGPI n-3 ont des effets comparables à ceux du stress sur l'expression génique de la vimentine. Comme nous l'avons décrit précédemment, la vimentine est exprimée essentiellement au cours du développement. A l'âge adulte, elle est retrouvée soit au niveau de cellules immatures, soit au niveau d'astrocytes réactionnels (Bramanti *et al*, 2010 ; Pekny et Pekna, 2004). Aucune étude jusqu'à présent ne s'est intéressée à la régulation de son expression en fonction du statut lipidique des membranes cellulaires. Nos résultats ne montrent aucune modulation de l'expression génique de GFAP, marqueur principal du cytosquelette astrocytaire. Il semble donc peu probable que l'augmentation de la vimentine soit liée à une stimulation de l'astrogliose. Par contre, associée à l'augmentation de marqueurs tels que le BDNF, nos résultats peuvent suggérer une augmentation de la prolifération des cellules souches neurales ou de leur différenciation en astrocytes immatures. Afin d'approfondir ces résultats, l'expression protéique de la vimentine doit être quantifiée, et une étude par co-marquage vimentine/GFAP pour les astrocytes ou vimentine/BrDU pour les cellules progénitrices pourrait être réalisée.

#### II.4.2 Effets propres du stress chronique de contention et des apports alimentaires en

##### AGPI n-3

##### **- Récepteurs métabotropiques du glutamate :**

Le stress chronique de contention induit une augmentation de l'expression génique de mGluR7 chez les rats équilibrés. Cette modulation de l'expression de mGluR7 par le stress n'est pas retrouvée chez les rats déficients en AGPI n-3 ou enrichis en AGPI-LC n-3.

L'absence de modification de l'expression de ces récepteurs chez les rats déficients stressés peut être associée à l'absence de modification de la PPF dans ce lot expérimental. En revanche, nous avons observé un effet propre du régime enrichi en AGPI n-3 qui est associé à une augmentation de l'expression génique des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 et mGluR8, sans modification de l'expression des autres récepteurs métabotropiques du glutamate. Les récepteurs mGluR2 (groupe II) et mGluR8 (groupe III) sont tous deux exprimés de manière extra-synaptique au niveau des neurones pré-synaptiques (Petralli *et al*, 1996 ; Shigemoto *et al*, 1997) et participent à l'inhibition de la libération de glutamate pré-synaptique (Cartmell et Schoepp, 2000 ; Capogna, 2004 ; Schoepp, 2001). Leur localisation extra-synaptique ne permet leur activation que dans des cas de forte libération de glutamate, afin de prévenir d'un effet potentiellement excitotoxique. Ainsi, on peut supposer que chez les rats non stressés, la hausse de libération pré-synaptique de glutamate chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3 favorise l'augmentation de l'expression de mGluR2 et mGluR8, sans pour autant permettre leur activation. Chez les rats stressés, l'activation de ces récepteurs participe à l'inhibition de la libération pré-synaptique de glutamate, expliquant ainsi en partie la hausse de la PPF.

En résumé, en situation de déficience en AGPI n-3 ou d'enrichissement en AGPI-LC n-3 le stress n'induit pas d'augmentation de l'expression génique du récepteur mGluR7. Dans le cas de la déficience en AGPI n-3, ceci peut expliquer l'absence de modification de la libération pré-synaptique de glutamate par le stress ; tandis que chez les rats enrichis en AGPI-LC n-3, la richesse naturelle de leur structure cérébrale en mGluR2 et mGluR8 permettrait de maintenir des mécanismes de régulation de la libération pré-synaptique de glutamate suite au stress.

### **- Gènes de l'exocytose :**

Nos résultats ont montré que le stress chronique de contention induit une augmentation de 42% de l'expression de la syntaxine 1a chez les rats équilibrés, sans modification des autres protéines de l'exocytose. Cet effet du stress chronique est retrouvé quel que soit le régime alimentaire. Ainsi, l'effet du stress sur l'expression de la syntaxine 1a est indépendant des apports alimentaires en AGPI n-3.

Cependant, chez les rats non stressés, nos résultats ont mis en évidence des effets spécifiques du régime alimentaire. Ainsi, la déficience en AGPI n-3 induit une augmentation de l'expression génique des protéines de l'exocytose, en particulier de SNAP25, de la syntaxine 1a et de la synaptophysine, tandis que l'enrichissement en AGPI-LC n-3 stimule essentiellement l'expression génique de la syntaxine 1a et n'augmente que légèrement l'expression de SNAP25 et de la synaptophysine. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées à l'impact des apports alimentaires en AGPI sur les phénomènes d'exocytose, en particulier sur la formation du complexe protéique SNARE. Des données récentes montrent néanmoins qu'une déficience en AGPI n-3, en induisant une augmentation des taux d'acide arachidonique membranaires, favorisait la formation du complexe SNARE sans modulation de l'expression des différentes protéines le composant (syntaxine, SNAP 25, complexine, synapophysine) (Pongrac *et al*, 2007 ; Calon *et al*, 2005). Ces données sont en accord avec le rôle donné à l'acide arachidonique au cours de l'exocytose, participant activement à la formation du complexe SNARE (Connell *et al*, 2007 ; Rickman et Davlevtov, 2005 ; Davlevtov *et al*, 2007 ; Latham *et al*, 2007). Concernant la supplémentation en DHA, il a été montré qu'elle ne module pas l'expression protéique de SNAP-25 ou de la synaptophysine (Calon *et al*, 2005). Cependant, des études ont montré un rôle stimulateur de l'apport alimentaire en ALA et en DHA sur les processus d'exocytose au cours de la croissance neuronale, en favorisant l'activation de la syntaxine 3 (Darios et Davlevtov, 2006) ; on peut supposer que ce mécanisme de régulation de la formation du complexe SNARE par les AGPI n-3 est retrouvé dans le cerveau mature. Ainsi, les données bibliographiques suggèrent un rôle des AGPI davantage dans la formation du complexe SNARE, plutôt que dans la régulation de l'expression des protéines constitutives. Il serait intéressant de compléter nos résultats par l'analyse de l'expression protéique et de la fonctionnalité de ces protéines, notamment par leur capacité à s'organiser en complexe. En effet, dans le cas de l'enrichissement du régime

en AGPI-LC n-3, l'augmentation de l'expression de protéines impliquées dans l'exocytose pourrait participer à la meilleure efficacité synaptique et surtout à l'augmentation de libération pré-synaptique de glutamate. Cependant, dans le cas d'une déficience en AGPI n-3, aucune modulation de l'efficacité synaptique et de la libération de glutamate n'est observée, suggérant que si on observe une augmentation de l'expression génique des protéines de l'exocytose, celles-ci ne semblent pas avoir de conséquences fonctionnelles.

#### II.4.3 Absence d'effet du stress chronique de contention et des apports alimentaires en AGPI n-3

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'expression génique des récepteurs du glutamate AMPA et NMDA, ainsi que des transporteurs vésiculaires V-Glut 1 et 2 n'est pas modulée ni par le stress chronique de contention, ni par les apports alimentaires en AGPI n-3.

C'est le cas également des marqueurs du métabolisme lipidique, PLA2, COX-2 et LOX. Il y a peu de données dans la littérature sur la régulation par le régime alimentaire de ces marqueurs du métabolisme lipidique au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. En revanche, il a été montré une régulation de l'expression et de l'activité des enzymes clés du métabolisme lipidique dans d'autres zones cérébrales. Ainsi, une déficience en AGPI n-3 engendre, au niveau du cortex, une réduction de l'expression et de l'activité de la iPLA2, impliquée dans le métabolisme du DHA et à l'inverse une augmentation de l'expression et de l'activité des cPLA2 et sPLA2, et de COX-2 (Rao *et al*, 2007 ; Rapoport, 2008). A l'inverse, une déficience en AGPI n-6 stimule les voies du métabolisme du DHA en augmentant l'expression et l'activité de la iPLA2 et de la Alox15, tandis que le métabolisme de l'AA est réduit avec une diminution de l'expression de la cPLA2 et de COX-2 (Kim *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent une régulation région-spécifique du métabolisme lipidique par les apports alimentaires en AGPI. Ainsi, comme nous l'avons précisé précédemment, une étude plus complète du métabolisme lipidique dans différentes zones cérébrales est nécessaire pour compléter nos données.

Nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'expression des marqueurs de la régulation astrocytaire de la synapse glutamatergique par le stress ou le régime alimentaire, à savoir la glutamine synthase et la sérine racémase. La glutamine synthase

participe au cycle du glutamate, en permettant la conversion de ce dernier en glutamine (Walton et Dodd, 2007), tandis que la sérine racémase permet la conversion de la L-sérine en D-sérine, principal agoniste des récepteurs NMDA (Wolosker *et al*, 1999). Si l'expression de ces marqueurs n'est pas modulée par les apports alimentaires en AGPI n-3 et le stress chronique de contention, il faudrait néanmoins évaluer leur impact sur l'activité de ces enzymes.

Enfin, aucune modification de l'expression génique du marqueur neuronal MAP2 n'a été observée en réponse au stress chronique ou aux variations d'apports en AGPI n-3. Une étude *in vitro* menée sur culture de cellules souches neurales montre que la supplémentation en DHA augmente l'expression génique et protéique de MAP2, suggérant ainsi un rôle du DHA dans la différenciation neuronale (Katakura *et al*, 2009). Cependant, les données bibliographiques sur la modulation de l'expression de MAP2 *in vivo* ou *in vitro* sur des neurones matures sont beaucoup plus restreintes. Ainsi, si les AGPI n-3 semblent avoir un rôle bénéfique sur le développement neuronal, aucun effet n'est retrouvé sur le cerveau mature. De plus, comme nous l'avons discuté précédemment, aucun effet du stress chronique sur l'expression de ce marqueur n'est retrouvé et ce, quel que soit le groupe alimentaire considéré.

Cette approche en TLDA de mesure d'expression d'ARNm a permis l'étude simultanée d'un grand nombre de gènes, ici 48, choisis en raison de leur implication dans la régulation des processus étudiés, à savoir le fonctionnement de la synapse glutamatergique, le métabolisme des AGPI, l'exocytose, ou encore des facteurs de croissance. Les résultats ont montré que les modifications observées étaient généralement de faible amplitude et que l'interprétation globale et intégrée était difficile. Ils devront être complétés par des mesures d'expression protéique ou d'activité. Ces résultats ouvrent néanmoins des perspectives d'étude de certains mécanismes qui semblent particulièrement mis en jeu dans les effets du stress et des variations d'apports en AGPI, en particulier au niveau de la régulation de la libération pré-synaptique du glutamate.

**En résumé,** l'ensemble de ces données montrent que la modulation des apports alimentaires en AGPI n-3 permet de modifier la réponse à un stress chronique de contention chez le rat. Ainsi, un régime enrichi en AGPI-LC n-3 semble favoriser l'adaptation au stress en limitant notamment la perte de poids, ainsi que le pic de corticostérone et en atténuant les effets comportementaux induits par le stress chronique de contention. A l'inverse, les rats déficients en AGPI n-3 y semblent plus sensibles et présentent notamment une réponse émotionnelle accrue. Par ailleurs, la déficience comme l'enrichissement en AGPI-LC n-3 ont des effets similaires au stress de contention sur certains paramètres très spécifiques, notamment l'expression génique de marqueurs tels que le BDNF, PPAR $\delta$  ou encore la vimentine, suggérant une association étroite entre l'expression de ces gènes et la modification de composition membranaire en AGPI, sans effet spécifique des n-3 ou des n-6.

### **Partie 3 : Impact des AGPI et du stress sur les partenaires de synapse tripartite : neurones et astrocytes (études *in vitro*)**

#### **I. Modulation des propriétés de la lignée cellulaire de neuroblastomes humains par les apports en AGPI et l'hydrocortisone**

Les données électrophysiologiques obtenues chez le rat révèlent une modulation de la libération pré-synaptique de glutamate par les apports alimentaires en AGPI n-3 et par le stress chronique de contention. Ces modifications pourraient notamment être liées à une altération du mécanisme d'exocytose, phénomène ubiquitaire de libération de neurotransmetteur.

La lignée de neuroblastomes SH\_SY5Y présentent des caractéristiques neuronales et peuvent libérer de la noradrénaline (NA), leur principal neurotransmetteur, constituant ainsi un bon modèle d'étude des phénomènes d'exocytose (Vaughan *et al*, 1995 ; Ou *et al*, 1998). Trois types de libération ont été étudiés: en condition basale, stimulée au KCl 105mM ou stimulée au Carbachol 1mM. La libération de NA en condition basale (KCl 5mM) mime la libération spontanée de neurotransmetteur, tandis qu'une stimulation au KCl 105mM ou au Carbachol 1mM induit une libération de NA accrue. Le KCl 105mM va engendrer une forte dépolarisation des membranes cellulaires, permettant l'activation des canaux voltage-

dépendent (Lambert *et al*, 1990), et le Carbachol permet l'activation des récepteurs muscariniques qui sont couplés aux protéines G (Larsson *et al*, 1998).

Dans un premier temps, nous discuterons de l'effet dose-dépendant des AGPI (DHA, AA et EPA) sur la libération de NA, en considérant les effets associés à une supplémentation longue permettant l'incorporation des AGPI dans les membranes cellulaires. Dans un deuxième temps, nous discuterons de la modulation de ces effets en fonction de l'état de « stress » des cellules, mimé par le traitement à l'hydrocortisone.

### ***1.1 La libération de noradrénaline par les cellules SH\_SY5Y est modulée de manière dose-dépendante par les AGPI***

Afin de caractériser les effets de la composition membranaire en AGPI sur la libération de NA, les cellules ont été cultivées en présence d'AGPI pendant 72h, permettant ainsi l'incorporation des AGPI dans les membranes, comme le montre les résultats obtenus sur la composition lipidique. Nos résultats montrent que l'augmentation de la teneur en DHA des phospholipides membranaires augmente d'environ 15 % la libération basale de NA, dès que la concentration en DHA du milieu dépasse 50µM, sans modifier l'amplitude des libérations induites par le KCl 105mM ou le Carbachol 1mM. A l'inverse, l'enrichissement en AA ne modifie pas la libération basale de NA, mais augmente, dès la dose de 30µM, les 2 types de libérations stimulées. En revanche, l'incorporation d'EPA dans les membranes cellulaires ne modifie pas la libération de NA. Toutes ces modifications sont indépendantes des capacités de capture de NA par les cellules dont les valeurs sont équivalentes quelle que soit la supplémentation en AGPI.

Une étude précédemment menée au laboratoire a montré un effet similaire de l'incorporation de DHA dans les membranes des cellules SH\_SY5Y sur la libération spontanée de NA, sans montrer de modulation de la libération stimulée au KCl 105mM par l'enrichissement en AA (Mathieu *et al*, 2010). Cette différence est due essentiellement aux modifications du protocole d'incubation des cellules avec la NA tritiée qui conduisait à une incorporation beaucoup plus faible (3% contre 9% pour l'étude actuelle) et par voie de conséquence à une amplitude de libération stimulée moindre.

Nos résultats suggèrent que le DHA et l'AA modulent les paramètres de la libération de neurotransmetteurs par des mécanismes différents, agissant respectivement sur la

libération basale d'une part et sur la stimulation de la libération d'autre part. La libération basale correspond à la fusion spontanée des vésicules à la membrane, permettant ainsi le relargage de neurotransmetteur en l'absence de stimulus apparent. Elle met en jeu des mécanismes de régulation différents de la libération stimulée, notamment concernant la mobilisation calcique et la machinerie d'exocytose (Glitsch, 2008 ; Ramirez et Kavalali, 2011 ; Wasser et Kavalali, 2009). Cependant, les données de la littérature à ce sujet sont toujours assez controverses. Ainsi, si certains ont suggéré que les libérations basale et stimulée faisaient appel à 2 pools de vésicules de stockage de neurotransmetteur distincts (Fredj et Burrone, 2009 ; Kavalali *et al*, 2011 ; Sara *et al*, 2005), d'autres supportent l'idée d'une origine commune aux vésicules synaptiques impliquées dans les 2 types de libération (Hua *et al*, 2010). Un premier mécanisme décrit une machinerie d'exocytose unique qui conduit à la libération de neurotransmetteur en réponse à une forte augmentation de calcium intracellulaire après l'arrivée d'un potentiel d'action (libération stimulée), ou en réponse à de petites variations de concentration de calcium intracellulaire (libération basale) (Glitsch, 2008). Un second mécanisme de régulation est basé sur l'existence de plusieurs machineries d'exocytose indépendantes présentant une dépendance plus ou moins forte aux flux calciques. Cependant, il est fort probable que les 2 mécanismes coopèrent afin d'assurer une régulation fine et complexe de la neurotransmission.

Ainsi, les modifications des libérations basale et stimulée par les AGPI pourraient mettre en jeu des modifications de la signalisation cellulaire calcique. Une étude préliminaire réalisée au laboratoire a permis par marquage fluorescent de caractériser le flux calcique intracellulaire des cellules SH\_SY5Y en présence de DHA ou d'AA. Les premiers résultats ont montré que l'ajout de DHA augmente progressivement la concentration intracellulaire de calcium jusqu'à atteindre un plateau dès 4 minutes d'incubation, tandis que l'AA ne modifie pas ce flux calcique intracellulaire. Ceci suggère que le DHA peut moduler la libération de NA en régulant la signalisation calcique par les AGPI. Ainsi, en favorisant l'entrée de calcium dans la cellule, le DHA stimulerait la libération basale de NA par les cellules SH\_SY5Y. Ces résultats restent préliminaires et des études complémentaires de mesure de flux calcique sur des cellules enrichies en DHA ou en AA sont nécessaires.

Par ailleurs, la régulation des paramètres de libération de NA par les AGPI pourrait être liée à une modulation des protéines impliquées dans l'exocytose. En effet, malgré une

machinerie d'exocytose commune, il semble que les libérations basale et stimulée impliquent des interactions protéiques spécifiques, notamment dans la formation du complexe SNARE (Glitsch, 2008 ; Ramirez et Kavalali, 2011 ; Wasser et Kavalali, 2009). Ainsi, l'isoforme synaptotagmine-12 indépendante du calcium et l'isoforme VAMP-1 seraient préférentiellement impliquées dans la libération basale du neurotransmetteur tandis que VAMP-2 serait associée à la libération stimulée (Maximov *et al*, 2007 ; Humeau *et al*, 2000). Enfin, des altérations de la fonction du complexe SNARE ne semblent pas ou peu perturber la libération basale, contrairement à la libération stimulée. Par exemple, si la perte des protéines SNAP-25 ou VAMP-2 inhibe totalement la libération stimulée de neurotransmetteur, elle semble peu affecter la libération basale, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs (Washbourne *et al*, 2002 ; Bronk *et al*, 2007 ; Schoch *et al*, 2001). La régulation des protéines impliquées dans la machinerie d'exocytose par les AGPI apparaît donc complexe. En effet, si nos résultats *in vivo* suggèrent que les AGPI n-6 et les AGPI n-3 stimulent l'expression génique de certaines protéines au niveau de l'hippocampe, telles que la syntaxine 1a, SNAP 25 ou la synaptotagmine 1, une étude précédente menée au laboratoire sur le modèle de lignée de neuroblastomes humains SH\_SY5Y ne montre aucune modification de l'expression génique et protéique des protéines VAMP-1, Syntaxine 1a et synaptotagmine 1 (Mathieu *et al*, 2010). Il serait intéressant d'effectuer une étude plus complète de l'expression génique et protéique des marqueurs de l'exocytose dans les cellules SH\_SY5Y dans les différentes conditions de supplémentation en AGPI et en réponse aux différents types de stimulation afin de rechercher leur implication éventuelle dans les modifications de libération de NA observées.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'enrichissement membranaire en DHA favorisent les mécanismes impliqués dans de la libération basale, et au contraire inhibe ceux impliqués dans la régulation de la libération stimulée au KCl 105mM, suggérant une action du DHA sur l'activation des canaux voltage-dépendants. A l'inverse, l'AA semble spécifiquement réguler les paramètres de la libération stimulée. Cet effet observé sur la libération induite par le KCl 105mM et également sur celle induite par le Carbachol 1mM suggère l'implication de mécanismes communs aux 2 types de stimulations. Les études sur cellules chromaffines de Latham *et al* (2007) suggèrent notamment un rôle de l'AA au niveau de l'arrimage et de l'activation des vésicules à la membrane.

Ces données montrent que la teneur en AGPI n-3 et n-6 des phospholipides membranaires module les processus de libération basale et stimulée de neurotransmetteur et apportent des éléments de compréhension concernant les observations obtenues chez les rats. Cependant, les liens entre les données *in vitro* et *in vivo* sont complexes et doivent être faits avec prudence.

Dans le cerveau, les neurones interagissent avec d'autres partenaires cellulaires, tels que les astrocytes, qui participent largement à la régulation de l'activité synaptique (De Pitta *et al*, 2011 ; Di Castro *et al*, 2011). Les résultats obtenus sur les cultures primaires d'astrocytes seront donc utiles pour tenter de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les phénomènes observés. Les perspectives de mesure de libération de neurotransmetteur dans des systèmes de co-cultures astrocytes-neurones s'avèrent par ailleurs particulièrement intéressantes.

## ***1.2 La libération de noradrénaline par les cellules SH\_SY5Y est modulée par l'hydrocortisone et les apports en AGPI***

### ***1.2.1 L'hydrocortisone réduit la capture de noradrénaline par les cellules SH SY5Y, indépendamment de leur statut en AGPI***

Nos résultats montrent une diminution de la capture de NA par les cellules SH\_SY5Y5 après incubation avec l'OH-C. Cet effet est retrouvé après une incubation d'1h ou de 24h avec l'hormone du stress, dans toutes les conditions de supplémentation en AGPI, suggérant un effet indépendant du statut membranaire en AGPI des cellules.

Des études sur la lignée de neuroblastomes humains SK-N-BE(2)C ont montré un effet stimulant des hormones du stress sur l'expression et la fonction du transporteur à la noradrénaline (NET), responsable de la capture de NA par les cellules (Sun *et al*, 2010 ; Zha *et al*, 2011). Des effets rapides de la dexaméthasone, hormone de synthèse du stress, et à très faible dose ont été décrits sur la lignée de neuroblastomes SK-N-BE(2)M17 (Zha *et al*, 2011), alors que l'utilisation de la corticostérone, hormone naturelle, présente des effets beaucoup plus modérés, qui ne sont observés que pour des incubations d'une durée supérieure à 7 jours (Sun *et al*, 2010). Les données de la littérature suggèrent donc une régulation de l'expression et de l'activité du transporteur NET par les hormones du stress sur des modèles de lignées cellulaires de neuroblastomes. Cet effet serait modulé en fonction

du type d'hormone et du temps d'incubation avec les cellules utilisés. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de ce transporteur dans nos conditions de culture afin de rechercher son implication dans la régulation de la capture de NA par l'OH-C.

Le système de transport moins spécifique de la NA faisant intervenir les transporteurs organiques aux cations (OCT 1, 2 et 2) et le transporteur membranaire des monoamines (PMAT) (Engel *et al*, 2004) a également été décrit comme étant sensible au stress. Ainsi, une étude récente montre une inhibition de ce transport par les glucocorticoïdes naturels ou de synthèse dès 5 minutes d'exposition (Hill *et al*, 2011). On peut supposer que la réduction de capture de NA que nous observons soit liée à un effet de l'OH-C sur ce transport.

#### 1.2.2 L'hydrocortisone réduit la libération basale de noradrénaline par les cellules SH SY5Y

Nos résultats montrent que l'OH-C incubée pendant 1h réduit spécifiquement l'amplitude de libération de NA basale, alors qu'elle est sans effet après une incubation de 24h. Elle n'affecte pas par ailleurs la libération stimulée. Cet effet sur la libération basale de NA pourrait être lié à une action rapide des glucocorticoïdes sur les flux calciques conduisant à une réduction de libération basale. En effet, il a été montré sur des lignées de neuroblastomes de rats B103, que les glucocorticoïdes inhibent de façon rapide la mobilisation calcique (Han *et al*, 2002). Il serait maintenant intéressant d'étudier les modulations des flux calciques en réponse à l'incubation des cellules avec de l'OH-C, ainsi que les variations de l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Han *et al*, 2002 ; Qiu *et al*, 1998) et de la protéine kinase A (Han *et al*, 2005) qui sont impliquées dans ce type de régulation.

#### 1.2.3 Les effets de l'hydrocortisone sont dépendants du statut lipidique des membranes cellulaires

##### - Libération basale :

Nos résultats ont montré que l'effet inhibiteur de l'OH-C sur la libération basale de NA est inhibé sur des cellules supplémentées en AGPI 30 $\mu$ M et à l'inverse stimulé sur des cellules supplémentées en AGPI 70 $\mu$ M. Ceci suggère que les effets du stress sur la neurotransmission diffèrent en fonction du statut lipidique des phospholipides membranaires, avec une modulation possible par les apports alimentaires en AGPI.

Un mécanisme possible pourrait impliquer la signalisation des endocannabinoïdes. En effet, il a été montré que les cellules SH\_SY5Y possèdent un système endocannabinoïdes complet et fonctionnel (Pasquariello *et al*, 2009). Les endocannabinoïdes, *via* l'activation de leurs récepteurs CB1, peuvent à faible dose favoriser l'accumulation de calcium intracellulaire (Marini *et al*, 2009) mais exercent également un effet apoptotique dose-dépendant (Pasquariello *et al*, 2009). De plus, il a été montré chez le rongeur, qu'une déficience en AGPI n-3, favorisant l'accumulation des AGPI n-6, induit une réduction de la fonctionnalité des récepteurs CB1 (Lafourcade *et al*, 2011). Le contenu en endocannabinoïdes étant modulé par les apports en AGPI (Watanabe *et al*, 2003 ; Matias *et al*, 2008), on peut supposer que l'apport d'AA dans le milieu stimule en tant que substrat les voies de synthèse des endocannabinoïdes, ce qui, à faible dose, a un effet bénéfique permettant de contrecarrer les effets des glucocorticoïdes et, à forte dose, a un effet délétère accentuant l'impact du stress. Concernant le DHA, le lien avec le système endocannabinoïde est moins décrit. Cependant, une étude récente menée sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe suggère que les modifications des capacités cognitives par les apports en DHA observées chez le rongeur pourraient être en lien avec la régulation du système endocannabinoïde par cet AGPI n-3 (Pan *et al*, 2011).

#### **- Libération spontanée :**

Nos résultats ont montré que l'OH-C est sans effet sur les libérations stimulées de NA sur les cellules témoins (sans AGPI). En revanche, elle augmente la libération stimulée au KCl 105mM sur des cellules enrichies en AGPI 70µM, sans modifier la libération stimulée au Carbachol 1mM. Ces résultats suggèrent un effet combiné des glucocorticoïdes avec les AGPI sur les propriétés des canaux voltage-dépendants, notamment les canaux calciques de type-L ou -N comme nous l'avons décrits précédemment (Lambert *et al*, 1990). Des études précédentes ont d'ailleurs mis en évidence une régulation complexe de l'activité de ces canaux par les AGPI d'une part (Liu *et al*, 2001, Liu et Rittenhouse, 2000 ; Vreugdenhil *et al*, 1996) et par les glucocorticoïdes d'autre part (Chameau *et al*, 2007 ; Karst *et al*, 2002). Il semble donc exister des voies de régulation commune aux deux systèmes ; cependant, nos résultats ne permettent pas de déterminer la nature de ces interactions. Il est par ailleurs intéressant de noter qu'en condition « non stressante » (sans OH-C), nos résultats ont

souligné un effet propre inhibiteur du DHA 70 $\mu$ M et à l'inverse un effet propre stimulateur de l'AA 70 $\mu$ M sur la libération stimulée au KCl 105mM. Ainsi, en augmentant la libération stimulée, l'OH-C potentialise les effets de l'enrichissement membranaire en AA et contrecarre ceux du DHA.

**En résumé,** l'OH-C réduit de manière significative la capture de NA par les cellules quel que soit leur statut lipidique, soulignant une altération des systèmes de transport. Concernant les paramètres de libération, l'OH-C exerce peu d'effet sur des cellules non enrichies en AGPI. Cependant, on observe un effet inhibiteur de l'hormone du stress sur la libération spontanée de NA lors d'une incubation courte (1h), mimant un stress aigu. Cet effet de l'OH-C n'est pas retrouvé lors d'une incubation plus longue (24h), suggérant que l'hormone du stress exerce davantage un effet « signal » sur la libération de NA, qu'un effet chronique. Il serait donc intéressant de tester des temps d'incubation plus longs de l'OH-C, 24h n'étant peut être pas suffisantes pour mimer réellement un stress chronique.

L'enrichissement des membranes en AGPI modulent l'impact de l'OH-C sur les paramètres de libération, suggérant une interaction entre les AGPI membranaires et les systèmes de régulation par les glucocorticoïdes. Deux mécanismes pourraient notamment être impliqués : la signalisation calcique et la voie des endocannabinoïdes. Ces résultats ouvrent des perspectives d'études dans le domaine de la modulation des flux calciques par les AGPI et de l'implication des récepteurs aux endocannabinoïdes.

Les cellules SH\_SY5Y constituent un bon modèle d'étude des phénomènes d'exocytose et nous ont permis d'émettre quelques hypothèses sur les mécanismes de régulation de la libération de neurotransmetteurs par les glucocorticoïdes et par les AGPI. Afin de nous rapprocher du modèle d'étude *in vivo*, des mesures de libération de glutamate sur culture primaire de neurones hippocampiques et sur co-cultures neurones/astrocytes s'avèrent nécessaires pour pouvoir prendre en compte la régulation astrocytaire du fonctionnement synaptique et avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu.

## **II. Modulation des propriétés d'astrocytes en culture primaire par les apports en AGPI et le stress**

L'astrocyte constitue le 3<sup>e</sup> partenaire cellulaire des synapses tripartite glutamatergique (Halassa *et al*, 2007). Afin de mieux appréhender son fonctionnement en fonction des apports en AGPI n-3 et du stress, nous avons utilisé un modèle de culture primaire d'astrocytes corticaux issus de rats nouveaux-nés. Les différents AGPI (DHA ou AA) ont été apportés à la concentration de 30µM tout au long de la culture, tandis que les effets du stress ont été évalués à travers l'action de la corticostérone (en incubation de longue durée, soit 2 à 6 jours), principal glucocorticoïde chez les rongeurs.

Les astrocytes sont des cellules gliales arborisées, qui présentent la particularité d'être morphologiquement très plastiques, ce qui leur permet d'émettre et de rétracter rapidement de fins prolongements (filopodes) autour des synapses (Hirrlinger *et al*, 2004 ; Reichenbach *et al*, 2010). Ils participent à un grand nombre de régulations, dont notamment la capture du glutamate, *via* des transporteurs spécifiques GLT-1 et GLAST (Danbolt, 2001), qui permet d'éliminer rapidement le glutamate en excès dans la fente synaptique et ainsi limiter les processus d'excitotoxicité.

Au cours de notre étude, nous avons cherché à caractériser ces différentes propriétés astrocytaires. De plus, les glucocorticoïdes exerçant leur effet principalement via 2 types de récepteurs spécifiques, les GR et les MR, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de ces récepteurs, ainsi qu'à leur répartition nucléaire/cytoplasmique, ces récepteurs une fois activés migrant vers le noyau.

### ***II.1 La corticostérone modifie la morphologie des astrocytes en culture et cet effet est modulé par le statut lipidique des cellules***

#### **II.1.1 La corticostérone favorise une morphologie pavimenteuse des astrocytes**

Nos résultats montrent que la corticostérone favorise une morphologie pavimenteuse des astrocytes et inhibe l'émission des prolongements et des filopodes. En condition physiologique, les prolongements astrocytaires représentent près de 80% de la surface membranaire astrocytaire (Chao *et al*, 2002). *In vivo*, ces prolongements hautement dynamiques permettent aux astrocytes d'aller au contact des synapses et des vaisseaux sanguins (Hirrlinger *et al*, 2004 ; Reichenbach *et al*, 2010) et ainsi d'exercer leurs fonctions

régulatrices. Nos résultats suggèrent ainsi que la corticostérone, qui s'élève en situation de stress, pourrait avoir un effet inhibiteur sur la régulation astrocytaire de la neurotransmission en inhibant la formation des prolongements cellulaires, et en restreignant de ce fait les interactions entre astrocytes et neurones.

En tant que principale protéine des filaments intermédiaires astrocytaires, la GFAP a particulièrement été étudiée. Les données de la littérature suggèrent que la corticostérone et le stress ont un impact sur ce marqueur et sur les paramètres morphologiques astrocytaires qui en découlent. Ainsi, la corticostérone stimule l'expression génique et protéique de la GFAP, principale protéine des filaments intermédiaires astrocytaires, sur des modèles de culture primaire d'astrocytes (Rozovsky *et al*, 1995), tandis que cette expression est inhibée *in vivo* chez le rat (Tsuneishi *et al*, 1991 ; O'Callaghan *et al*, 1989 ; Musholt *et al*, 2009). Au niveau de l'hippocampe, un stress chronique psychosocial, par exemple, réduit le nombre et le volume des astrocytes d'environ 25% (Czeh *et al*, 2006). Les différences observées entre les modèles *in vitro* et *in vivo* pourraient être liées à la zone cérébrale étudiée, au type de traitement stressant utilisé et aux protocoles utilisés. En effet, l'effet du stress sur l'expression de la GFAP semble relativement progressif, de même que celui de la corticostérone et peut donc être différent en fonction du timing de l'analyse (Rozovsky *et al*, 1995). Nos résultats montrant un effet dé-différenciateur de la corticostérone sur la morphologie astrocytaire suggèrent une inhibition de l'expression de la GFAP, qui devra être confirmée par western blot, et se rapprochent de ceux observés lors des études *in vivo*.

Nos résultats montrent également la formation d'anneaux corticaux d'actine et une diminution des complexes d'adhérence focale chez les astrocytes ayant reçu un traitement à la corticostérone. Ces modifications morphologiques caractérisent une morphologie statique et peu contractile, confirmant un effet dé-différenciateur de la corticostérone sur les astrocytes, qui, lorsqu'ils sont différenciés et exercent leurs fonctions régulatrices, sont des cellules contractiles et motiles (déploiement de filopodes, formation de prolongements, migration). La formation d'un anneau d'actine peut être également préliminaire au processus d'apoptose (Rosenblatt *et al*, 2001). Les facteurs ayant des effets délétères sur les fonctions astrocytaires tels que l'éthanol sont également associés à des modifications morphologiques similaires (formation d'anneaux corticaux et diminution des complexes d'adhérence focale) (Guasch *et al*, 2003). La formation d'anneaux d'actine en présence de

glucocorticoïdes a été observée sur d'autres modèles cellulaires tels que les cellules tumorales mammaires Con8 (Rubenstein *et al*, 2003 ; Woo *et al*, 1999). Les processus de remodelage du cytosquelette (actine, GFAP, complexes d'adhérence focale) sont régulés par des GTPases (Rac, Cdc42, RhoA) (Small *et al*, 1999 ; Kalman *et al*, 1999 ; Rubenstein *et al*, 2003 ; Guasch *et al*, 2003). La morphologie induite par la corticostérone sur les astrocytes en culture suggère une inactivation de RhoA qu'il serait intéressant de vérifier.

Dans notre modèle d'incubation de longue durée, la corticostérone réprime donc la différenciation morphologique astrocytaire, en accord avec plusieurs études *in vivo*. Afin de mieux caractériser les mécanismes et les conséquences fonctionnelles de ces modifications morphologiques, il serait nécessaire d'analyser l'expression des différents marqueurs du cytosquelette et des fonctions régulatrices astrocytaires, ainsi que les modifications induites sur des modèles plus physiologiques de co-culture astrocytes/neurones.

### II.1.2 La morphologie astrocytaire est modifiée en fonction du statut lipidique des cellules

La modulation de la composition lipidique membranaire des astrocytes en culture par l'ajout dans le milieu d'AGPI modifie la morphologie des astrocytes.

L'enrichissement en DHA (30 $\mu$ M) induit une morphologie différenciée avec émission de longs prolongements riches en GFAP et émission de nombreux filopodes périphériques riches en ezrine. La particularité de cette morphologie, par rapport à la morphologie différenciée classique apparaissant progressivement dans les stades tardifs de la culture (en condition témoin), est l'orientation bipolaire des prolongements principaux (riches en GFAP) et la longueur plus importante des filopodes périphériques. Cet effet du DHA sur la morphologie astrocytaire déjà été bien caractérisé au laboratoire (résultats non publiés). En revanche, l'enrichissement en AA (30 $\mu$ M) n'affecte pas la morphologie des prolongements principaux des astrocytes qui présentent, comme les cellules témoins (sans AGPI, sans corticostérone) un phénotype différencié de forme stellaire. Cependant, l'émission des filopodes périphériques est très réduite par rapport aux cellules témoins. Les filopodes marqués à l'ezrine (Derouiche *et al*, 2002) constituent les compartiments astrocytaires qui, *in vivo*, viennent se placer et contact des synapses et jouent ainsi un rôle fonctionnel dans les interactions neurones-glie. Nos résultats suggèrent donc que le DHA induit une

morphologie plus fonctionnelle des astrocytes et favorise ainsi les interactions avec les partenaires cellulaires, tandis que l'AA semble limiter ce processus.

Par ailleurs, l'enrichissement du milieu en AGPI, DHA ou AA, favorise la formation de fibres de stress d'actine. Sur les cellules enrichies en AA, cet effet est plus marqué que sur les cellules enrichies en DHA et est accompagné d'une forte augmentation de l'activation des complexes d'adhérence focale (marquage P-Tyr). L'implication de l'AA dans les réorganisations du cytosquelette d'actine a été décrite précédemment sur d'autres modèles cellulaires (Glenn et Jacobson, 2002 ; 2003). L'activation des intégrines lors de l'adhésion des cellules au substrat entraîne une activation PLA2 libérant l'AA des phospholipides membranaires. L'AA libéré active différentes réorganisations de l'actine *via* la production de dérivés par la voie lipoxygénase ou cyclooxygénase, conduisant soit à la formation de fibres de stress, soit au contraire à la dépolymérisation de l'actine. Ces effets semblent varier en fonction des types cellulaires. Bien qu'aucune donnée sur une régulation du même type par le DHA ne soit disponible, on peut supposer un mécanisme d'action similaire pour le DHA qui, sous l'action de la iPLA2, peut être libéré des membranes cellulaires (Strokin *et al*, 2003) et participer à différentes voies de signalisation (Farooqui *et al*, 2007 ; Orr et Bazinet, 2008).

La formation de fibres de stress par le DHA comme par l'AA, alors que ces AGPI induisent des morphologies astrocytaires différentes, peut également être associée à un processus de peroxydation lié à la présence de ces molécules hautement oxydables dans le milieu de culture. Ceci ne peut être exclu malgré la présence de fortes concentrations de vitamine E dans le milieu. Il sera nécessaire de vérifier les effets du DHA et de l'AA sur la morphologie des cellules sur un modèle plus physiologique que nous développons actuellement au laboratoire et qui consiste à modifier la composition lipidique membranaire en apportant aux cellules du sérum de rats carencés, équilibrés ou supplémentés en AGPI n-3.

### II.1.3 L'impact de la corticostérone sur l'organisation morphologique des astrocytes est modulée par les apports en AGPI

Nos résultats indiquent que l'enrichissement en DHA s'oppose en partie aux effets de la corticostérone sur la morphologie astrocytaire, en particulier sur la réorganisation de la GFAP et de l'actine. Les astrocytes enrichis en DHA et soumis pendant 2 jours à l'action de la

corticostérone conservent leurs prolongements principaux et ne présentent pas d'anneau d'actine corticale. En revanche, comme les cellules témoins soumises à l'action de la corticostérone, ils perdent leurs filopodes périphériques. L'enrichissement en DHA ne permet pas aux cellules de résister à une action prolongée de la corticostérone, puisqu'après 6 jours d'incubation les astrocytes enrichis en DHA présentent une morphologie dé-différenciée. L'enrichissement en AA est, quant à lui, sans effet sur l'action de la corticostérone qui induit une dé-différenciation morphologique sur ces cellules comme sur les cellules témoins.

Bien que la modulation de l'impact du stress sur les astrocytes par les AGPI ait été peu abordé, les données de la littérature suggèrent, comme nous avons pu le décrire précédemment, un rôle bénéfique des AGPI n-3 sur la prévention des dommages cérébraux induits par un stress (Takeuchi *et al*, 2003 ; Vinot *et al*, 2011). La résistance aux effets de la corticostérone présentée par les astrocytes enrichis en DHA pourrait donc participer à cet effet favorable des AGPI n-3 sur la réponse au stress.

## ***II.2 Les apports en AGPI et la corticostérone modifient l'expression et la localisation des récepteurs aux glucocorticoïdes***

### **II.2.1 Le traitement à la corticostérone réduit l'expression de GR et favorise sa translocation vers le noyau**

Nos résultats montrent une réduction de 67% de l'expression de GR sur des astrocytes soumis à un traitement à la corticostérone pendant 6 jours. Cette réduction de l'expression semble associée à une translocation du récepteur aux glucocorticoïdes GR vers le noyau de cellules, tandis qu'aucune modification de la localisation de MR n'est observée. Cette régulation spécifique des récepteurs GR par l'hormone du stress est en accord avec les données de la littérature qui précisent que si les MR sont impliqués dans la régulation basale de l'axe corticotrope, ce sont les GR qui sont principalement activés en situation de stress (Lupien *et al*, 2007 ; Reul et de Kloet, 1985). De plus, il a été montré *in vivo*, une réduction de l'expression génique de GR suite à un stress chronique (Hageman *et al*, 2009 ; Kittraki *et al*, 2004 ; Chen *et al*, 2008). Ces résultats suggèrent la mise en place d'un rétrocontrôle négatif par la corticostérone sur l'expression du récepteur GR, afin de limiter dans le temps la réaction au stress.

### II.2.2 Les AGPI (DHA et AA), malgré une réduction de l'expression de GR, ne modifient pas la réponse à la corticostérone

Nos résultats montrent une réduction de l'expression de GR dans les astrocytes enrichis en AGPI, DHA et AA, sans modification apparente de l'organisation de la protéine au sein de la cellule. Des études menées chez le rongeur suggèrent qu'une déficience en AGPI n-3 stimule (Bhatia *et al*, 2011) et qu'à l'inverse des apports alimentaires en DHA réduisent l'expression de GR (Gomez-Pinilla et Ying, 2010) au niveau de différentes zones cérébrales telles que le cortex frontal, l'hippocampe ou l'hypothalamus. Cet effet inhibiteur des AGPI sur l'expression protéique de GR au niveau astrocytaire pourrait avoir un effet neuroprotecteur en limitant les effets du stress. Par ailleurs, le maintien de l'inhibition de l'expression de ces récepteurs par la corticostérone dans les cellules enrichies en AGPI garantit la persistance d'un rétro-contrôle.

Notre étude par immuno-marquage ne nous permet pas de voir de modification de la répartition nucléaire/cytoplasmique des récepteurs GR par les AGPI sur les astrocytes cultivés en présence ou non de corticostérone. Ces effets pourront être caractérisés en étudiant l'expression protéique du récepteur au sein des différentes fractions cellulaires. De plus, il serait intéressant de d'évaluer l'activation des récepteurs en mesurant leur degré de phosphorylation par Western Blot et leur liaison au GRE sur gels retard.

### **II.3 L'impact de la corticostérone sur les capacités de capture du glutamate des astrocytes est inhibé par les AGPI**

#### II.3.1 la corticostérone stimule la capture de glutamate par les astrocytes

Nos résultats ont montré un effet stimulant de la corticostérone sur les capacités de capture du glutamate par les astrocytes. Cet effet est relativement faible et augmente avec la durée d'incubation en présence de corticostérone. Une stimulation, augmentant avec le temps d'incubation en présence de corticostérone, de l'expression protéique du transporteur astrocytaire du glutamate GLT-1 sur des astrocytes en culture et donc de la capture du glutamate *via* ce transporteur a été mis en évidence précédemment (Zschocke *et al*, 2005). Cet effet des glucocorticoïdes sur l'expression de GLT-1 et sur la capture de glutamate est totalement inhibé en présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs GR,

ce qui montre que la stimulation de la capture du glutamate par la corticostérone est médiée par les récepteurs GR.

Nos résultats, montrant une régulation spécifique des récepteurs GR par la corticostérone, sans modification des récepteurs MR, vont également dans le sens d'une action de la corticostérone médiée par GR dans les astrocytes.

Les astrocytes, en participant à environ 90% de l'élimination du glutamate extracellulaire, jouent un rôle crucial pour le maintien de l'homéostasie cérébrale (Danbolt, 2001). En effet, le glutamate, lorsqu'il se trouve en excès dans la fente synaptique, est neurotoxique (Wang et Qin, 2010 ; Szydłowska et Tymianski, 2010). Cette augmentation des capacités de la capture astrocytaire du glutamate par la corticostérone pourrait refléter une adaptation des astrocytes à l'augmentation du glutamate extracellulaire potentiellement induite par le stress. Le stress est en effet un facteur pouvant contribuer à rompre l'homéostasie de la neurotransmission glutamatergique (Zarate *et al*, 2003). Lors d'un stress, l'augmentation de la capture du glutamate par les astrocytes activés par la corticostérone pourrait donc participer à la prévention d'évènements excitotoxiques. Nos résultats rejoignent ceux de Fontella *et al* (2004) montrant qu'un stress chronique de longue durée entraîne une augmentation de la capture et de la libération du glutamate dans l'hippocampe chez le rat.

### II.3.2 Les AGPI, DHA et AA, inhibent l'effet de la corticostérone

En l'absence de corticostérone, les astrocytes enrichis en DHA ne présentent pas de différence de capacité de capture du glutamate, ce qui a déjà été montré au laboratoire (Grintal *et al*, 2009). En revanche, nous observons une augmentation de la capture du glutamate chez les astrocytes enrichis en AA, cette augmentation est d'amplitude similaire à celle induite par la corticostérone (+30% par rapport aux cellules témoins). Sur ces cellules enrichies en AA, la corticostérone n'induit pas d'augmentation supplémentaire de la capture du glutamate. Ce résultat peut être analysé de deux manières, soit l'effet stimulant de l'enrichissement en AA l'emporte sur celui de la corticostérone, soit l'enrichissement en AA inhibe la réponse à la corticostérone, ce qui serait en accord avec l'effet inhibiteur de l'AA sur l'expression de GR.

L'enrichissement en DHA s'oppose clairement aux effets de la corticostérone : les cellules enrichies en DHA ne présentent plus d'activation de leur capture de glutamate en réponse à la corticostérone ; ce qui est en accord avec l'inhibition de l'expression de GR par l'enrichissement en DHA, l'étude de Zschocke *et al* (2005) ayant bien montré que l'action des glucocorticoïdes sur la capture astrocytaire du glutamate était médiée par GR.

Ces résultats suggèrent donc que l'enrichissement en DHA et en AA, s'oppose à la stimulation de la capture du glutamate par la corticostérone, s'opposant ainsi éventuellement à l'adaptation des astrocytes aux ruptures de l'homéostasie glutamatergique associées au stress. Ces interprétations devront être revues à la lumière d'expériences complémentaires. Il sera nécessaire dans un premier temps de caractériser de façon plus exhaustive l'influence de la corticostérone sur les fonctions astrocytaires régulant la neurotransmission glutamatergique en analysant l'expression de plusieurs autres marqueurs (glutamine synthétase, transporteurs du glutamate, sérine racémase).

**En résumé**, nos résultats ont permis de mettre en évidence une régulation de la morphologie astrocytaire et une augmentation des capacités de capture du glutamate des cellules sous l'action de la corticostérone. Ces effets de la corticostérone sont associés à une forte inhibition de l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes GR et une translocation de ce dernier vers le noyau, suggérant un mécanisme d'action au niveau de l'expression des gènes concernés. L'enrichissement membranaire en AGPI semble avoir un rôle régulateur complexe sur la réponse des astrocytes à la corticostérone. Ainsi, l'enrichissement en DHA ou AA réduit l'expression de GR sur ces cellules et s'oppose à la stimulation de la capture du glutamate par la corticostérone. De façon plus spécifique, l'enrichissement en DHA s'oppose partiellement aux effets dé-différenciateurs de la corticostérone sur la morphologie astrocytaire. Ces résultats, montrant des interférences entre la réponse des astrocytes à l'hormone du stress et leur statut en AGPI, devront être complétés. Il faudra notamment distinguer le rôle respectif du DHA et de l'AA et préciser les mécanismes en jeu, avant d'aller plus avant dans leur interprétation.



## Conclusion/Perspectives



Peu d'études se sont intéressées à la régulation de la réponse au stress par les apports alimentaires en AGPI n-3 et les mécanismes potentiellement mis en jeu n'ont été que peu envisagés. Au cours de ce travail de recherche, nous avons soulevé l'hypothèse d'un rôle protecteur des AGPI n-3 face aux altérations induites par un stress chronique. Pour répondre à cette hypothèse nous avons étudié, grâce à 2 approches complémentaires *in vivo* et *in vitro*, l'impact des apports en AGPI n-3 sur la régulation de la synapse tripartite glutamatergique par le stress.

Notre approche *in vivo* visait à étudier la réponse à un stress chronique de contention chez le rat et sa modulation par une déficience en AGPI n-3 ou à l'inverse un enrichissement en AGPI-LC n-3 (DHA + EPA). Cette première partie de l'étude montre que la réponse au stress est modulée par les apports alimentaires en AGPI n-3. En effet, sur différents paramètres, la déficience en AGPI n-3 accentue la sensibilité au stress, tandis que le régime enrichi en AGPI-LC n-3 atténue la réponse au stress chronique. Nos résultats soulignent également la complexité de cette régulation. Ainsi :

- La déficience en AGPI n-3 renforce l'effet du stress sur l'activité locomotrice (réduction de l'activité globale mesurée en openfield) et sur la réponse émotionnelle (augmentation du temps de toilettage et de la sensibilité aux environnements anxiogènes).
- L'enrichissement en AGPI-LC n-3 réduit la perte de poids, le pic de corticostérone et la réponse comportementale induite par le stress.
- Le stress réduit la teneur cérébrale en DHA chez les rats équilibrés et enrichis en AGPI-LC n-3. Chez ces animaux, le stress réduit la libération pré-synaptique de glutamate (réduction reflétée par l'augmentation de la PPF) à un niveau proche de la réduction observée chez les rats déficients en AGPI n-3.

Nos résultats posent plusieurs questions et ouvrent de nombreuses pistes :

- Tout d'abord, la réponse au stress, chez les rats équilibrés, apparaît relativement limitée, comme le montre l'absence de modification de l'expression des récepteurs

aux glucocorticoïdes GR et MR dans l'hippocampe, et la réponse comportementale restreinte. Il est possible que progressivement au cours des sessions de stress répétées, les rats aient développé des mécanismes d'adaptation au stress, et qu'au moment des différentes analyses les réponses au stress soient atténuées. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire d'effectuer l'analyse des différents paramètres à des temps intermédiaires (après 10 jours de contention et juste après la dernière session de stress).

- Ensuite, l'analyse de l'expression génique de différents marqueurs (réponse au stress, fonctionnement de la synapse tripartite glutamatergique, métabolisme lipidique) ouvre des pistes mécanistiques faisant intervenir notamment le BDNF, le facteur de transcription PPAR $\delta$ , les récepteurs métabotropiques pré-synaptiques du glutamate et certaines protéines de l'exocytose. Pour confirmer ces pistes, il est nécessaire de compléter ces résultats par l'analyse protéique de ces marqueurs et par une étude des conséquences fonctionnelles de leur modulation (utilisation d'inhibiteurs spécifiques, mesure d'activité enzymatique)
- Nos résultats soulignent les modifications de la composition lipidique cérébrale en fonction des apports alimentaires en AGPI n-3, mais également en fonction du stress chronique. Afin de déterminer les mécanismes impliqués, il sera nécessaire d'effectuer une analyse du métabolisme lipidique plus complète, en étudiant d'une part la composition lipidique au niveau du plasma et au niveau du foie et d'autre part l'activité et l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique cérébral, notamment celles des PLA2.

Notre approche *in vitro* visait à caractériser la réponse spécifique des différents partenaires cellulaires de la synapse tripartite glutamatergique. Il en ressort les résultats suivants :

- L'étude de la composition lipidique membranaire sur nos modèles cellulaires indique que les glucocorticoïdes favorisent l'augmentation du ratio en AGPI n-6/AGPI n-3. Cette observation rejoint un aspect des résultats *in vivo* montrant que le stress réduit la teneur cérébrale en DHA. Cependant, cet effet dépend du type cellulaire considéré, ainsi que des AGPI disponibles dans le milieu. En effet, notre

étude mécanistique sur la lignée de neuroblastomes humains suggère que l'hydrocortisone facilite l'incorporation des AGPI disponibles dans les phospholipides membranaires.

- Notre étude sur la lignée de neuroblastomes humains a mis en évidence une régulation complexe des paramètres de libération du neurotransmetteur en fonction de la supplémentation du milieu de culture en AGPI et de l'ajout d'hydrocortisone. Ainsi, si on observe des effets propres des AGPI (le DHA stimule la libération basale et inhibe spécifiquement la libération stimulée au KCl ; l'AA favorise la libération stimulée quel que soit le stimulus utilisé) et de l'hydrocortisone (effet « rapide » inhibiteur sur la libération basale), nos résultats soulignent également une interaction entre le statut membranaire en AGPI des cellules et l'action des glucocorticoïdes. Ainsi, l'inhibition de la libération basale de NA par l'hydrocortisone est annulée en présence d'AGPI à la concentration de 30 $\mu$ M et, à l'inverse, accentuée en présence d'AGPI à la concentration de 70 $\mu$ M. Concernant la libération stimulée, les effets de l'enrichissement membranaire en AA sont potentialisés par l'hydrocortisone alors que les effets liés à l'enrichissement en DHA sont réduits sous l'effet de l'hormone.
- L'étude sur le modèle de culture primaire d'astrocytes montre que la corticostérone induit une dé-différenciation morphologique des astrocytes et stimule leur capacité de capture du glutamate. L'enrichissement des astrocytes en DHA limite l'action de la corticostérone sur ces paramètres en ralentissant les modifications morphologiques et en prévenant l'inhibition de la capture de glutamate par la corticostérone.

Cette approche *in vitro* a mis en évidence quelques mécanismes de régulation pouvant être impliqués dans la réponse au stress. Cependant, ces données nécessitent d'être complétées :

- Si des effets spécifiques des AGPI et de l'hydrocortisone ont été mis en évidence sur les différents types de libération, les résultats sur les cellules SH\_SY5Y ne permettent pas de déterminer les mécanismes impliqués. Il sera intéressant de compléter cette analyse par l'étude de 2 mécanismes de régulation : la signalisation

calcique et la voie des endocannabinoïdes. En effet, ces 2 voies sont connues pour être régulées d'une part par les AGPI et d'autre part par le stress, mais l'interaction entre les 2 facteurs n'a jamais été étudiée.

- Bien que constituant un bon modèle d'étude des phénomènes d'exocytose, la lignée cellulaire de neuroblastomes humains SH\_SY5Y reste éloignée de notre modèle d'étude *in vivo*. Il serait donc intéressant d'évaluer les paramètres de libération de neurotransmetteurs sur des modèles de culture primaire de neurones, ainsi que sur des systèmes de co-culture neurones/astrocytes.
- Les résultats obtenus sur le modèle de culture primaire d'astrocytes suggèrent une régulation des fonctions astrocytaires par les AGPI et par le stress. Il sera intéressant d'appréhender ces aspects *in vivo* en étudiant la morphologie astrocytaire en immuno-histochimie cérébrale et en évaluant les capacités de capture du glutamate *ex vivo* sur des homogénats cellulaires d'hippocampe issus de rats carencés, équilibrés et supplémentés en AGPI n-3. De plus, comme pour l'étude des paramètres de libération de neurotransmetteur, il serait intéressant d'étudier les modulations des fonctions astrocytaires sur des modèles de co-cultures neurones/astrocytes.
- L'étude des récepteurs GR sur les astrocytes a montré une réduction de leur expression en présence de corticostérone, ainsi qu'une translocation vers le noyau de ces récepteurs. *In vivo*, l'étude de l'expression génique et protéique de ce récepteur n'a pas montré de modulation par les AGPI ou par le stress. L'étude de la répartition cellulaire (neuronale, astrocytaire, microgliale) de ces récepteurs *in vivo* par immuno-histochimie ou hybridation *in situ* pourrait apporter un complément d'information.

En conclusion, cette étude suggère un effet protecteur des AGPI n-3 face au stress chronique. Nos résultats ont mis en évidence une régulation complexe de la réponse au stress chronique par les apports en AGPI n-3 et constituent une base solide pour de futures analyses visant à clarifier les mécanismes impliqués.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel T, Nguyen PV, Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase, 2008, *Prog Brain, Res*, 169:97-115
- Aguilera G, Kiss A, Liu Y, Kamitakahara A, Negative regulation of corticotrophin releasing factor expression and limitation of stress response, 2007, *Stress*, 10(2):153-61
- Aïd S, Vancassel S, Linard A, Laviaille 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, 2005, *J Nutr*, 135(5):1008-13
- Aïd S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Laviaille M, Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus, 2003, *J Lipid Res*, 44(8):1545-51
- Ailhaud G, Massiera F, Weill P, legrand P, Alessandri JM, Guesnet P, temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity, 2006, *Prog Lipid res*, 45(3):203-36
- Albeck DS, McKittrick CR, Balnchard DC, Blanchard RJ, Nikulina J, McEwen BS, Sakai RR, Chronic social stress alters levels of corticotrophin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain, 1997, *J Neurosci*, 17(12):4895-903
- Aleisa AM, Alzoubi KH, Gerges NZ, Alkadhi KA, Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: possible role of BDNF, 2006, *Neurobiol Dis*, 22(3):453-62
- Alessandri JM, Goustard-Langelier B, Alterations in fatty acid composition of tissue phospholipids in the developing retinal dystrophic rat, *Lipids*, 2001,36(10):1141-52
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aïd S, Poumès-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Laviaille M, Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life, 2004, *Reprod Nutr Dev*, 44(6):509-38
- Alessandri JM, Poumès-Ballihaut C, Langelier B, Perruchot MH, Raguenez G, Laviaille M, Guesnet P, Incorporation of docosahexaenoic acid into nerve membrane phospholipids: bridging the gap between animals and cultured cells, 2003, *Am J Clin Nutr*, 78(4):702-10
- Alfarez DN, Joëls M, Krugers HJ, Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro, 2003, *Eur J Neurosci*, 17(9):1928-34

Alkayed NJ, Birks EK, Narayanan J, Petrie KA, Kohler-Cabot AE, Harder DR, Role of P-450 arachidonic acid epoxygenase in the response of cerebral blood flow to glutamate in rats, 1997, *Stroke*, 28(5):1066-72

Allaman I, Papp M, Kraftsik R, Fiumelli H, Magistretti PJ, Martin JL, Expression of brain-derived neurotrophic factor is not modulated by chronic mild stress in the rat hippocampus and amygdale, 2008, *Pharmacol Rep*, 60(6):1001-7

Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM, Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling, 2007, *Nat Rev Neurosci*, 8(2):128-40

Allen NJ, Barres BA, Neuroscience: Glia- more than just brain glue, 2009, *Nature*, 457(7230):675-7

Altar CA, Neurotrophins and depression, 1999, *Trends Pharmacol Sci*, 20(2):59-61

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P, The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies), 2007, *Prog Brain Res*, 163:3-22

Amaral DG, Witter MP, The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data, 1989, *Neuroscience*, 31(3):571-91

Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traytman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A, An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(4):2106-11

Amruthesh SC, Boerschel MF, Mc Kinney JS, Willoughby KA, Ellis EF, Metabolism of arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and prostaglandins in cultured rat hippocampal astrocytes, 1993, *J Neurochem*, 61(1):150-9

Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E, Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus, 2004, *J Neurosci*, 24(31):6920-7

Anwyl R, Induction and expression mechanisms of post-synaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression, 2006, *Prog Neurobiol*, 78(1):17-37

Anwyl R, Metabotropic glutamate receptor-dependant long-term potentiation, 2009, *Neuropharmacology*, 56(4):735-40

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG, Tripartite synapses: glia, he unacknowledged partner, 1999, *Trends Neurosci*, 22(5):208-15

Arendash GW, Jensen MT, Salem N Jr, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, Leighty R, Potter H, A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice, 2007, *Neuroscience*, 149(2):286-302

Ariel A, Serhan CN, Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation, 2007, *Trends Immunol*, 28(4):176-83

Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN, Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(21):7671-6

Asmundson GJ, Carleton RN, Is acoustic startle a viable exposure protocol for posttraumatic stress disorder: A clinical case study, 2010, *Cogn Behav Ther*, 39(4):311-8

Asrar S, Zhou Z, Ren W, Jia Z, Ca(2+) permeable AMPA receptor induced long-term potentiation requires PI3/MAP kinases but not Ca/CaM dependant kinase II, 2009, *PLoS One*, 4(2):e4339

Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noisette N, Galan P, Hercberg S, Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women, 2004, *Lipids*, 39(6):527-35

Autellitano DJ, Glucocorticoid regulation of c-fos, c-jun and transcription factor AP-1 in the AtT-20 corticotrope cell, 1994, *J Neuroendocrinol*, 6(6):627-37

Bacaj T, Pang ZP, Südhof TC, Testing the SNARE/SM protein model of membrane fusion, 2010, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(52):22365-6

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST, Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatt acids on COX-2 expression and IL-6 secretion, 2003, *Proc Natl, Acad, Sci USA*, 100(4):1751-6

Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK, Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter, 2001, *J Biol Chem*, 276(39):36764-9

Baik I, Abbott RD, Curb JD, Shin C, Intake of fish and n-3 fatty acids and future risk of metabolic syndrome, 2010, *J Am Diet Assoc*, 110(7):1018-26

Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS, The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects f transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer, 2006, *J Neurochem*, 98(3):641-53

Banni S, Di MARzo V, effect of dietary fat on endocannabinoids and related mediators: consequences on energy homeostasis, inflammation and mood, 2010, *Mol Nutr Food Res*, 54(1):82-92

Baran SE, Armstrong CE, Niren DC, Hanna JJ, Conrad CD, Chronic stress and sex differences on the recall of fear conditioning and extinction, *Neurobiol Learn Mem*, 2009, 91(3):323-32

Barceló-Coblijn G, Kitajka K, Puskás LG, Hogyes E, Zvara A, Hackler L Jr, Farkas T, Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio, 2003, *Biochim Biophys Acta*, 1632(1-3):72-9

Barnes CA, Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioural study in the rat, 1979, *J comp Physiol Psychol*, 93(1):74-104

Barnum CJ, Blandino P Jr, Deak T, Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure, 2007, *J Neuroendocrinol*, 19(8):632-42

Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G, The effects of repetitive low frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus, 1980, *Life Sci*, 27(24):2385-91

Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N, Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation, 2001, *Physiol Behav*, 73(4):525-32

Bayazitov OT, Richardson RJ, Fricke RG, Zakharenko SS, Slow presynaptic and fast postsynaptic components of compound long-term potentiation, 2007, *J Neurosci*, 27(43):11510-21

Bazan NG, Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection, 2009, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81(2-3):205-11

Bazan NG, Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress, 2005, *Brain Pathol*, 15(2):159-66

Bazinet RP, Douglas H, Cunnane SC, Whole-body utilization of n-3 PUFA in n-6 PUFA deficient rats, 2003, *Lipids*, 38(2):187-9

Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC, Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD, 2000, *Nat Neurosci*, 3(12):1291-300

Beck KD, Luine VN, Sex differences in behavioural and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions, 2002, *Physiol Behav*, 75(5):661-73

Bellone C, Lüscher C, Mameli M, Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors, 2008, *Cell Mol Life Sci*, 65(18):2913-23

Bennett MR, Farnell L, Gibson WG, The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone, 2000, *Biophys J*, 78(5):2201-21

Bennett MR, The concept of long term potentiation of transmission at synapses, 2000, *Prog Neurobiol*, 60(2):109-37

Berger A, Mutch DM, German JB, Roberts MA, Dietary effects of arachidonate-rich fungal oil and fish oil on murine hepatic and hippocampal gene expression, 2002, *Lipids Health Dis*, 1:2.

Bergström A, Jayatissa MN, Mork A, Wibord O, Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression: an in situ hybridization study, 2008, *Brain Res*, 1196:41-52

Bernoud N, Fenart L, Bénistant 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, 1998, *J Lipid Res*, 39(9):1816-24

Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T, Mc Bean GJ, Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid, 2005, *Brain Res*, 1037(1-2):123-33

Bhatia HS, Agrawal R, Sharma S, Huo YX, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood, 2011, *PLoS One*, 6(12) :e28451

Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P, Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint, 2002, *J Neuroendocrinol*, 14(5):403-10

Biedler JL, Helson L, Spengler BA, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture, 1973, *Cancer Res*, 33(11):2643-52

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT, Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence, 1972, *Brain Res*, 43(2):429-35

Blanchard RJ, Blanchard DC, Crouching as an index of fear, 1969, *J Comp Physiol Psychol*, 67(3):370-5

Bliss TV, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, 1993, *Nature*, 361(6407):31-9

Bliss TV, Lomo T, Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulations of the perforant path, 1973, *J Physiol*, 232(2):331-56

Bliss TV, Lomo T, Plastocoty in a monosynaptic cortical pathway, 1970, *J Physiol*, 207(2):61

Bloss EB, Hunter RG, Hippocampal kainite receptors, 2010, *Vitam Horm*, 82:167-84

Bodnoff SR, Humphrey AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ, Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats, 1995, *J Neurosci*, 15(1 Pt 1):61-9

Bohn MC, Howard E, Vielkind U, Krozowski Z, Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors, 1991, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40(1-3):105-11

Bohn MC, O'Banion MK, Young DA, Giuliano R, Hussain S, Dean DO, Cunningham LA, In vitro studies of glucocorticoid effects on neurons and astrocytes, 1994, *Ann NY Acad Sci*, 746:243-58

Boland LM, Drzewiecki MM, Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels, 2008, *Cell Biochem Biophys*, 52(2):59-84

Bolles RC, Collier AC, The effect of predictive cues on freezing in rats, 1976, *Learn Behav*, 4(1):6-8

Borsonelo EC, Suchecki D, Galduroz JC, Effect of fish oil and coconut fat supplementation on depressive-type behavior and corticosterone levels of prenatally stressed male rats, 2011, *Brain Res*, 1385:144-50

Bortolotto ZA, Lauri S, Isaac JT, Collingridge GL, Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation, 2003, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):657-66

Boucher O, Burden MJ, Muckle G, Saint-Amour D, Ayotte P, Dewailly E, Nelson CA, Jacobson SW, Jacobson JL, Neurophysiologic and neurobehavioral evidence of beneficial effects of prenatal omega-3 fatty acid intake on memory function at school age, 2011, *Am J Clin Nutr*, 93(5):1025-37

Boudrault C, Bazinet RP, Ma DW, Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease, 2009, *J Nutr Biochem*, 20(1):1-10

Bourre JM, Paquotte P, Apports en DHA (acide gras omega 3) par les poissons et les fruits de mer consommés en France, 2007, *OCL*, 14(1) : 44-50

Bourre JM, Pascal G, Durand G, Masson M, Dumont O, Piciotti M, Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (mitochondria and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids, 1984, *J Neurochem*, 43(2):342-8

Bouton ME, Context and behavioural processes in extinction, 2004, *Learn Mem*, 11(5):485-94

Bowles NP, Hill MN, Bhagat SM, Karatsoreos IN, Hillard CJ, Mc Ewen BS, Chronic, noninvasive glucocorticoid administration suppresses limbic endocannabinoid signalling in mice, 2011, *Neuroscience*

Bowman RE, Micik R, Gautreaux C, Fernandez L, Luine VN, Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress, 2009, *Physiol Behav*, 97(1):21-9

Bowman RE, Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan, 2005, *J Neuroendocrinol*, 17(8):526-35

Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat, 1996, *Endocrinology*, 137(1):354-66

Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R, Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture, 2010, *Front Biosci (Schol Ed)*, 2:558-70

Brenna JT, Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man, 2002, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 5(2) : 127-32

Brenna JT, Salem Jr N, Sinclair AJ, Cunnane SC,  $\alpha$ -linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009, 80(2-3):85-91

Brew H, Attwell D, Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells, 1987, *Nature*, 327(6124):707-9

Bridges N, Slais K, Sykova E, The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocytes numbers: a comparison of male and female Wistar rats, 2008, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(2):131-8

Bronk P, Deak F, Wilson MC, Liu X, Sudhof TC, Kavalali ET, Differential effects of SNAP-25 deletion on Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent neurotransmission, 2007, *J Neurophysiol*, 98(2):794-806

Brown TC, Tran IC, Backos DS, Esteban JA, NMDA receptor-dependant activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD, 2005, *Neuron*, 45(1):81-94

Brown TH, McAfee Da, Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion, 1982, *Science*, 215(4538):1411-3

Brown WJ, Chambers K, Doody A, Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function, 2003, *traffic*, 4(4):214-21

Braud B, Esterle L, Vaysse C, Alfos S, Combe N, Higuieret P, Pallet V, A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neurogranin and RC3/neurogranin in the rat brain, 2010, *Br J Nutr*, 103(12):1720-9

Buchanan TW, Kern S, Allen JS, Tranel D, Kirschbaum C, Circadian regulation of cortisol after hippocampal damage in humans, 2004, *Biol Psychiatry*, 56(9):651-6

Buchanan TW, Tranel D, Kirschbaum C, Hippocampal damage abolishes the cortisol response to psychosocial stress in humans, 2009, *Horm Behav*, 56(1):44-50

Buckley JD, Howe PR, Anti-obesity of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids, 2009, *Obes Rev*, 10(6):648-59

Burdge GC, Calder PC, Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults, 2005, *Reprod Nutr Dev.*, 45(5):581-97

Burke JE, Dennis EA, Phospholipase A2 biochemistry, 2009, *Cardiovasc Drugs Ther*, 23(1):49-59

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH, Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains, 2002, *J Neurosci*, 22(1):183-92

Buynitsky, Mostofsky DI, Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments, 2009, *Neurosci Biobehav Rev* 33(7):1089-98

Cahill L, Prins B, Weber M, McGaugh JL, Beta-adrenergic activation and memory for emotional events, 1994, *Nature*, 371(6499):702-4

Calder PC, n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic, 2003, *Lipids*, 38(4):343-52

Calder PC, n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases, 2006, *Am J Clin Nutr*, 83(6 Suppl):1505S-1519S

Calon F, Lim GP, Morihara T, Yang F, Ubeda O, Salem N jr, Frautschy SA, Cole GM, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, 2005, *Eur J Neurosci*, 22(3):617-26

Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, Dutta-Roy AK, Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta, 1998, *Placenta*, 19(5-6):409-15

Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun Sb, Lovinger D, Kim HY, Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function, 2009, *J Neurochem*, 111(2):510-21

Capogna M, Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway-CA1 EPSCs, 2004, *Eur J Neurosci*, 19(10):2847-58

Carmignoto G, Fellin T, Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanisms for neuronal synchronisation in the hippocampus, 2006, *J Physiol Paris*, 99(2-3):98-102

Carmignoto G, Gomez-Gonzalo M, The contribution of astrocytes signalling to neurovascular coupling, 2010, *Brain Res Rev*, 63(1-2):138-48

Carr CM, Munson M, Tag team action at the synapse, 2007, *EMBO Rep*, 8(9):834-8

Carr CM, Rizo J, At the Junction of SNARE and SM Protein Function, 2010, *Curr Opin Cell Biol*, 22(4):488-95

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, 2000, *J Lipid Res*, 41(3):465-72

Cartmell J, Schoepp DD, Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors, 2000, *J Neurochem*, 75(3):889-907

Casady RL, Taylor AN, Effect of electrical stimulation of the hippocampus upon corticosteroid levels in the freely-behaving, non-stressed rat, 1976, *Neuroendocrinology*, 20(1):68-78

Castren E, Voikar V, Rantamaki T, Role of neurotrophic factors in depression, 2007, *Curr Opin Pharmacol*, 7(1):18-21

Catala A, A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids, 2010, *Biochem Biophys Res Commun*, 399(3):318-23

Chalon S, Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission, 2006, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 75(4-5):259-69

Chameau P, Qin Y, Spijker S, Smit AB, Joëls M, Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus, 2007, *J Neurophysiol*, 97(1):5-14

Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavielle M, Denis I, Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes, 2006, *Eur J Neurosci*, 24(11):3084-90

Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavielle M, Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids, 2004, *J Neurosci Res*, 75(1):96-106

Chao TI, Rickmann M Wolff JR, The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic Transmission, Volterra A, Magistretti P, Haydon P, editors. Oxford: Oxford Univ Press, 2002, 3-23

Chaouloff F, Groc L, Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress, 2011, *Front Neuroendocrinol*, 32(1):25-42

Chapkin RS, Wang N, Fan YY, Lupton JR, Prior IA, Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains, 2008, *Biochim Biophys*, 1778(2):466-71

Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J Cpenhagen DR, Edwards RH, Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission, 1999, *Cell*, 99(7):769-80

Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH, Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system A transporters, 2002, *J Neurosci*, 22(1):62-72

Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet, RP, Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover, 2008, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 79(3-5):85-91

Chen JX, Tang YT, Yang JX, Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats, 2008, *Cell Mol Neurobiol*, 28(2):237-44

Chen Y, Mao Y, Zhou D, Hu X, wang J, Ma Y, Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory, 2010, *Behav Brain Res*, 212(1):49-55

Childs CE, Romjin T, Enke U, Hoile S, Calder PC, Maternal diet during pregnancy has tissue-specific effects upon fetal fatty acid composition and alters fetal immune parameter, 2010, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 83(4-6):179-84

Christoffel DJ, Goledn SA, Russo SJ, Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders, 2011, *Rev Neurosci*, 22(5):535-49

Chrousos GP, Stress and disorders of the stress system, 2009, *Nat Rev Endocrinol*, 5(7):374-81

Chung S, Son GH, Kim K, Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications, 2011, *Biochim Biophys Acta*, 1812(5):581-91

Chung WL, Chen KK, Su HM, Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels, 2008, *J Nutr*, 138(6):1165-71

Chytrova G, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems, 2010, *Brain Res*, 1341:32-40

Cieslik K, Sowa-Kucma M, Ossowska G, Legutko B, Wolak M, opoka W, Nowak G, Chronic unpredictable stress-induced reduction in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is antagonized by zinc treatment, 2011, *Pharmacol Rep*, 63(2):537-43

Cimini A, Cristiano L, Benedetti E, D'Angelo B, Ceru MP, PPARs Expression in Adult mouse Neural Stem Cells: Modulation of PPARs during astroglial differentiation of NSC, 2007, *PPAR Res*, 2007:48242

Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikström AC, Gustaffsson JA, Fuxe K, Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system, 1994, *Neuroscience*, 62(3):843-97

Citri A, Malenka RC, Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms, 2008, *Neuropsychopharmacology*, 33(1):18-41

Clandinin MT, Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid, 1999, *Lipids*, 34(2):131-7

Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, Ross P, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG, Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood, 2009, *Behav Brain Res*, 205(1):319-21

Clarke SD, Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome, 2001, *J Nutr*, 131(4):1129-32

Coburn-Litvak PS, Pothakos K, tata DA? McCloskey DP, Anderson BJ, Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats, 2003, *Neurobiol Learn Mem*, 80(1):11-23

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H, Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commisural pathway of the rat hippocampus, 1983, *J Physiol*, 334:33-46

Combe N, Boué C, Apports alimentaires en acides linoléique et alpha-linolénique d'une population d'Aquitaine, 2001, *OCL*, 8(2) : 118-21

Combe N, Boué-Vaysse C, Face aux besoins et à la réalité des consommations, quelles sont les spécificités des différentes sources d'acides gras omega 3 disponibles?, 2004, *OCL*, 11(2) : 103-5

Connell E, Darios F, Broersen K, Gatsby N, Peak-Chew SY, Rickman C, Davletov B, Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc 18, 2007, *EMBO Rep*, 8(4):414-9

Conrad CD, A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory, 2010, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(5):742-55

Conrad CD, Grote KA, Hobbs Rj, Ferayoni A, Sex differences in spatial and non-spatial Y-Maze performance after chronic stress, 2003, *Neurobiol Learn Mem*, 79(1):32-40

Conrad CD, Jackson JL, Wise LS, Chronic stress enhances ibotenic acid-induced damage selectively within the hippocampal CA3 region of male, but not female rats, 2004, *Neuroscience*, 125(3):759-67

Conrad CD, What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus, 2006, *Behav Cogn Neurosci Rev*, 5(1):41-60

Cordero MI, Rodriguez JJ, Davies HA, Peddie CJ, Sandi C, Stewart MG, Chronic restraint stress down-regulates amygdaloid expression of polysialylated neural cell adhesion molecule, 2005, *Neuroscience*, 133(4):903-10

Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grübler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U, requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, 2007, *Endocrinology*, 148(4):1574-81

Cotman CW, Monaghan DT, Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties, 1986, *Adv Exp Med Biol*, 203:237-52

Crawford MA, Hassam AG, Williams G, Essential fatty acids and fetal brain growth, 1976, *Lancet.*, 1(7957):452-3

Cruz FC, Marin MT, Leao RM, Planeta CS, Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats, 2012, *Int J Dev Neurosci*, 30(1):19-23

Cryan JF, Kelly PH, Neijt HC, Sansig G, Flor PJ, van der Putten H, Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7, 2003, *Eur J Neurosci*, 17(11):2409-17

Cunnane SC, Anderson MJ, The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat, 1997, *J Nutr*, 127(1):146-52

Cunnane SC, New developments in alpha-linoleate metabolism with emphasis on the importance of  $\beta$ -oxydation and carbon recycling, 2001, *World Rev. Nutr.*, 88 : 178-83

Cunnane SC, The conditional nature of dietary need for polyunsaturates : a proposal to reclassify "essential fatty acids" as "conditionally-dispensable" fatty acids, 2000, *Br. J. Nutr.*, 84(6) : 803-12

Cunningham P, McDermott L, Long chain PUFA transport in human term placenta, 2009, *J Nutr*, 139(4):636-9

Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E, Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(22):12796-801

Czeh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E, Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment, 2006, *Neuropsychopharmacology*, 31(8):1616-26

D'Aquila PS, Peana AT, Carboni V, Serra G, Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine, 2000, *Eur J Pharmacol*, 399(1):43-7

Danbolt NC, Glutamate uptake, 2001, *Prog Neurobiol*, 65(1):1-105

Darios F, Davlevtov B, Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3, 2006, *Nature*, 440(7085):813-7

Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER, Central corticosteroid actions: Search for gene targets, 2008, *Eur J Pharmacol*, 583(2-3):272-89

Davies JN, Jarvis SE, Zamponi GW, Bipartite syntaxin 1A interactions mediate CaV2.2 calcium channel regulation, 2011, *Biochem Biophys Res Commun*, 411(3):562-8

Davlevtov B, Connell E, Darios F, Regulation of SNARE fusion machinery by fatty acids, 2007, *Cell Mol Life Sci*, 64(13):1597-608

De Kloet ER, Karst H, Joëls M, Corticosteroid hormones in the central stress response quick-and-slow, 2008, *Front Neuroendocrinol*, 29(2):268-72

De Pitta M, Volman V, Berry H, Ben-Jacob E, A tale of two stories : astrocytes regulation of synaptic depression and facilitation, 2011, *PLoS Comput Biol*, 7(12):e1002293

De Vasconcellos-Bittencourt AP, Vendite DA, Nassif M, Crema LM, Frozza R, thomazi AP, Nieto FB, Wofchuk S, Salbego C, da Rocha ER, dalmaz C, Chronic stress and lithium treatments alter hippocampal glutamate uptake and release in the rat and potentiate necrotic cellular death after oxygen and glucose deprivation, 2011, *Neurochem Res*, 36(5):793-800

Delarue J, Matzinger O, Binnert C, Schneiter P, Chiolero R, Tappy L, fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men, 2003, *Diabetes Metab*, 29(3):289-95

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, 1996, *J Neurochem*, 66(4):1582-91

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, 1997, *J Lipid Res*, 38(4):680-9

Delion S, Chalon S, Hérault J, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G, Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats, 1994, *J Nutr*, 124(12):2466-76

DeMar JC Jr, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI, One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats, 2006, *J Lipid Res*, 47(1):172-80

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, 2004, *J Neurochem*, 91(5):1125-37

Denker A, Rizzoli SO, Synaptic vesicle pools: an update, 2010, *Front Synaptic Neurosci*, 2:135

Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslin H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA, Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus, 2003, *J Neurosci*, 23(6):2371-82

Derouiche A, The perisynaptic astrocytes process as a glial compartment-immunolabeling for glutamine synthetase and other glial markers, 2003, *Adv Mol Cell Biol*, 31:147-63

Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A, Local Ca<sup>2+</sup> detection and modulation of synaptic release by astrocytes, 2011, *Nat Neurosci*, 14(10):1276-84

Di Nunzio M, Danesi F, Bordoni A, n-3 PUFA as regulators of cardiac gene transcription: a new link between PPAR activation and fatty acid composition, 2009, *Lipids*, 44(12):1073-9

Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG, Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism, 2003, *J Neurosci*, 23(12):4850-7

Domenici MR, Azad SC, Marsicano G, Schierloh A, Wotjak CT, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Lutz B, Rammes G, Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission, 2006, *J Neurosci*, 26(21):5794-9

Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, Rodriguez JJ, Cordero MI, Sandi C, Medvedev NI, Popov VI, Colyer FM, Peddie CJ, Stewart MG, Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study, 2006, *Neuroscience*, 140(2):597-606

Dostert A, Heinzl T, Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action, 2004, *Curr Pharm Des*, 10(23):2807-16

Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED, The presynaptic cytomatrix of brain synapses, 2001, *Cell Mol Life Sci*, 58(1):94-116

Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W, Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), 1993, *Biol Cell*, 77(1):67-76

Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Léan A, Nemer M, Schmidt TJ, Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene, 1993, *EMBO J*, 12(1):145-56

Dudek SM, Bear MF, Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(10):4363-7

Duttaroy AK, Fetal growth and development: roles of fatty acid transport proteins and nuclear transcription factors in human placenta, 2004, *Indian J Exp Biol*, 42(8):747-57

Duttaroy AK, Transport of fatty acids across the human placenta: a review, 2009, *Prog Lipid Res*, 48(1):52-61

Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT, Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain, 2007, *Neurobiol Aging*, 28(3):424-39

Edward RH, The neurotransmitter cycle and quantal size, 2007, *Neuron*, 55(6):835-58

Ehninger D, Kempermann G, Neurogenesis in the adult hippocampus, 2008, *Cell Tissue Res*, 331(1):243-50

Eiland L, McEwen BS, Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodelling, 2010, *Hippocampus*

Ekmark-Lewen S, Lewen A, Israelsson C, Li GL, Farooque M, Olsson Y, Ebendal T, Hillered L, Vimentin and GFAP responses in astrocytes after contusion trauma to the murine brain, 2010, *Restor Neurol Neurosci*, 28(3):311-21

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B, an acidic protein isolated from fibrous astrocytes, 1971, *Brain Res*, 28(2):351-4

Engel K, Zhou M, Wang J, Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain, 2004, *J Biol Chem*, 279(48):50042-9

Enslin M, Milon H, Malnoë A, Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats, 1991, *Lipids*, 26(3):203-8

Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG, Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system, 2010, *J Neuroendocrinol*, 22(8):846-61

Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavielle M, Alessandri JM, Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion, 2010, *J. Nutr. Biochem*, 21(3):180-7

Extier A, Perruchot MH, Baudry C, Guesnet P, Lavielle M, Alessandri JM, Differential effects of steroids on the synthesis of polyunsaturated fatty acids by human neuroblastoma cells, 2009, *Neurochem Int.*, 55(5):295-301

Fagg GE, Foster AC, Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system, 1983, *Neuroscience*, 9(4):701-19

FAO, Bilans alimentaires, moyenne 1998-2000. Rome, Italia : Food and agriculture organization of the United States, 2002

FAO, Fish and fishery products – World apart consumption statistics based on food balanced sheets, 1996-2001, Rome, Italia : Food and agriculture organization of the United States, 2003

Farooqui AA, Horrocks LA, Brain phospholipases A2: a perspective on the history, 2004, *Prostaglandins Leukot Essent fatty Acids*, 71(3):161-9

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T, Modulation of inflammation in brain: a matter of fat, 2007, *J Neurochem*, 101(3):577-99

Farooqui AA, Horrocks LA, Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad and the ugly, 2006, *Neuroscientis*, 12(3):245-60

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Soforniew MV, Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury, 2004, *J Neurosci*, 24(9):2143-55

Favrelière S, Barrier L, Durand G, Chalon S, Tallineau C, Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmeneylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum, 1998, *Lipids*, 33(4):401-7

Feder A, Nestler EJ, Charney DS, Psychobiology and molecular genetics of resilience, 2009, *Nat Rev Neurosci*, 10(6):446-57

Fedorova I, Hussein N , Baumann MH, Di Martino C, Salem N Jr, An n-3 fatty acid deficiency impairs rat spatial learning in the Barnes maze, 2009, *Behav Neurosci*, 123(1):196-205

Fedorova I, Hussein N, Di Martino C, Moriguchi T, Hoshiba J, Majchrzak S, Salem N J, An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze, 2007, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(5-6):269-77

Fedorova I, Salem N Jr, Omega-3 fatty acids and rodent behavior, 2006, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 75(4-5):271-89

Fedorova I, Alvheim AR, Hussein N, Salem N Jr, Deficit in prepulse inhibition in mice caused by dietary n-3 fatty acid deficiency, 2009, Behav Neurosci, 123(6):1218-25

Feldman S, Weidenfeld J, Electrical stimulation of the dorsal hippocampus caused a long lasting inhibition of ACTH and adrenocortical responses to photic stimuli in freely moving rats, 2001, Brain Res, 911(1):22-6

Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G, Neuronal Synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors, 2004, Neuron, 43(5):729-43

Fendler K, Karmos G, Telegdy G, The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function, 1961, Acta Physiol Acad Sci Hung, 20:293-7

Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, Andersen ML, Tufik S, Lima MM, Chronic  $\omega$ -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol, 2011, Behav Brain Res, 219(1):116-22

Fili O, Michaelievski I, Bledi Y, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Boshwitz H, Linial M, Lotan I, Direct interaction of a brain voltage-gated K<sup>+</sup> channel with syntaxin 1A: functional impact on channel gating, 2001, J Neurosci, 21(6):1964-74

Finn DP, Endocannabinoid-mediated modulation of stress response: physiological and pathophysiological significance, 2010, Immunobiology, 215(8):629-46

Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A, Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion, 1980, Brain Res, 195(2):373-87

Föcking M, Hölker I, Trapp T, Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons, 2003, Biochem Biophys Res Comm, 304(4):720-3

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. Chem., 1957, 226(1):497-509

Fonnun F, Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain, 1984, J Neurochem, 42(1) :1-11

Fontella FU, Siquiera IR, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Netto CA, Dalmaz C, Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus, 2005, Neurochem Res, 30(1):105-11

Fontella FU, Vendite DA, Tabajara AS, Porciuncula LO, da Silva Torris IL, Jardim FM, Martini L, Souza DO, Netto CA, Dalmaz C, Repeated restraint stress alters hippocampal glutamate uptake and release in the rat, 2004, *Neurochem Res*, 29(9):1703-9

Fotuhi M, Mohassel P, Yaffe K, Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association, 2009, *Nat Clin Pract Neurol*, 5(3):140-52

Fredj NB, Burrone J, A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse, 2009, *Nat Neurosci*, 12(6):751-8

Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Davis JM, Mischoulon D, Peet M, Keck PE Jr, Marangell LB, Richardson AJ, Lake J, Stoll AL, Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry, 2006, *J Clin Psychiatry*, 67(12):1954-67

Freeman MP, Rapaport MH, Omega-3 fatty acids and depression: from cellular mechanisms to clinical care, 2011, *J Clin Psychiatry*, 72(2):258-9

Fremeau RT Jr, Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH, Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites, 2004, *Science*, 304(5678):1815-9

Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, trna CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH, The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse, 2001, *Neuron*, 31(2):247-60

Fujita S, Ikegaya Y, Nishikawa M, Nishiyama N, Matsuki N, Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices, 2001, *Br J Pharmacol*, 132(7):1417-22

Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, 2001, *Science*, 294(5548):1871-5

Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM, Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependant long-term depression in hippocampal area CA1, 2004, *J Neurosci*, 24(20):4859-64

Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C, Effects of chronic variate stress on feeding behaviour and on monoamine levels in different rat brain structures, 2003, *Neurochem Int*, 42(2):107-14

Gao Y, Bezchlibnyk YB, Sun X, Wang JF, Mc Ewen BS, Young LT, Effects of restraint stress on the expression of proteins involved in synaptic vesicle exocytosis in the hippocampus, 2006, *Neuroscience*, 141(3):1139-48

Garcia MC, Ward G, Ma YC, Salem N Jr, Kim HY, Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells, 1998, *J Neurochem*, 70(1):24-30

Gerbi A, Zérouta 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, 1994, *J Neurochem*, 62(4):1560-9

Gerges NZ, Aleisa AM, Schwarz LA, Alkadhi KA, Reduced basal CaMKII levels in hippocampal CA1 region: possible cause of stress-induced impairment of LTP in chronically stressed rats, 2004, *Hippocampus*, 14(3):402-10

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N, Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions, 2010, *Nat Rev Neurosci*, 11(2):87-99

Gil C, Soler-Jover A, Blasi J, Agilera J, Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain snaptosomes, 2005, *Biochem Biophys Res Commun*, 329(1):117-24

Gillis KD, Mossner R, Neher E, Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules, 1996, *Neuron*, 16(6):1209-1220

Gil-Sanchez A, Larqué E, demmelmair H, Acien MI, Faber FL, Parrilla JJ, Koletzko B, Maternal-fetal in vivo transfer of [<sup>13</sup>C]docosahexaenoic and other fatty acids across the human placenta 12h after maternal oral intake, 2010, *Am J Clin Nutr*, 92(1):115-22

Giusto NM, Salvador GA, Castagnet PI, Pasquare SJ, Ilincheta de Boschero MG, Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism, 2002, *Neurochem Res*, 27(11):1513-23

Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnar E, Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms, 2009, *Pharmacol Rev*, 61(4):395-412

Glenn HL, Jacobson BS, Arachidonic acid signalling to the cytoskeleton: the role of cyclooxygenase and cyclic AMP-dependent protein kinase in actin bundling, 2002, *Cell Motil Cytoskeleton*, 53(3):239-50

Glenn HL, Jacobson BS, Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells, 2003, *Cell Motil Cytoskeleton*, 55(4):265-77

Glitsch MD, Spontaneous neurotransmitter release and  $Ca^{2+}$  -how spontaneous is spontaneous neurotransmitter release?, 2008, *Cell Calcium*, 43(1):9-15

Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le Merrer J, Auwerx J, Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain, 2007, *Cell*, 131(2):405-18

Gomez-Pinilla F, Ying Z, differential effects of exercise and dietary docosahexaenoic acid on molecular systems associated with control of allostasis in the hypothalamus and hippocampus, 2010, *Neuroscience*, 168(1):130-7

Goodall AR, Danks K, Walker JH, Ball SG, Vaughan PF, Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH\_SY5Y, 1997, *J Neurochem*, 68(4):1542-52

Gottman K, Mittmann T, Lessmann V, BDNF signalling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses, 2009, *Exp Brain Res*, 199(3-4):203-34

Götz M, Hart fuss E, Malatesta P, Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice, 2002, *Brain Res Bull*, 57(6):777-88

Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Phol M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S, A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons, 2002, *J Neurosci*, 22(13):5442-51

Gray M, Bongham B, Viau V, A comparison of two repeated restraint stress paradigms on hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation, gonadal status and central neuropeptide expression in adult male rats, 2010, *J Neuroendocrinol*, 22(2):92-101

Green JT, Orr SK, Bazinet RP, The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids, 2008, *J Lipid Res*, 49(5):939-44

Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE, Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behaviour in male rats, 2005, *Behav Brain Res*, 156(1):105-14

Grillon C, Ameli R, Woods SW, Merikangas K, Davis M, Fear-potentiated startle in humans: effects of anticipatory anxiety on the acoustic blink reflex, 1991, *Psychophysiology*, 28(5):588-95

Grimaldi PA, Regulatory functions of PPARbeta in metabolism: implications for the treatment of metabolic syndrome, 2007, *Biochim Biophys Acta*, 1771(8):983-90

Grintal B, Champeil-Potokar G, Laviolle M, Vancassel S, Breton S, Denis I, Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid, 2009, *Neurochem Int*, 54(8):535-43

Grissom N, Bhatnagar S, Habituation to repeated stress: get used to it, 2009, *Neurobiol Learn Mem*, 92(2):215-24

Groc L, Choquet D, Chaouloff F, The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation, 2008, *Nat Neurosci*, 11(8):868-70

Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M, Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling, 2011, *Mol Cell Endocrinol*

Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M, Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response, 2011, *J Endocrinol*, 209(2):153-67

Gronli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM, Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper, 2006, *Pharmacol Biochem Behav*, 85(4):842-9

Gronli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM, Ursin R, Effects of chronic mild stress on sexual behaviour, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions, 2005, *Physiol Behav*, 84(4):571-7

Grosche J, Matyash V, Möler T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H, Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signalling to Bergmann glial cells, 1999, *Nat Neurosci*, 2(2):139-43

Grossmann C, Ruhs S, Seiferth A, Gekle M, Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling, 2010, *Steroids*, 75(8-9):539-43

Grozalka BB, Hill MN, Hillard CJ, Regulation of endocannabinoid signalling by stress implications for stress-related affective disorders, 2008, *Neurosci Biobehav Rev*, 32(6):1152-60

Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, renau-Piqueras J, Guerri C, Rho1 and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol, 2003, *J Neurosci*, 23(4):487-502

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(5):527-34

Guesnet P, Alessandri JM, Astorg P, Pifferi F, Laviolle M, Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI), 2005, *OCL*, 12(5) : 333-43

Guesnet P, Alessandri JM, Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – Implications for dietary recommendations, 2010, *Biochimie*

Hageman I, Nielsen M, Wortwein G, Diemer NH, Jorgensen MB, Electroconvulsive stimulation normalizes stress-induced changes in the glucocorticoid receptor and behaviour, 2009, *Behav Brain Res*, 196(1):71-7

Hainault I, Carolotti M, Hajduh E, Guichard C, Lavau M, Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia and adipocyte insulin resistance in rats, 1993, *Ann NY Acad Sci*, 683:98-101

Hajnal A, Smith GP, Norgren R, Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, 286(1):R31-7

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG, The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease, 2007, *Trends Mol Med*, 13(2):54-63

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Hadon PG, Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte, 2007, *J Neurosci*, 27(24):64733-6477

Hall MG, Quignodon L, Desvergne B, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta in the brain: facts and hypothesis, 2008, *PPAR Res*, 2008:780452

Haller J, Mikics E, Makara GB, The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings, 2008, *Front Neuroendocrinol*, 29(2):273-91

Hamazaki T, Hamazaki K, Fish oils and aggression or hostility, 2008, *Prog Lipid Res*, 47(4):221-32

Hamazaki T, Itomura M, Sawazaki S, Nagao Y, Anti-stress effects of DHA, 2000, *Biofactors*, 13(1-4):41-5

Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M, Kawata M, Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus, 2005, *Neurosci Res*, 51(4):371-81

Han JZ, Lin W, Chen YZ, Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: involvement of protein kinase A, 2005, *Acta Pharmacol Sin*, 26(2):199-204

Han JZ, Lin W, Lou SJ, Chen YZ, Norepinephrine-induced calcium mobilization in C6 glioma cells, 2002, *Acta Pharmacol Sin*, 23(6):490-6

Han JZ, Lin W, Lou SJ, Qiu J, Chen YZ, A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells, 2002, *Biochim Biophys Acta*, 1591(1-3):21-7

Hansen KB, Yuan H, Traynelis SF, Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation, 2007, *Curr Opin Neurobiol*, 17(3):281-8

Harauma A, Moriguchi T, Dietary n-3 fatty acid deficiency in mice enhances anxiety induced by chronic mild stress, 2011, *Lipids*, 46(5):409-16

Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM Jr, Youngblood BD, Ryan DH, Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status, 2002, *Am J Physiol Regul Integr comp Physiol*, 282(1):R77-88

Harris RB, Palmondon J, Leshin S, Flatt WP, Richard D, Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress, 2006, *Horm Behav*, 49(5):615-25

Harris RB, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH, Rats fed only during the light period are resistant to stress induced weight loss, 2002, *Physiol Behav*, 76(4-5):543-50

Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibahi Y, Oka J, Shido O, Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats, 2002, *J Neurochem*, 81(5):1084-91

Hashimoto M, Hossain S, Tanabe Y, Kawashima A, Harada T, Yano T, Mizuguchi K, Shido O, the protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta (1-40), 2009, *J Nutr Biochem*, 20(12):965-73

Haydon PG, Carmignoto G, Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling, 2006, *Physiol Rec*, 86(3):1009-31

Helland IB, Smith L, Blomen B, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA, Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age, 2008, *Pediatrics*, 122(2):e472-9

Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA, Maternal supplementation with very-long-chain n-3-fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age, 2003, *Pediatrics*, 111(1):e39-44

Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A, Neuroglia in neurodegeneration, 2010, *Brain Res Rev*, 63(1-2):189-211

Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA, Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes, 2010, *Nature*, 463(7278):232-6

Hercberg S, Preziosi P, Braincon S, Galan P, Triol I, Malvy D, Roussel AM, Favier A, A primary Prevention Trial Using Nutritional Doses of Antioxidant Vitamins and Minerals in Cardiovascular Diseases and Cancers in a General Population : The SU.VI.MAX Study – Design, Methods, and Participants Characteristics. *Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants*, 1998, *Control Clin. Trials*, 19(4) : 336-51

Herman JP, Cullinan WE, Morano MI, Akil H, Watson SJ, Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, 1995, *J Neuroendocrinol*, 7(6):475-82

Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL, Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors, 1998, *Neuroscience*, 86(2):449-59

Herman JP, Mueller NK, Role of the ventral subiculum in stress integration, 2006, *Behav Brain Res*, 174(2):215-24

Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H, Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, 2005, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(8):1201-13

Herman JP, Spencer R, regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo, 1998, *J Neurosci*, 18(18):7462-73

Hermanns E, Challiss RA, Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors, 2001, *Biochem J*, 359(Pt 3):465-84

Hill JE, Makky K, Shrestha L, Hillard CJ, Gasser PJ, Natural and synthetic corticosteroids inhibit uptake 2-mediated transport in CNS neurons, 2011, *Physiol Behav*, 104(2):306-11

Hill MN, Carrier EJ, Ho WS, Shi L, Patel S, Gorzalka BB, Hillard CJ, Prolonged glucocorticoid treatment decreases cannabinoid CB1 receptor density in the hippocampus, 2008, *Hippocampus*, 18(2):221-6

Hill MN, Ho WS, Meier SE, Gorzalka BB, Hillard CJ, Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in the rat amygdala, 2005, *Eur J Pharmacol*, 528(1-3):99-102

Hirrlinger J, Hülsmann S, Kirchhoff F, Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminal in situ, 2004, *Eur J Neurosci*, 20(8):2235-9

Holderbach R, Clark K, Moreau JL, Bischofberger J, Normann C, Enhanced long-term synaptic depression in an animal model of depression, 2007, *Biol Psychiatry*, 62(1):92-100

Hollmann M, Hartley M, Heinemann S, Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition, 1991, *Science*, 252(5007):851-3

Horrocks LA, Farooqui AA, Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function, 2004, *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids*, 70(4):361-72

Hotta M, Shibasaki T, Yamauchi N, Ohno H, Benoit R, Ling N, Demura H, The effects of chronic central administration of corticotrophin-releasing factor on food intake, body weight, and hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones, 1991, *Life Sci*, 48(15):1483-91

Hua Y, Sinha R, Martineau M, Kahms M, Klingauf J, A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion, 2010, *Nat Neurosci*, 13(12):1451-3

Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B, How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release, 2000, *Biochimie*, 82(5):427-46

Hunter RG, Bellani R, Bloss E, Costa A, McCarthy K, McEwen BS, regulation of kainite receptor subunit mRNA by stress and corticosteroid in the rat hippocampus, 2009, *PLoS One*, 4(1):e4328

Huynh TN, Krigbaum AM, Hanna JJ, Conrad CD, Sex difference and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behaviour, 2011, *Behav Brain Res*, 222(1):212-22

Iadecola C, Nedergaard M, Glial regulation of the cerebral microvasculature, 2007, *nat Neurosci*, 10(11):1369-76

Iio W, Matsukawa N, Tsukahara T, Kohari D, Toyoda A, Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade, 2011, *Neurosci Lett*, 504(3):281-4

Innis SM, Essential fatty acid transfer and fetal development, 2005, *Placenta*, 26 Suppl A:S70-5

Innis SM, Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development, 2004, *Adv Exp Med Biol*, 554:27-43

Ising M, Holsboer F, Genetics of stress response and stress-related disorders, 2006, *Dialogues Clin Neurosci*, 8(4):433-44

Itoi KJ, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ, Regulatory mechanisms of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus, 2004, *J Neuroendocrinol*, 16(4):348-55

Jacobson L, Sapolsky R, The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, 1991, *Endocr Rev*, 12(2):118-34

Jadavji NM, Supina RD, Metz GA, Blockade of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors reverses stress-induced motor impairments, 2011, *Neuroendocrinology*, 94(4):278-90

Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R, A review on animal models for screening potential anti-stress agents, 2011, *Neurol Sci*, 32(6):993-1005

Jang S, Suh SH, Yoo HS, Lee YM, Oh S, Changes in iNOS, GFAP and NR1 expression in various brain regions and elevation of sphingosine-1-phosphate in serum after immobilized stress, 2008, *Neurochem Res*, 33(5):842-51

Jankord R, Herman JP, Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress, 2008, *Ann NY Acad Sci*, 1148:64-73

Jarvis SE, Magga JM, Beedle AM, Braun JE, Zamponi GW, G protein modulation of N-type calcium is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma, 2000, *J Biol Chem*, 275(9):6388-94

Jauregui-Huerta F, Ruvalcaba-Delgadillo Y, Gonzalez-Castaneda R, Garcia-Estrada J, Gonzalez-Perez O, Luquin S, Responses of glial cells to stress and glucocorticoids, 2010, *Curr Immunol Rev*, 6(3):195-204

Jia Z, Moulson CL, Pei Z, Miner JH, Watkins PA, Fatty acid transport protein 4 is the principal very long chain fatty acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts, 2007, *J Biol Chem*, 282(28):20573-83

Joardar A, Das S, Effect of fatty acids isolated from edible oils like mustard, linseed or coconut on astrocytes maturation, 2007, *Cell Mol Neurobiol*, 27(8):973-83

Joardar A, Sen AK, Das S, Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and beta-adrenergic transmission in astrocytes, 2006, *J Lipid Res*, 47(3):571-81

Joëls M, Karst H, Corticosteroid effects on calcium signalling in limbic neurons, 2011, *Cell Calcium*

Judge MP, Harel O, Lammi-Keefe CJ, A docosahexaenoic acid-functional food during pregnancy benefits infant visual acuity at four but not six months of age, 2007, *Lipids*, 42(2):117-22

Judge MP, Harel O, Lammi-Keefe CJ, Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo, 2007, *Am J Clin Nutr*, 85(6):1572-7

Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, Omote H, Moriyama Y, Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries, 2006, *J Biol Chem*, 281(51):39499-506

Jump DB, Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription, 2002, *Curr Opin Lipidol*, 13(2):155-64.

Jump DB, N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription, 2008, *Curr Opin Lipidol*, 19(3):242-7

Kageyama K, Suda T, Regulatory mechanisms underlying corticotrophin-releasing factor gene expression in the hypothalamus, 2009, *Endocr J*, 56(3):335-44

Kalman D, Gomperts SN, Hardy S, Kitamura M, Bishop JM, Ras family GTPases control growth of astrocytes processes, 1999, *Mol Biol Cell*, 10(5):1665-83

Kalueff AV, Measuring grooming in stress and comfort, 2000, *Proc Meas Behav*, 3:151-8

Kalueff AV, Tuohimaa P, The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research, 2005, *J Neurosci Methods*, 143(2):169-77

Kalueff AV, Tuohimaa P, Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research, 2004, *Brain Res Brain Res Protoc*, 13(3):151-8

Kalynchuk LE, Gregus A, Boudreau D, Perrot-Sinal TS, Corticosterone increases depression-like behaviour, with some effects on predator odor-induced defensive behaviour, in male et female rats, 2004, *Behav Neurosci*, 118(6):1365-77

Kaneko T, Fujiyama F, Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system, 2002, *Neurosci Res*, 42(4):243-50

Karr JE, Alexander JE, Winningham RG, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: A review, 2011, *Nutr Neurosci*, 14(5):216-25

Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M, Mineralocorticoid receptor are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(52):19204-7

Karst H, Joëls M, Brief RU 38486 treatment normalizes the effects of chronic stress on calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons, 2007, *Neuropsychopharmacology*, 32(8):1830-9

Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van Essen L, Slagter E, Shinnick-Gallagher P, Joëls M, Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons, 2002, *Eur J Neurosci*, 16(6):1083-9

Katakura M, Hashimoto M, Shahdat HM, Gamoh S, Okui T, Marsuzaki K, Shido O, docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells, 2009, *Neuroscience*, 160(3):651-60

Katz B, The release of neural transmitter substances, 1969, Liverpool: Liverpool Univ Press

Kauer JA, Malenka RC, Synaptic plasticity and addiction, 2007, *Nat Rev Neurosci*, 8(11):844-58

Kavalali ET, Chung C, Khvotchev M, Leitz J, Nosyreva E, Raingo J, Ramirez DM, Spontaneous neurotransmission: an independent pathway for neuronal signalling?, 2011, *Physiology (Bethesda)*, 26(1):45-53

Kawasaki F, Zou B, Xu X, Ordway RW, Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of *Drosophila*, 2004, *J Neurosci*, 24(1):282-5

Kawashima A, Harada T, Kami H, Yano T, Imada K, Mizuguchi K, Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signalling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells, 2010, *J Nutr Biochem*, 21(4):268-77

Keith RK, Poage RE, Yokoyama CT, Catterall WA, Meriney SD, Bidirectional modulation of transmitter release by calcium channels/syntaxin interactions in vivo, 2007, *J Neurosci*, 27(2):265-9

Keller-Wood ME, Dallman MF, corticosteroid inhibition of ACTH secretion, 1984, *Endocr Rev*, 5(1):1-24

Kenney JW, Gould TJ, Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine, 2008, *Mol Neurobiol*, 38(1):101-21

Kessels HW, Malinow R, Synaptic AMPA receptor plasticity and behaviour, 2009, *Neuron*, 61(3):340-50

Khalili-Mahani N, Dedovic K, Engert V, Pruessner M, Pruessner JC, Hippocampal activation during a cognitive task is associated with subsequent neuroendocrine and cognitive responses to psychological stress, 2010, *Hippocampus*, 20(2):323-34

Kidd PM, Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids, 2007, *Altern Med Rev*, 12(3):207-27

Kim HW, Rao JS, Rapoport SI, Igarashi M, Dietary n-6 PUFA deprivation downregulates arachidonate but upregulates docosahexaenoate metabolizing enzymes in rat brain, 2011, *Biochim Biophys Acta*, 1811(2):111-7

Kim HW, Rao JS, Rapoport SI, Igarashi M, Regulation of rat brain polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism during graded dietary n-3 PUFA deprivation, 2011, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 85(6):361-8

Kim HY, Akbar M, Kim YS, Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signalling promoted by docosahexaenoic acid, 2010, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82(4-6):165-72

Kim JJ, Diamond DM, The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories, 2002, *Nat Rev Neurosci*, 3(6):453-62

Kimelberg HK, Nedergaard M, Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets, 2010, *Neurotherapeutics*, 7(4):338-53

Kimelberg HK, The problem of astrocytes identity, 2004, *Neurochem Int*, 45(2-3):191-202

Kinoshita A, Shigemoto R, Ohishi H, van der Puttent H, Mizuno N, Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study, 1998, *J Comp Neurol*, 393(3):332-52

Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, JAVasooriva AP, Halver JE, Puskas LG, Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(30):10931-6

Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C, Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm, 2004, *Ann NY Acad Sci*, 1018:323-7

Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis MN, Kittas C, Gender-dependent alterations in corticosteroid receptor status and spatial performance following 21 days of restraint stress, 2004, *Neuroscience*, 125(1):47-55

Kjaer MA, TOdorovic M, Torstensen BE, Vegusdal A, Ruyter B, Dietray n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon, 2008, *Lipids*, 43(9):813-27

Kleen JK, Sitomer MT, Killeen PR, Conrad CD, Chronic stress impairs memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore, 2006, *Behav Neurosci*, 120(4):842-51

Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M, The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3, 1991, *Cell*, 66(2):395-403

Kniazeff J, Bessis As, Maurel D, Ansanay H, Prézeau L, Pin JP, Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity, 2004, *Nat Struct Mol Biol*, 11(8):706-13

Knigge KM, Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdale, 1961, *Proc Soc Exp Biol Med*, 108:18-21

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

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, 2002, *J Lipid Res*, 43(8):1209-19

Koehler RC, Roman RJ, Harder DR, Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow, 2009, *Trends Neurosci*, 32(3):160-9

Komatsuzaki Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Mukai H, Tanabe N, Mitsuhashi K, Kawata M, Kimoto T, Ooishi Y, Kawato S, Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus, 2005, *Biochem Biophys Res Commun*, 335(4):1002-7

Kompagne H, Bardos G, Szenasi G, Gacsalyi I, Harsing LG, Levay G, Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats, 2008, *Behav Brain Res*, 193(2):311-4

Kondo H, Lavenex P, Amaral DG, Intrinsic connections of the macaque monkey hippocampal formation: I. Dentate gyrus, 2008, *J Comp Neurol*, 511(4):497-520

Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steiner T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E, Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept, 2011, *Neurosci Biobehav Rev*, 35(5):1291-301

Koponen E, Rantamaki T, Voikar V, Saarelainen T, MacDonald E, Castren E, Enhanced BDNF signalling is associated with antidepressant-like behavioural response and changes in brain monoamines, 2005, *Cell Mol Neurobiol*, 25(6):973-80

Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, Sakakibara M, Yoshimoto T, Guo J, Yamashita T, Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction, 2006, *Neurosci Res*, 56(2):159-64

Kreisman NR, Smith ML, Potassium-induced changes in excitability in the hippocampal CA1 region of immature and adult rats, 1993, *Brain Res Dev Brain Res*, 76(1):67-73

Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD, Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States, 2000, *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl):179S-88S

Krugers HJ, Goltstein PM, van der Linden S, Joëls M, Blockade of glucocorticoid receptors rapidly restores hippocampal CA1 synaptic plasticity after exposure to chronic stress, 2006, *Eur J Neurosci*, 23(11):3051-5

Krugers HJ, Alfarez DN, Karst H, Parashkouhi K, van Gemert N, Joëls M, Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions, 2005, 15(6):697-703

Kumar B, Kuhad A, Chopra K, Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioural and biochemical evidences, 2011, *Psychopharmacology (Berl)*, 214(4):819-28

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K, Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor, 2000, *Nature*, 407(6807):971-7

Kuperstein F, Eilam R, Yavin E, Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency, 2008, *J Neurochem*, 106(2):662-71

Kuroda Y, McEwen BS, Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus, 1998, *Brain Res Mol Brain Res*, 59(1):35-9

Kvamme E, Roberg B, Torgner IA, Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain, 2000, *Neurochem Res*, 25(9-10):1407-19

Kvamme E, Torgner IA, Roberg B, Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase, 2001, *J Neurosci*, 66(5):951-8

Kwon HB, Castillo PE, Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses, 2008, *Neuron*, 60(6):1082-94

Kye MJ, Spiess J, Blank T, Transcriptional regulation of intronic calcium-activated potassium channel SK2 promoters by nuclear factor-kappa B and glucocorticoids, 2007, *Mol Cell Biochem*, 300(1-2):9-17

Lafay L, Verger E, Les apports en lipids d'origine animale de la population française : résultats de l'étude INCA2, *OCL*, 2010, 17(1) : 17-21

Lafourcade M, Elezgarai I, MAtto S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ, Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex, 2007, *PLoS One*, 2(8):e709

Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Layé S, Manzoni OJ, Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions, 2011, *Nat Neurosci*, 14(3):345-50

Lambert DG, Whitham EM, Baird JG, Nahorski SR, Different mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry induced by depolarization and muscarinic receptor stimulation in SH\_SY5Y human neuroblastoma cells, 1990, *Brain Res Mol Brain Rs*, 8(3):263-6

Lang F, Mechanisms and significance of cell volume regulation, 2007, *J Am Coll Nutr*, 26(5 Suppl):613S-623S

Lang T, SNARE proteins and 'membrane rafts', 2007, *J Physiol*, 585(Pt 3):693-8

Langelier B, Alessandri JM, perruchot MH, Guesnet P, LAvalle M, Changes of the transcriptional and fatty acid profiles in response to n-3 fatty acids in SH\_SY5Y neuroblastoma cells, 2005, *Lipids*, 40(7):719-28

Langelier B, Furet JP, Perruchot MH, Alessandri JM, Docosahexaenoic acid membrane content and mRNA expression of acyl-CoA oxidase and of peroxisome proliferator-activated receptor-delta are modulated in Y79 retinoblasoma cells differently by low and high doses of alpha-linolenic acid, 2003, *J Neurosci Res*, 74(1):134-41

Lapillone A, Clarke SD, Heird WC, Polyunsaturated fatty acids and gene expression, 2004, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7(2):151-6

Larqué E, Demmelmair H, Berger B, Hasbargen U, Koletzko B, In vivo investigation of the placenta transfer of (13)C-labeled fatty acids in humans, 2003, *J Lipid Res*, 44(1):49-55

Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C, Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment, 2010, *J Psychiatr Res*, 44(13):808-16

Larsson C, Thomas AP, Hoek JB, Carbachol-stimulated Ca<sup>2+</sup> increase in single neuroblastoma SH-SY5Y cells: effects of ethanol, 1998, *Alcohol Clin Exp Res*, 22(3):637-45

Latham CF, Osborne SK, Cryle MJ, Meunier FA, Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc 18a, 2007, *J Neurochem*, 100(6):1543-54

Lau A, Tymianski M, Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration, 2010, *Pflugers Arch*, 460(2):525-42

Laugero KD, Smilowitz JT, German JB, Jarcho MR, Mendoza SP, Bales KL, Plasma omega 3 polyunsaturated fatty acid status and monounsaturated fatty acids are altered by chronic social

stress and predict endocrine responses to acute stress in titi monkeys, 2011, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 84(3-4):71-8

Lauri SE, Palmer M, Segerstrale M, Vesikansa A, Taira T, Collingridge GL, Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus, 2007, *Neuropharmacology*, 52(1):1-11

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, 2001, *Prog Lipid Res*, 40(1-2):1-94

Lavenex P, Amaral DG, Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity, 2000, *Hippocampus*, 10(4):420-30

Lavialle M, Aumann G, Anlauf E, Pröls F, Arpin M, Derouiche A, Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(31):12915-9

Layé S, Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being, 2010, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82(4-6):295-303

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL, Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity, 2000, *Nature*, 405(6789):955-9

Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R, Harris WS, Omega-3 fatty acids for cardioprotection, 2008, *Mayo Clin Proc*, 83(3):324-32

Lee KJ, Kim SJ, Kim SW, Choi SH, Shin YC, Park SH, Moon BH, Cho E, Lee MS, Choi SH, Chun BG, Shin KH, Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation of new-born cells in adult rat hippocampus, 2006, *Exp Mol Med*, 38(1):44-54

Lee LH, Tan CH, Shui G, Wenk MR, Ong WY, Role of prefrontal cortical calcium independent phospholipase A2 in antidepressant-like effect of maprotiline, 2011, *Int J Neuropsychopharmacol*, 11:1-12

Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ, Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study, 2009, *Neuroreport*, 20(17):1554-8

Legrand P, Comment augmenter l'apport nutritionnel en acides gras n-3 ?, 2004, *OCL*, 11(1) : 50-4

Legrand P, Les acides gras : structure, fonction, apports nutritionnels conseillés, *Cahier Nutri Diététique*, 42(HS1) :7-12

Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, BDNF evokes release of endogenous cannabinoids at layer 2/3 inhibitory synapses in the neocortex, 2010, *J Neurophysiol*, 104(4):1923-32

Lepsch LB, Gonzalo LA, Magro FJ, Delucia R, Scavone C, Planeta CS, Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats, 2005, *Addict Biol*, 10(3):251-6

Lesa GM, Palfreyman M, hall DH, CLandinin MT, Rudolph C, Jorgensen EM, Schiavo G, Long chain polyunsaturated fatty acids are required for efficient neurotransmission in *C. Elegans*, 2003, *J Cell Sci*, 116(Pt 24):4965-75

Leslie CC, Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2, 2004, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(4):373-6

Levant B, Ozias MK, Carlson SE, Sex-specific effects of brain LC-PUFA composition on locomotor activity in rats, 2006, *Physiol Behav*, 89(2):196-204

Levant B, Ozias MK, Carlson SE, Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet, 2007, *J Nutr*, 137(1):130-4

Levant B, Ozias MK, Davis PF, Winter M, Russell KL, Carlson SE, Reed GA, Mc Carson KE, Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: interactions with reproductive status in female rats, 2008, *Psychoneuroendocrinology*, 33(9):1279-92

Levant B, Zarcone TJ, Fowler SC, Developmental effects of dietary n-3 fatty acids on activity and response to novelty, 2010, *Physiol Behav*, 101(1):176-83

Levy LM, Warr O, Attwell D, Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake, 1998, *J Neurosci*, 18(23):9620-8

Li H, Zhang L, Huang Q, Differential expression of mitogen-activated protein kinase signalling pathway in the hippocampus of rats exposed to chronic unpredictable stress, 2009, *Behav Brain Res*, 205(1):32-7

Li XH, Liu NB, Zhang MH, Zhou YL, Liao JW, Liu XQ, Chen HW, Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats, 2007, *Chin Med J (Engl)*, 120(8):669-74

Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK, Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR delta, 1999, *Genes Dev*, 13(12):1561-74

Lim SY, Hoshiba J, Salem N Jr, An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance, 2005, *J Neurochem*, 95(3):848-57

Lin J, Cai W, Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis, 2004, *J Neurotrauma*, 21(11):1671-82

Lin PY, Huang SY, Su KP, A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression, 2010, *Biol Psychiatry*, 68(2):140-7

Liperoti R, Landi F, Fusco O, Bernabei R, Onder G, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence, 2009, *Curr Pharm Des*, 15(36):4165-72

Lisman J, Raghavachari S, A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses, 2006, *Sci STKE*, 2006(356):re11

Lisman J, Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis, 2003, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):829-42

Lisman J, Schulman H, Cline H, The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory, 2002, *Nat Rev Neurosci*, 3(3):175-90

Litman BJ, Niu SL, Polozova A, Mitchell DC, The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction, 2001, *J Mol Neurosci*, 16(2-3):237-42

Liu HH, Payne HR, Wang B, Brady ST, gender differences in response of hippocampus to chronic glucocorticoid stress: role of glutamate receptors, 2006, *J Neurosci Res*, 83(5):775-86

Liu L, Barrett CF, Rittenhouse AR, Arachidonic acid both inhibits and enhances whole cell calcium currents in rat sympathetic neurons, 2001, *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(5):C1293-305

Liu L, Rittenhouse AR, Effects of arachidonic acid on unitary calcium currents in rat sympathetic neurons, 2000, *J Physiol*, 525(Pt2):391-404

Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC, Glia Atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture, 2011, *J Affect Disord*, 128(3):309-13

Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A, GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes, 2006, *Glia*, 54(5):394-410

Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method, 2001, *Methods*, 25(4):402-8

Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Ramirez MJ, De Kloet ER, Viveros MP, Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats, 2011, *J Neuroendocrinol*, 23(4):329-44

Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK, Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus, 1993, *J Neurochem*, 61(5):1957-60

Lu Y, Christian K, Lu B, BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?, 2008, *Neurobiol Learn Mem*, 89(3):312-23

Lucas DR, Newhouse JP, The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, 1957, *AMA Arch Ophthalmol*, 58(2):193-201

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Pereira JG, Stertz L, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J, Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels, 2008, *Curr Neurovasc Res*, 5(4):207-13

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J, Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain, 2009, *Neurochem Int*, 54(5-6):358-62

Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP, Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation, 2011, *Brain Res Bull*, 85(1-2):2-8

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, 2005, *J Clin*, 115(10):2774-83

Lundy DF, Mc Bean GJ, Inhibition of the high-affinity uptake of D-[3H]aspartate in rat by L-alpha-amino adipate and arachidonic acid, 1996, *J Neurol Sci*, 139 Suppl:1-9

Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE, The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the fields of brain and cognition, 2007, *Brain Cogn*, 65(3):209-37

Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C, Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition, 2009, *Nat Rev Neurosci*, 10(6):434-45

Lüscher C, Huber KM, Group 1 mGluR-dependant synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease, 2010, *Neuron*, 65(4):445-59

Lynch MA, Long-term potentiation and memory, 2004, *Physiol Rev*, 84(1):87-136

Madani S, Hichami A, LEgrand A, Bellville J, Khan NA, Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C, 2001, *FASEB J*, 15(14):2595-601

Madrigal JL, Moro MA, Lozasoin I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC, Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain, 2003, *Neuropsychopharmacology*, 28(9):1579-88

Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M, Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors, 2001, *Neuron*, 31(3):463-75

Magarinos AM, McEwen BS, Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors, 1995, *Neuroscience*, 69(1):89-98

Magarinos AM, Verdugo JM, Mc Ewen BS, Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(25):14002-8

Maggio N, Segal M, Corticosteroid regulation of synaptic plasticity in the hippocampus, 2010, *Scientific World Journal*, 10:462-

Magistretti PJ, Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling, 2009, *Am J Clin Nutr*, 90(3):875S-880S

Magleby KL, Modal gating of NMDA receptors, 2004, *Trends Neurosci*, 27(5):231-3

Maison P, Walker DJ, Walsh FS, Williams G, Doherty P, BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids, 2009, *Neurosci Lett*, 467(2):90-4

Makrides M, Collins CT, Gibson RA, Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans, 2011, *Matern Child Nutr*, 7(Suppl 2):80-8

Malberg JE, Duman RS, Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment, 2003, *Neuropsychopharmacology*, 28(9):1562-71

Malenka RC, Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking, 2003, *Ann NY Acad Sci*, 1003:1-11

Marin MT Cruz FC, Planeta CS, Chronic restraint or variable stresses differently affect the behaviour, corticosterone secretion and body weight in rats, 2007, *Physiol Behav*, 90(1):29-35

Marini P, Moriello AS, Cristino L, Palmery M, De Petrocellis L, Di Marzo V, Cannabinoid CB1 receptor elevation of intracellular calcium in neuroblastoma SH-SY5Y cells: interactions with muscarinic and delta-opioid receptors, 2009, *Biochim Biophys Acta*, 1793(7):1289-303

Marks W, Fournier NM, Kalynchuk LE, Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behaviour in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength, 2009, *Physiol Behav*, 98(1-2):67-72

Marszalek JR, Lodish HF, Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins and neuronal function: breastmilk and fish are good for you, 2005, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:633-57

Martin DS, Spencer P, Horrobin DF, Lynch MA, Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed, 2002, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(2-3):121-30

Martin R, Iadecola C, Bartolome-Martin D, Torres M, Sanchez-Prieto J, the inhibition of release by mGlu7 receptors is independent of the Ca<sup>2+</sup> channel type but associated to GABAB and adenosine A1 receptors, 2008, *Neuropharmacology*, 55(4):464-73

Martin R, Torres M, Sanchez-Prieto J, mGluR7 inhibits glutamate release through a PKC-independent decrease in the activity of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels and by diminishing cAMP in hippocampal nerve terminals, 2007, *Eur J Neurosci*, 26(2):312-22

Martin S, Henley JM, Holman D, Zhou M, Wiegert O, van Spronsen M, Joëls M, Hoogenraad CC, Krugers HJ, Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity, 2009, *PLoS One*, 4(3):e4714

Martin SJ, Clark RE, The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems, 2007, *Cell Mol Life Sci*, 64(4):401-31

Marza E, Lesa GM, Polyunsaturated fatty acids and neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*, 2006, *Biochem Soc Trans*, 34(Pt1):77-80

Marza E, Long T, Sajardi A, Sumakovic M, Eimer S, Hall DH, Lesa GM, Polyunsaturated fatty acids influence synaptotagmin localization to regulate synaptic vesicle recycling, 2008, *Mol Biol Cell*, 19(3):833-42

Mateo JM, Inverted-U shape relationship between cortisol and learning in ground squirrels, 2008, *Neurobiol Learn Mem*, 89(4):582-90

Mathieu G, Denis S, Langelier B, Denis I, Laviolle M, Vancassel S, DHA enhances the noradrenaline release by SH-SY5Y cells, 2010, *Neurochem Int*, 56(1):94-100

Mathieu G, Denis S, Laviolle M, Vancassel S, Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats, 2008, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 78(6):391-401

Mathieu G, Oualian C, Denis I, Laviolle M, Gisuquet-Verrier P, Vancassel S, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats, 2011, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 85(3-4):129-36

Matias I, Carta G, Murru E, Petrosino S, Banni S, Di MARzo V, Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes, 2008, *Biochim Biophys Acta*, 1781(1-2):52-60

Matsuzawa A, Murakami M, Atsumi G, Imai K, Prados P, Inoue K, Kudo I, Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion, 1996, *J Biochem*, 318(Pt2):701-9

Maximov A, Shin OH, Liu X, Südhof TC, Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release, 2007, *J Cell Biol*, 176(1):113-24

McEwen BS, Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain, 2007, *Physiol Rev*, 87(3):873-904

McEwen BS, Protective and damaging effects of stress mediators, 1998, *N Engl J Med*, 338(3):171-9

McEwen BS, The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance, 2000, *Brain Res*, 886(1-2):172-89

McGaugh JL, Roozendaal B, Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain, 2002, *Curr Opin Neurobiol*, 12(2):205-10

McKenna, The Glutamate-Glutamine Cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain, 2007, *J Neurosci Res*, 85(15):3347-3358

McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD, The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms, 2007, *Brain Res*, 1161:56-64

McNamara RK, 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(4-5) : 329-49

Meller E, Shen C, Nikolao TA, Jensen C, Tsimberg Y, Chen J, Gruen RJ, Region-specific effects of acute and repeated restraint stress on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases, 2003, *Brain Res*, 979(1-2):57-64

Metea MR, Newman EA, Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling, 2006, *J Neurosci*, 26(11):2862-70

Meves H, Arachidonic acid and ion channels: an update, 2008, *Br J Pharmacol*, 155(1):4-16

Meyer BJ, Mann NJ, Lawis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR, Dietary intakes and food sources of omea-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids, 2003, *Lipids*, 38(4):391-8

Michaevlevski I, Korngreen A, Lotan I, Interaction of syntaxin with a single Kv1.1 channel: a possible mechanism for modulating neuronal excitability, 2007, *Pflugers Arch*, 454(3):477-94

Middelcorp J, Hol EM, GFAP in health and disease, 2011, *Prog Neurobiol*, 93(3):421-43

Milger K, Herrmann T, Becker C, Gotthardt D, Zickwolf J, Eehalt R, Watkins PA, Stremmel W, Füllekrug J, Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-lcalized acyl-CoA synthetase FATP4, 2006, *J Cell Sci*, 119(Pt 22):4678-88

Millan C, Lujan R, Shigemoto R, Sanchez-Prieto J, The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and cAMP: evidence for a strong reduction of Ca<sup>2+</sup> entry in single nerve terminals, 2002, *J Biol chem.*, 277(16):14092-101

Miracle AD, Brace MF, Huyck KD, Singler SA, Wellman CL, Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear, 2006, *Neurobiol Learn Mem*, 85(3):213-8

Mirescu C, Gould E, Stress and adult neurogenesis, 2006, *Hippocampus*, 16(3):233-8

Mitsukawa K, Mombereau C, Lötscher E, Uzunov DP, van der Putten H, Flor PJ, Cryan JF, Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes dysregulation of the HPA axis and increases hippocampal BDNF protein levels: implications for stress-related psychiatric disorders, 2006, *Neuropsychopharmacology*, 31(6):1112-22

Mitsukawa K, Yamamoto R, Ofner S, Nozulak J, Pescott O, Lulic S, Stoehr N, Mombereau C, Kuhn R, McAllister KH, van der Putten H, Cryan JF, Flor PJ, A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signalling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(51):18712-7

Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T, Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus, 2003, *Neuroscience*, 119(3):887-97

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T, Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats, 2001, *Psychoneuro-endocrinology*, 26(5):443-59

Monaghan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW, Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites, 1983, *Nature*, 306(5939):176-9

Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A, Cik M, van der Spek P, Kass S, Meert T, D'Hooge R, Rosenmund C, Hampson RM, Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain, 2006, *J Neurosci*, 26(46):12055-66

Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R, Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate, 1994, *Brain Res*, 655(1-2):251-4

Moore SA, Hurt E, Yoder E, Sprecher H, Spector AA, Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid, 1995, *J Lipid Res.*, 36(11):2433-43

Moore SA, Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro, 2001, *J Mol Neurosci*, 16(2-3):195-200

Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA, Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6), 1991, *J Neurochem*, 56(2):518-24

Moreira JD, Knorr L, Ganzella M, Thomazi AP, de Souza CG, d Souza DG, Pitta CF, Mello e Souza T, Wofchuk S, Elisabetsky E, Vinadé L, Perry ML, Souza DO, Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behaviour alterations, 2010, *Neurochem Int*, 56(6-7):753-9

Moriguchi T, Greiner RS, Salem N Jr, Behavioral effects associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration, 2000, *J Neurochem*, 75(6):2563-73

Moriguchi T, Salem N Jr, Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance, 2003, *J Neurochem*, 87(2):297-309

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J, Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease, 2003, *Arch Neurol*, 60(7):940-6

Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS, Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study, 2005, *Arch Neurol*, 62(12):1849-53

Morris R, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, 1984, *J Neurosci Methods*, 11(1):47-60

Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH, D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor, 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(9):4926-31

Moult PR, Gladding CM, Sanderson TM, Fitzjohn SM, Sahir Z, Molnar E, Collingridge GL, Tyrosine Phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression, 2006, *J Neurosci*, 26(9):2544-54

Müller HK, Wegener G, Popoli M, Elfving B, Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus, 2011, *Brain Res*, 1385:26-37

Mulligan SJ, MacVicar BA, calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions, 2004, *Nature*, 431(7005):195-9

Murphy NP, Ball SG, Vaughan PF, Potassium- and carbachol-evoked release of [3H]noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, 1991, *J Neurochem*, 56(5):1810-5.

Murthy M, Hamilton J, Greiner RS, Moriguchi T, Salem N Jr, Kim HY, Differential effects of n-3 fatty acid deficiency on phospholipid molecular species composition in the rat hippocampus, 2002, *J Lipid Res*, 43(4):611-7

Musholt K, Cirillo G, Cavaliere C, Rosaria Bianco M, Bock J, Helmeke C, Braun K, Papa M, Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex, 2009, *Dev Neurobiol*, 69(4):203-11

Myers KM, Davis M, Mechanisms of fear extinction, 2007, *Mol Psychiatry*, 12(2):120-50

Naert G, Ixart G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L, Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress, 2011, *Mol Cell Neurosci*, 46(1):55-66

Nair A, Vadodaria KC, Banerjee SB, Benekareddy M, Dias BG, Duman RS, Vaidya VA, Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus, 2007, *Neuropsychopharmacology*, 32(7):1504-19

Nakai Y, Usui T, Tsukada T, Takahashi H, Fukata J, Fukushima M, Senoo K, Imura H, Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription, 1991, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40(1-3):301-6

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA, New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain, 2003, *trends neurosci*, 26(10):523-30

Nettleton JA, Katz R, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review, 2005, *J Am Diet Assoc*, 105(3):428-40

Nguyen PV, Woo NH, Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases, 2003, *Prog Neurobiol*, 71(6):401-37

Nichols NR, Osterburg HH, Masters JN, Millar SL, Finch CE, Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment, 1990, *Brain Res Mol Brain Res*, 7(1):1-7

Nicoll RA, Schmitz D, Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses, 2005, *Nat Rev Neurosci*, 6(11):863-76

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP, Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain, 1997, *J Neurosci*, 17(1):171-80

Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S, The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?, 2006, *J Neurochem*, 98(4):1007-18

Nieuwenhuizen AG, Rutters F, The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance, 2008, *Physiol Behav*, 94(2):169-77

Nishi M, Kawata M, Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging, 2006, *Neuroscientist*, 12(2):119-33

Nishizuka Y, The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, 1984, *Nature*, 308(5961):693-8

Niswender CM, Conn PJ, Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology and disease, 2010, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50:295-322

Niu SL, Mitchell DC, Lim SY, Wen ZM, Kim HY, Salem N Jr, Litman BJ, Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency, 2004, *J Biol Chem*, 279(30):31098-104

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A, Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons, 1984, *Nature*, 307(5950):462-5

O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS, Glucocorticoids regulate the concentration of glial fibrillary acidic protein throughout the brain, 1989, *Brain Res*, 494(1):159-61

O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS, Glucocorticoids regulation the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury, 1991, *J Neurochem*, 57(3):860-9

O'Connor RM, Finger BC, Flor PJ, Cryan JF, Metabotropic glutamate receptor 7: at the interface of cognition and emotion, 2010, *Eur J Pharmacol*, 639(1-3):123-31

O'Mahony CM, Clarke G, Gibney S, Dinan TG, Cryan JF, Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression, 2011, *Pharmacol Biochem Behav*, 97(4):690-9

Obara M, Szeliga M, Albrecht J, Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses, 2008, *Neurochem Int*, 52(6):905-19

Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M, Astrocytic complexity distinguishes the human brain, 2006, *Trends Neurosci*, 29(10):547-53

Ohl F, Michaelis T, Vollmann-Honsdorf GK, Kirschbaum C, Fuchs E, Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews, 2000, *Psychoneuroendocrinology*, 25(4):357-63

Oliet SH, Mothet JP, Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine, 2009, *Neuroscience*, 158(1):275-83

Olijslagers JE, de Kloet ER, Elgersma Y, van Woerden GM, Joëls M, Karst H, rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors, 2008, *Eur J Neurosci*, 27(10) :2542-50

Ollis TE, Meyer BJ, Howe PR, Australian food sources and intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids, 1999, *Ann Nutr Metab*, 43(6):346-55

Olney JW, Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, 1969, *Science*, 164(880):719-21

Omote H, Mivaii T, Juge N, Morivama Y, Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport, 2011, *Biochemistry*, 50(25):5558-65

Ong WL, Jiang B, Tang N, Ling SF, Yeo JF, Wei S, Farooqui AA, Ong WY, Differential effects of polyunsaturated fatty acids on membrane capacitance and exocytosis in rat pheochromocytoma-12 cells, 2006, *Neurochem Res*, 31(1):41-8

Orlowski D, Elfving B, Müller HK, Wegener G, Bjarkam CR, Wistar rats submitted to chronic restraint stress display increased hippocampal spine density paralleled by increased expression levels of synaptic scaffolding proteins, 2011, *Stress*

Orr SK, Bazinet RP, The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation, 2008, *Curr Opin Investig Drugs*, 9(7):735-43

Orr SP, Lasko NB, Shalev AY, Pitman RK, Physiologic responses to loud tones in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder, 1995, *J Abnorm Psychol*, 104(1):75-82

Orrego F, Villanueva S, The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization, 1993, *Neuroscience*, 5-(3):539-55

Ou XM, Partoens PM, Wang JM, Walker JH, Danks K, Vaughan PF, De Potter WP, The storage of noradrenaline, neuropeptide Y and chromogranins in and stoichiometric release from large dense cored vesicles of the undifferentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, 1998, *Int J Mol Med*, 1(1):105-12

Oualian C, Gisquet-Verrier P, The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioural flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task, 2010, *Learn Mem*, 17(12):654-68

Pahlman S, Mamaeva S, Meyerson G, Mattson ME, Bjelfman C, Ortoft E, Hammerling U, Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function, 1990, *Acta Physiol Scand Suppl*, 592:25-37

Palmer CL, Cotton L, Henley JM, The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors, 2005, *Pharmacol Rev*, 57(2):253-77

Palucha A, Pilc A, Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs, 2007, *Pharmacol Ther*, 115(1):116-47

Pan JP, Zhang HQ, Wei-Wang, Guo YF, Na-Xiao, Cao XH, Liu LJ, Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhances spatial memory in rats, 2011, *Brain Res*, 1412:18-27

Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, TOuquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH, Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory, 2006, *Cell*, 125(4):775-84

Pang ZP, Südhof TC, Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis, 2010, *Curr Opin Cell Biol*, 22(4):496-505

Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Sykova E, Rouach N, Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(20):8467-72

Paoletti P, Molecular basis of NMDA receptor functional diversity, 2011, *Eur J Neurosci*, 33(8):1351-65

Papadimitriou A, Priftis KN, regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, 2009, *Neuroimmunomodulation*, 16(5):265-71

Parpura V, Zorec R, Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes, 2010, *Brain Res Rev*, 63(1-2):83-92

Pasinetti Gm, Cheng HW, Morgan DG, Lampert-Etchells M, McNeill TH, Finch CE, Astrocytic messenger RNA responses to striatal deafferentation in mal rat, 1993, *Neuroscience*, 53(1):199-211

Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP, Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis, 2000, *Brain Res Mol Brain Res*, 80(2):142-52

Pasquariello N, Catanzaro G, Marzano V, Amadio D, Barcaroli D, Oddi S, Federici G, Urbani A, Finazzi Agro A, Maccarone M, Characterization of the endocannabinoid system in human neuronal cells and proteomic analysis of anadamide-induced apoptosis, 2009, *J Biol Chem*, 284(43):29413-26

Pasricha N, Joëls M, Karst H, rapide effects of corticosterone in the mouse dentate gyrus via a non genomic pathway, 2011, *J Neuroendocrinol*, 23(2):143-7

Patel S, Hillard CJ, Adaptations in endocannabinoid signalling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation, 2008, *Eur J Neurosci*, 27(11):2821-9

Patel S, Kingsley PJ, Mackie K, Marnett LJ, Winder DG, Repeated homotypic stress elevates 2-arachidoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signalling at inhibitory synapses in basolateral amygdale, 2009, *Neuropsychopharmacology*, 34(13):2699-709

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ, Endocannabinoid signalling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, 2004, *Endocrinology*, 145(12):5431-8

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ, Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling, 2005, *Eur J Neurosci*, 21(4):1057-69

Pavlidis C, Nivon LG, McEwen BS, Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation, 2002, *Hippocampus*, 12(2):245-57

Pavlidis C, Watanabe Y, McEwen BS, Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation, 1993, *Hippocampus*, 3(2):183-92

Pawlak R, Rao BS, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, Strickland S, Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(50):18201-6

Pekny M, Pekna M, Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration, 2004, *J Pathol*, 204(4):428-37

Pelkey KA, Lavezzari G, Racca C, Roche KW, McBain CJ, mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition, 2005, *Neuron*, 46(1):89-102

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, 2007, *Glia*, 55(12):1251-62

Pellerin L, Magistretti PJ, Excitatory amino acids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via an activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, 1996, *Dev Neurosci*, 18(5-6):336-42

Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ, Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle, 1998, *Dev Neurosci*, 20(4-5):291-9

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Wellman CL, Characteristics of BDNF-induced weight loss, 1995, *Exp Neurol*, 131(2):229-38

Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B, Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory, 2011, *Mol Biol Rep*, 38(1):453-60

Perea G, Araque A, GLIA modulates synaptic transmission, 2010, *Brain Res Rev*, 63(1-2):93-102

Perez-Branguli F, Muhaisen A, Blasi J, Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrids system assay, 2002, *Mol Cell Neurosci*, 20(2):169-80

Perica MM, Delas I, Essential fatty acids and psychiatric disorders, 2011, *Nutr Clin Pract*, 26(4):409-25

Pervanidou P, Chrousos GP, Stress and behaviour: the role of nutrients with emphasis on omega-3 fatty acids, 2011, *World Rev Nutr Diet*, 102:44-52

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), 2000, *Mol Cell Biol*, 20(14):5119-28

Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ, The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations, 1996, *Neuroscience*, 71(4):949-76

Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS, Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus, 2003, *Eur J Neurosci*, 17(4):879-86

Pifferi F, Roux F, Langelier B, Alessandri JM, Vancassel S, Jouin M, Laviolle M, Guesnet P, (n-3) polyunsaturated fatty acid deficiency reduces the expression of both isoforms of the brain glucose transporter GLUT1 in rats, 2005, *J Nutr*, 135(9):2241-6

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(4):619-34

Pongrac JL, Slack PJ, Innis SM, Dietary polyunsaturated fat that is low in (n-3) and high in (n-6) fatty acids alters the SNARE protein complex and nitrosylation in rat hippocampus, 2007, *J Nutr*, 137(8):1852-6

Popoli M, Yan Z, Mc Ewen BS, Sanacora G, The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission, 2011, *Nat Rev Neurosci*

Potier B, Billard JM, Rivière S, Sinet PM, Denis I, Champeil-Potokar G, Grintal B, Jouvenceau A, Kollen M, Dutar P, Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats, *Aging Cell*, 2010, 9(5):722-35

Prut L, Belzung C, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, 2003, *Eur J Pharmacol*, 463(1-3):3-33

Pussard E, Guigueno N, Adam O, Giudicelli JF, Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood and urine, *Clin. Chem.*, 1996, 42(7):1086-91

Qiu J, Lou LG, Huang XY, Lou SJ, Pei G, Chen YZ, Non genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C, 1998, *Endocrinology*, 139(12):5103-8

Qiu S, Champagne DL, Peters M, Catania EH, Weeber EJ, Levitt P, Pimenta AF, Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit, 2010, *Biol Psychiatry*, 68(2):197-204

Radecki DT, Brown LM, Martinez J, Teyler TJ, BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP, 2005, *Hippocampus*, 15(2):246-53

Rademacher DJ, Hillard CJ, Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward, 2007, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31(3):633-41

Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahan A, Hillard CJ, Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum and medial prefrontal cortex in mice, 2008, *Neuropharmacology*, 54(1):108-16

Ramirez DM, Kavalali ET, Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses, 2011, *Curr Opin Neurobiol*, 21(2):275-82

Ramkumar K, Srikumar BN, Shankaranarayana Rao BS, Raju TR, Self-Stimulation rewarding experience restores stress-induced CA3 dendritic atrophy, spatial memory deficits and alterations in the levels of neurotransmitters in the hippocampus, 2008, *Neurochem Res*, 33(9):1651-62

Rao JS, Erley 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, 2007, *Mol Psychiatry*, 12(2):151-7

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, 2007, *Mol Psychiatry*, 12(1):36-46

Rapoport SI, Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease, 2008, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 79(3-5):153-6

Rapoport SI, Rao IS, Igarashi M, Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver, 2007, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(5-6):251-61

Ray A, Prefontaine KE, Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(2):752-6

Reagan LP, Rosell DR, Wood GE, Spedding M, Munoz C, Rothstein J, McEwen BS, Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(7):2179-84

Regev N, Degani-Katzav N, Korngreen A, Etzioni A, Siloni S, Alaimo A, Chikvashvili D, Villarroel A, Attali B, Lotan I, Selective interaction of syntaxin 1<sup>a</sup> with KCNQ2: possible implications for specific modulation of presynaptic activity, 2009, *PloS One*, 4(8):e6586

Reich CG, Taylor ME, McCarthy MM, Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats, 2009, *Behav brain Res*, 203(2):264-9

Reichenbach A, Derouiche A, Kirchoff F, Morphology and dynamics of perisynaptic glia, 2010, *Brain Res Rev*, 63(1-2):11-25

Reul JM, de Kloet ER, Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation, 1985, *Endocrinology*, 117(6):2505-11

Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I, NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?, 2011, *Neuron*, 70(4):661-73

Richmond J, Synaptic function, 2005, *Wormbook*, 30:1-14

Rickman C, Davlevtov B, Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18, 2005, 12(5):545-53

Riedel G, Platt B, Micheau J, Glutamate receptor function in learning and memory, 2003, *Behav Brain Res*, 140(1-2):1-47

Rizo J, SNARE function revisited, 2003, *Nat Struct Biol*, 10(6):417-9

Rizzoli SO, Betz, WJ, Synaptic vesicle pools, 2005, *Nat Rev Neurosci*, 6(1):57-69

Robitaille R, Adler EM, Charlton MP, Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses, 1990, *Neuron*, 5(6):773-9

Rodriguez-Moreno A, Sihra TS, Metabotropic actions of kainite receptors in the control of glutamate release in the hippocampus, 2011, *Adv Exp Med Biol*, 717:39-48

Rohrbough J, Broadie K, Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle, 2005, *Nat Rev Neurosci*, 6(2):139-50

Romeo RD, Ali FS, Karatsoreos IN, Bellani R, Chhua N, Vernoc M, McEwen BS, Glucocorticoid receptor mRNA expression in the hippocampal formation of male rats before and after pubertal development in response to acute or repeated stress, 2008, *Neuroendocrinology*, 87(3):160-7

Rosa AO, Rapoport SI, Intracellular- and extracellular-derived Ca<sup>2+</sup> influence phospholipase A<sub>2</sub>-mediated fatty acid release from brain phospholipids, 2009, *Biochim Biophys Acta*, 1791(8):697-705

Rosas-Vargas H, Martinez-Ezquerro JD, Beinvenu T, Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation and obesity, 2011, *Arch Med Res*, 42(6):482-94

Rose EM, Koo JC, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR, Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase, 2009, *J Neurosci*, 29(25):8143-55

Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP, An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism, 2001, *Curr Biol*, 11(23):1847-57

Rosenbrock H, Koros E, Bloching A, Podhorna J, Borsini F, Effect of chronic intermittent restraint stress on hippocampal expression of marker proteins for synaptic plasticity and progenitor cell proliferation in rats, 2005, *Brain Res*, 1040(1-2):55-63

Ross BM, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders, 2009, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81(5-6):309-12

Rossi D, Volterra A, Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration, 2009, *Brain Res Bull*, 80(4-5):224-32

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF, Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, 1996, *Neuron*, 16(3):675-86

Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW, Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of a slow neurotoxicity, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14):6591-5

Rouach N, Avignone E, Mème W, Koulakoff A, venance L, Blomstrand F, Giaume C, Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system, 2002, *Biol Cell*, 94(7-8):457-75

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C, Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission, 2008, *Science*, 322(5907):1551-5

Rozovsky I, Laping NJ, Krihn K, Teter B, O'Callaghan JP, Finch CE, Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein by corticosterone in rat astrocytes in vitro is influenced by the duration of time in culture and by astrocytes-neuron interactions, 1995, *Endocrinology*, 136(5):2066-73

Rubenstein NM, Guan Y, Woo PL, Firestone GL, Glucocorticoid down-regulation of RhoA is required for the steroid-induced organization of the junctional complex and tight junction formation in rat mammary apithelial tumor cells, 2003, *J Biol Chem*, 278(12):10353-60

Rush AM, Wu J, Rowan MJ, Anwyl R, Group I metabotropic glutamate receptor (mGluR)-dependent long-term depression mediated via p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by previous high-frequency stimulation and activation of mGluRs and protein kinase C in the rat dentate gyrus in vitro, 2002, *J Neurosci*, 22(14):6121-8

Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Veck M, Tvzicka E, Bryhn M, Kopecky J, Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue, 2004, *Lipids*, 39(12):1177-85

Ryan AS, Astwood JD, Gautier S, Kuratko CN, Nelson EB, Salem n Jr, Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment in childhood: a review of human studies, 2010, *Prostaglandins Leukot Essent fatty Acids*, 82(4-6):305-14

Salaün C, James DJ, Chamberlain LH, Lipid rafts and the regulation of exocytosis, 2004, *Traffic*, 5(4):255-64

Salehi B, Cordero MI, Sandi C, Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited, 2010, *Learn Mem*, 17(10):522-30

Salem Jr., N., Kim, H.-Y., Yergey, J.A., 1986. Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. In: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. (Eds.), *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Academic Press, New York, pp. 319–351

Sampath H, Ntambi JM, Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression, 2004, *Nutr Rev*, 62(9):333-9

Sandi C, Davies HA, Cordero MI, Rodriguez JJ, Popov VI, Stewart MG, Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training, 2003, *Eur J Neurosci*, 17(11):2447-56

Sandi C, Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes, 2011, *Trends Neurosci*, 34(4):165-76

Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K, Venero C, Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1, 2001, *Neuroscience*, 102(2):329-39

Sanhueza M, Fernandez-Villalobos G, Stein IS, Kasumova G, Zhang P, Bayer KU, Otmakhov N, Hell JW, Lisman J, Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength, 2011, *J Neurosci*, 31(25):9170-8

Santos SD, Carvalho AL, Caldeira MV, Duarte CB, Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity, 2009, *Neuroscience*, 158(1):105-25

Sara Y, Virmani T, Deak F, Liu X, Kavalali ET, An isolated pool of vesicle recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission, 2005, *Neuron*, 45(4):563-73

Sastry P, Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism, 1985, *Prog Lipid Res*, 24(2):69-176

Satoh E, Tada Y, Matsuhisa F, Chronic stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice, 2011? *Neurol Res*, 33(9):899-907

Sattler R, Tymianski M, Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity, 2000, *J mol Med (Berl)*, 78(1):3-13

Sattler R, Tymianski M, Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death, 2001, *Mol Neurobiol*, 24(1-3):107-29

Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE, Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids, 2000, *Cancer Res*, 60(18):5289-95

Schmitz D, Mellor J, Frerking M, Nicoll RA, Presynaptic kainite receptors at hippocampal mossy fiber synapses, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(20):11003-8

Schnitzer J, Franke WW, Schachner M, Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system, 1981, *J Cell Biol*, 90(2):435-47

Schoch S, Deak F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET, SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice, 2001, *Science*, 294(5544):1117-22

Schoepp DD, Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system, 2001, *J Pharmacol Exp Ther*, 299(1):12-20

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F, Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective, 2001, *Mech Ageing Dev*, 122(1):1-29

Selye H, A syndrome produced by diverse nocuous agents, 1936, *Nature*, 138:32

Selye H, What is stress?, 1956, *Metabolism*, 5(5):525-30

Sergeeva M, Strokin M, Reiser G, Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2, 2005, *Reprod Nutr Dev*, 45(5):633-46

Serhan CN, Petasis, Resolvins and protectins in inflammation resolution, 2011, *Chem Res*, 111(10):633-46

Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A, Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus, 2004, *J Comp Neurol*, 478(4):359-78

Shaikh SR, Dumaul AC, Castillo A, LoCascio D, Siddiqui RA, Stillwell W, Wassal SR, Oleic and docosahexaenoic acid differentially phase separate from lipid raft molecule: a comparative NMR, DSC, AFM and detergent extraction study, 2004, *Biophys*, 87(3):1752-66

Shao Sh, Shi SS, Li ZL, Zhao MS, Xie SY, Pan F, Aging effects on the BDNF mRNA and TrkB mRNA expression of the hippocampus in different durations of stress, 2010, *Chin J Physiol*, 53(5):285-93

Sheng M, Hyoung Lee S, AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: major unanswered questions, 2003, *Neurosci Res*, 46(2):127-34

Shepherd JD, Huganir RL, The cell biology of synaptic plasticity:AMPA receptor trafficking, 2007, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:613-43

Shi Y, Liu X, Gebremedhin D, Falck JR, Harder DR, Koehler RC, Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors, and metabotropic glutamate receptors in neurovascular coupling in rat whisker barrel cortex, 2008, *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1):111-25

Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N, Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus, 1997, *J Neurosci*, 17(19):7503-22

Shikano M, Masuzawa Y, Yazawa K, Takayama K, Kudo I, Inoue K, Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A2 during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacylglycerophosphoethanolamine, 1994, *Biochim Biophys Acta*, 1212(2):211-6

Shleper M, Kartvelishvili E, Wolosker H, D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices, 2005, *J Neurosci*, 25(41):9413-7

Shoji H, Mizoguchi K, Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats, 2010, *Behav Brain Res*, 211(2):169-77

Siegelaar SE, Olff M, Bour LJ, Veelo D, Zwinderman AH, van Bruggen G, de Vries GJ, Raabe S, Cupido C, Koelman JH, Tijssen MA, The auditory startle response in post-traumatic stress disorder, 2006, *Exp Brain Res*, 174(1):1-6

Silver J, Miller JH, regeneration beyond the glial scar, 2004, *Nat Rev Neurosci*, 5(2):146-56

Simard M, Nedergaard M, the neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis, 2004, *Neuroscience*, 129(4):877-96

Sinclair AJ, Attar-Bashi NM, Li D, What is the role of alpha-linolenic acid for mammals?, *Lipids*, 2002, 37(12):1113-23

Skorzewska A, Bidzinski A, Hamed A, Lehener M, Turzynska D, Sobolewska A, Walkowiak J, Plaznik A, Changes in hippocampal amino acid concentrations after chronic administration of corticosterone, 2007, *Pharmacol Rep*, 59(6):763-72

Small JV, Rottner K, Kaverina I, Functional design in the actin cytoskeleton, 1999, *Curr Opin Cell Biol*, 11(1):54-60

Smith QR, Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier, 2000, *J Nutr*, 130(4S Suppl):1016S-22S

Snyder EM, Philpot BD, Huber KM, Dong X, Fallon JR, Bear MF, Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation, 2001, *Nat Neurosci*, 4(11):1079-85

Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E, X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor, 2009, *Nature*, 462(7274):745-56

Sofroniew MV, Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation, 2009, *trends Neurosci*, 32(12):638-47

Sofroniew MV, Vinters HV, Astrocytes: biology and pathology, 2010, *Acta Neuropathol*, 119(1):7-35

Song C, Li X, Leonard BE, Horrobin DF, Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats, 2003, *J Lipid Res*, 44(10):1984-91

Song C, Manku MS, Horrobin DF, Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1beta-induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats, 2008, *J Nutr*, 138(5):954-63

Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K, Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress, 2006, *Pharmacol Biochem Behav*, 83(2):186-93

Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM, Reorganisation of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement, 2000, *Neuroscience*, 97(2):253-66

Spector AA, Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain, 2001, *J Mol Neurosci*, 16(2-3):159-65

Spite M, NORling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flwer RJ, Perretti M, Serhan CN (Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis, 2009, *Nature*, 461(7268):1287-91

Sprecher H, The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids, 2002, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(2-3):79-83

Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH, ethology and neurobiology of grooming behavior, 1992, *Physiol Rev*, 72(3):825-52

Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS, Contrasting effects of bromocriptine on learning of a partially baited radial arm maze task in the presence and absence of restraint stress, 2007, *Psychopharmacology (Berl)*, 193(3):363-74

Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS, The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioural recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats, 2006, *Neuroscience*, 143(3):679-88

Stachowicz K, Branski P, Klak K, ven der Puttent H, Cryan JF, Flor PJ, Andrzej P, Selective activation of metabotropic G-protein-coupled glutamate 7 receptor elicits anxiolytic-like effects in mice by modulating GABAergic neurotransmission, 2008, *Behav Pharmacol*, 19(5-6):597-603

Stanley EF, The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face, 1997, *Trends Neurosci*, 20(9):404-9

Stark DT, Bazan NG, Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models, 2011, *MI Neurobiol*, 43(2):131-8

Steiner MA, Wotjak CT, Role of the endocannabinoid system in regulation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, 2008, *Prog Brain Res*, 170:397-432

Stella N, Tencé M, GLowinski J, Prémont J, Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes, 1994, *J Neurosci*, 14(2):568-75

Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachesky VV, Poeddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI, Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities, 2005, *Neuroscience*, 131(1):43-54

Stillwell W, Wassal SR, Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid, 2003, *Chem Phys Lipids*, 126(1):1-27

Strokin M, Chechneva O, Reymann KG, Resiser G, Neuroprotection of rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation by enrichment with docosahexaenoic acid and by inhibition of hydrolysis of docosahexaenoic acid-containing phospholipids by calcium independent phospholipase A2, 2006, *Neuroscience*, 140(2):547-53

Strokin M, Sergeeva M, Reiser G, Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup>, 2003, *Br J Pharmacol*, 139(5):1014-22

Strokin M, Sergeeva M, Reiser G, Role of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid in prostanoid production in brain: perspective for protection in neuroinflammation, 2004, *Int J Dev Neurosci*, 22(7):551-7

Su HM, Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance, 2010, *J Nutr Biochem*, 21(5):364-73

Su KP, Huang SY, Peng CY, Lai HC, Huang CL, Chen YC, Aitchison KJ, Pariante CM, Phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 genes influence the risk of interferon-alpha-induced depression by regulating polyunsaturated fatty acids levels, 2010, *Biol Psychiatry*, 67(6):550-7

Südhof TC, Rothman JE, Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins, 2009, *Science*, 323(5913):474-7

Südhof TC, The synaptic vesicle cycle, 2004, *Annu Rev Neurosci*, 27:509-47

Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, Colgan SP, Petasis NA, Serhan SN, Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties and enzymatic inactivation, 2007, *J Biol Chem*, 282(13):9323-34

Sun Z, Fan Y, Zah Q, Zhu MY, Corticosterone up-regulates expression and function of norepinephrine transporter in SK-N-BE(2)C cells, 2010, *J Neurochem*, 113(1):105-16

Sunanda, Shankaranarayana Rao BS, Raju TR, Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats, *Curr. Sci.*, 2000, 79(11):1581-1584

Sweerts BW, Jarrott B, Lawrence AJ, The effect of acute and chronic restraint on the central expression of prepro-neuropeptide Y mRNA in normotensive and hypertensive rats, 2001, *J Neuroendocrinol*, 13(7):608-17

Szydłowska K, Tymianski M, Calcium, ischemia and excitotoxicity, 2010, *Cell Calcium*, 47(2):122-9

Tahera Y, Meltser I, Johannson P, Bian Z, Stierna P, Hansson AC, Canlon B, NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma, 2006, *J Neurosci Res*, 83(6):1066-76

Tai CC, Ding ST, N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention, 2010, *J Nutr Biochem*, 21(5):357-63

Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E, Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats, 2003, *Brain Res*, 964(1):136-43

Talahalli RR, Vallikannan B, Sambaiah K, Lokesh BR, Lower efficacy in the utilization of dietary ALA as compared to preformed EPA + DHA on long chain n-3 PUFA levels in rats, 2010, *Lipids*, 45(9):799-808

Taliaz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A, Zangen A, Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor, 2011, *J Neurosci*, 31(12):4475-83

Tanabe Y, Hashimoto M, Sugioka K, Maruyama M, Fujii Y, Hagiwara R, Hara T, Hossain SM, Shido O, Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus, 2004, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(10):700-3

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Horii S, Takimoto M, Wada K, Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1, 1997, *Science*, 276(5319):1699-702

Tassin JP, Stinus L, Simon H, Blanc G, Thierry AM, Le Moal M, Cardo B, Glowinski J, Relationship between the locomotor hyperactivity induced by A10 lesions and the destruction of the fronto-cortical dopaminergic innervation in the rat, *Brain Res.*, 1978, 141(2):267-81

Tinoco J, Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals, 1982, *Prog. Lipid Res.*, 21(1):1-45

Tong G, Jahr CE, Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation, 1994, *Neuron*, 13(5):1195-203

Toriya M, Maekawa F, Maejima Y, Onaka T, Fujiwara K, Nekagawa T, Nakata M, Yada T, Long-term infusion of brain-derived neurotrophic factor reduces food intake and body weight via a corticotrophin-releasing hormone pathway in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, 2010, *J Neuroendocrinol*, 22(9):987-95

Torres IL, Gamaro GD, Vasconcellos AP, Silveira R, Dalmaz C, Effects of chronic restraint stress on feeding behaviour and on monoamine levels in different brain structures in rats, 2002, *Neurochem Res*, 27(6):519-25

Tran TT, Srivareerat M, Alhaider IA, Alkadhi KA, Chronic psychosocial stress enhances long-term depression in a subthreshold amyloid-beta rat model of Alzheimer's disease, 2011, *J Neurochem*, 119(2):408-16

Trofimiuk E, Braszko JJ, Alleviation by *Hypericum perforatum* of the stress-induced impairment of spatial working memory in rats, 2008, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 376(6):463-71

Trofimiuk E, Braszko JJ, Long-term administration of cod liver oil ameliorates cognitive impairment induced by chronic stress in rats, 2011, *Lipids*, 46(5):417-23

Tsigos C, Chrousos GP, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress, 2002, *J Psychosom Res*, 53(4):865-71

Tsuneishi S, Takada S, Motoike T, Ohashi T, Sano K, Nakamura H, Effects of dexaméthasone on the expression of myelin basic protein, proteolipid protein, and glial fibrillary acidic protein genes in developing rat brain, 1991, *Brain Res dev Brain Res*, 61(1):117-23

Tsutsumi T, Yamauchi E, Suzuki E, Watanabe S, Kobayashi T, Okuvama H, Effect of a high alpha-linolenate and high linoleate diet on membrane-associated enzyme activities in rat brain – modulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity at suboptimal concentrations of ATP, 1995, *Biol Pharm Bull*, 18(5):664-70

Ulrich-Lai YM, Herman JP, Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses, 2009, *Nat Rev Neurosci*, 10(6):397-409

Ulrih-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP, Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner, 2006, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(5):E965-73

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphine, 1981, *Science*, 213(4514):1394-7

Valenzuela A, Von Bernhardt R, Valenzuela V, Ramirez G, Alarcon R, Sanhueza J, Nieto S, Supplementation of female rats with alpha-linolenic acid or docosahexaenoic acid leads to the same omega-6/omega-3 LC-PUFA accretion in mother tissues and in fetal and newborn brains, 2004, *Ann Nutr Metab*, 48(1):28-35

Van de Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, Van Staveren WA, Dullemeijer C, Olderikkert MG, Beekman AT, de Groot CP, Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial, 2008, *Neurology*, 71(6):430-8

Van Erp AM, Kruk MR, Meelis W, Willekens-Bramer DC, Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening, 1994, *Behav Brain Res*, 65(1):47-55

Van Gelder BM, Tijhuis M, Kalmijn S, Kromhout D, Fish consumption, n-3 fatty acids and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study, 2007, *Am J Clin Nutr*, 85(4):1142-7

Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, Bodard S, Kousignian I, Belzung C, Chalon S, n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice, 2008, *J Lipid Res*, 49(2):340-8

Vann SD, Albasser MM, Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory, 2011, *Curr Opin Neurobiol*, 21(3):440-5

Vardimon L, Ben-Dror I, Avisar N, Oren A, Shiftan L, Glucocorticoid control of glial gene expression, 1999, *J Neurobiol*, 40(4):513-27

Vardimon L, Neuroprotection by glutamine synthetase, 2000, *Isr Med Assoc J*, 2 Suppl:46-51

Vaughan PF, Peers C, Walker JH, The use of the human neuroblastoma SH-SY5Y to study the effect of second messengers on noradrenaline release, 1995, *Gen Pharmacol*, 26(6):1191-201

Vaughan PF, Walker JH, Peers C, The regulation of neurotransmitter secretion by protein kinase C, 1998, *Mol Neurobiol*, 18(2):125-55.

Vazquez V, Farley S, Giros B, Daugé V, Maternal deprivation increases behavioural reactivity to stressful situations in adulthood: suppression by the CCK2 antagonist L365,260, 2005, *Psychopharmacology (Berl)*, 181(4):706-13

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Bhagva V, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS, Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats, 2009, *J Neurosci Res*, 87(4):831-43

Veena J, Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana rao BS, Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats, 2009, *Neurosci Lett*, 455(3):178-82

Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R, PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus, 2009, *Psychoneuroendocrinology*, 34(2):199-211

Ventura R, Harris KM, Three dimensional relationship between hippocampal synapses and Astrocytes, 1999, *J Neurosci*, 19(16):6897-6906

Vinot N, Jouin M, Lhimme-Duchadeuil A, Guesnet P, Alessandri JM, Aujard F, Pifferi F, Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate, 2011, *PLoS One*, 6(6):e20491

Volterra A, Trotti D, Cassutti P, Tromba C, Galimberti R, Lecchi P, Racagni G, A role for the arachidonic acid cascade in fast synaptic modulation: ion channels and transmitter uptake systems as target proteins, 1992, *Adv Exp Med Biol*, 318:147-58

Volterra A, Trotti D, Racagni G, Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms, 1994, *Mol Pharmacol*, 46(5):986-92

Von Bohlen und Halbach O, Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus, 2011, *Cell Tissue Res*, 345(1):1-19

Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV, Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS, 2009, *J Neurosci*, 29(37):11511-22

Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Wadman WJ, Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons, 1996, Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons, *Proc Natl Acad USA*, 93(22):12559-63

Walesiuk A, Braszko JJ, Ginkgoselect alleviates chronic corticosterone-induced spatial memory deficits in rats, 2010, *Fitoterapia*, 81(1):25-9

Walf AA, Frye CA, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behaviour in rodents, 2007, *Nat Protoc*, 2(2):322-8

Walf AA, Frye CA, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behaviour in rodents, 2007, *Nat Protoc*, 2(2):322-8

Walton HS, Dodd PR, Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease, 2007, *Neurochem Int*, 50(7-8):1052-1066

Walz W, Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium, 2000, *Neurochem Int*, 36(4-5):291-300

Wang CC, Wang SJ, Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals, 2009, *Synapse*, 63(9):745-51

Wang DD, Bordey A, The astrocytes odyssey, 2008, *Prog Neurobiol*, 86(4):342-67

Wang Q, Fujii H, Knipp GT, Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas, 2002, *Placenta*, 23(8-9):661-71

Wang Y, Qin ZH, molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death, 2010, *Apoptosis*, 15(11):1382-402

Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Bendito G, Molnar Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD, Wilson MC, genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis, 2002, *Nat Neurosci*, 5(1):19-26

Wasser CR, Kavalali ET, Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses, 2009, *Neuroscience*, 158(1):177-88

Watanabe S, Doshi M, Hamazaki T, n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice, 2003 *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69(1):51-9

Watanabe Y, Gould E, McEwen BS, Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons, 1992, *Brain Res*, 588(2):341-5

Waterhouse EG, Xu B, New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity, 2009, *Mol Cell Neurosci*, 42(2):81-9

Watkins JC, L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back, 2000, *Biochem Soc Trans*, 28(4):297-309

Wei S, Ong WY, Thwin MM, Fong CW, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P, Hong W, Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons, 2003, *Neuroscience*, 121(4):891-8

Weill P, Schmitt B, Chesneau G, Daniel N, Safraou F, Legrand P, Effects of introducing linseed in livestock diet on blood fatty acid composition of consumers of animal products, 2002, *Ann. Nutr. Metab.*, 46(5):182-91

Weston MC, Nehring RB, Wojcik SM, Rosenmund C, Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity, 2011, *Neuron*, 69(6):1147-59

Whelan J, (n-6) and (n-3) Polyunsaturated fatty acids and the aging brain: food for thought, 2008, *J Nutr*, 138(12):2521-2

Wiegert O, Joëls M, Krugers H, Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus, 2006, *Learn Mem*, 13(2):110-3

Wiegert O, Pu Z, Shor S, Joëls M, Krugert H, Glucocorticoid receptor activation selectively hampers N-methyl-D-aspartate receptor dependent hippocampal synaptic plasticity *in vitro*, 2005, *Neuroscience*, 135(2):403-11

Wielgat P, Walesiuk A, Braszko JJ, Effects of chronic stress and corticosterone on sialidase activity in the rat hippocampus, 2011, *Behav Brain Res*, 222(2):363-7

Wieronska JM, Pilc A, Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs, 2009, *Neurochem Int*, 55(1-3):85-97

Wilber AA, Walker AG, Southwood CJ, Farrel MR, Lin GL, Rebec GV, Wellman CL, Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction, 2011, *Neuroscience*, 174:115-

Wilber AA, Walker AG, Southwood CJ, Farrell MR, Lin GL, Rebec GV, Wellman CL, Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction, 2011, *Neuroscience*, 174:115-31

Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M, Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration, 2004, *J Neurosci*, 24(21):5016-21

Williard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, Robbins ME, Spector AA, Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes, 2001, *J Lipid Res*, 42(9):1368-76

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R, Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant, *Psychopharmacology (Berl)*., 1987, 93(3):358-64

Wilson NR, Kang J, Hueske EV, Leung T, Varoqui H, Murnick JG, Erickson JD, Liu G, Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1, 2005, *J Neurosci*, 25(26):6221-34

Witter MP, The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus, 2007, *Prog Brain Res*, 163:43-61

Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T, Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network, 2000, *Ann NY Acad Sci*, 911:1-24

Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH, Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(2):721-5

Woo PL, Ching D, Guan Y, Firestone GL, Requirement for Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling uncouples the glucocorticoid-induced junctional organization and transepithelial electrical resistance in mammary tumor cells, 1999, *J Biol Chem*, 274(46):32818-28

Wood GE, Young LT, Reagan LP, McEwen BS, Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats, 2003, *Horm Behav*, 43(1):205-13

Wright RL, Conrad CD, Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Y-maze, 2005, *Stress*, 8(2):151-4

Wright RL, Conrad CD, Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits, 2008, *Behav Brain Res*, 187(1):41-7

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition, 2008, *Neuroscience*, 155(3):751-9

Xiao L, Feng C, Chen Y, Glucocorticoid rapidly enhances NMDA-evoked neurotoxicity by attenuating the NR2A-containing NMDA receptor-mediated ERK12 activation, 2010, *Mol Endocrinol*, 24(3):497-510

Xiao Y, Huang Y, Chen ZY, Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain, 2005, *Br J Nutr*, 94(4):544-50

Xiao Y, Li X, Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation, 1999, *Brain Res*, 846(1):112-21

Xiao Y, Wang L, Xu RJ, Chen ZY, DHA depletion in rat brain is associated with impairment on spatial learning and memory, 2006, *Biomed Environ Sci*, 19(6):474-80

Ximenes da Silva A, LAvialle F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri JM, Laviaille M, Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids, 2002, *J Neurochem*, 81(6):1328-37

Xu J, Kim GM, Ahmed SH, Xu J, Yan P, Xu XM, Hsu CY, Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury, 2001, *J Neurosci*, 21(1):92-7

Xu Y, Wang Q, Cook TJ, Knipp GT, Effect of placental fatty acid metabolism and regulation by peroxisome proliferator activated receptor on pregnancy and fetal outcomes, 2007, *J Pharm Sci*, 96(10):2582-606

Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG, Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells, 2001, *J Neurosci*, 21(17):6666-72

Yan J, Sun Xb, Wang HQ, Zhao H, Zhao XY, Xu YX, Guo JC, Zhu CQ, Chronic restraint stress alters the expression and distribution of phosphorylated tau and MAP2 in cortex and hippocampus of rat brain, 2010, *Brain Res*, 1347:132-41

Yang HC, Mosior M, Ni B, Dennis EA, Regional distribution, ontogeny, purification and characterization of the Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 from the rat brain, 1999, *J Neurochem*, 73(3):1278-87

Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GC, Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas, 1994, *Mol Chem Neuropathol*, 21(2-3):155-76

Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shn W, Wu C, Poo M, Duan S, Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(25):15194-9

Yaqoob P, The nutritional significance of lipid rafts, 2009, *Annu Rev Nutr*, 29:257-82

Yavin E, Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression, 2006, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 75(3):203-11

Ye Y, Wang G, Wang H, Wang X, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression, 2011, *Neurosci Lett*, 503(1):15-9

Yee BK, Cytotoxic lesion of the medial prefrontal cortex abolishes the partial reinforcement extinction effect, attenuates prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and induces transient hyperlocomotion, while sparing spontaneous object recognition memory in the rat, *Neuroscience*, 2000, 95(3):675-89

Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI, Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions, 1999, *J. Neurosci. Res.*, 56(6):565-70

Yynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F, Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation, 1983, *Nature*, 305(5936):719-21

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Hardind HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA, Differential activation of peroxisomal proliferator-activated receptors by eicosanoids, 1995, *J Biol Chem*, 270(41):23975-83

Yu S, Yang S, Holsboer F, Sousa N, Almeida OF, Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function, 2011, *PLoS One*, 6(7):e22419

Yu YH, Wang PH, Cheng W, Mersmann HJ, Wu SC, Ding ST, Porcine peroxisome proliferator-activated receptor delta mediates the lipolytic effects of dietary fish oil to reduce body fat deposition, 2010, *J Anim Sci*, 88(6):2009-18

Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Feng J, McEen BS, Yan Z, Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory, 2009, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(33):14075-9

Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K, Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependant fear

memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas 4, 2010, *J Neurochem*, 114(6):1840-51

Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT, Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke, 2009, *Handb Exp, Pharmacol*, 190:159-70

Zafir A, Banu N, Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats, 2009, *Stress*, 12(2):167-77

Zarate CA Jr, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Sungh J, Charney DS, Manji HK, Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system, 2003, *Ann NY Acad Sci*, 1003:273-91

Zerangue N, Kavanaugh MP, Flux coupling in a neuronal glutamate transporter, 1996, *Nature*, 383(6601):634-7

Zha Q, Wang Y, Fan Y, Zhu MY, Dexamethasone-induced up-regulation of the human norepinephrine transporter involves the glucocorticoid receptor and increased binding of C/EBP- $\beta$  to the proximal promoter of norepinephrine transporter, 2011, *J Neurochem*, 119(3):654-63

Zhai RG, Bellen HJ, The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal, 2004, *Physiology (Bethesda)*, 19:262-70

Zhang Y, Venkitaramani DV, Gladding CM, Zahng Y, Kurup P, Molnar E, Collingridge GL, Lombroso PJ, the tyrosine phosphatase STEO mediates AMPA receptor endocytosis after metabotropic glutamate receptor stimulation, 2008, *J Neurosci*, 28(42):10561-6

Zimmer L, Delion-Vancassel S, Durand G, Guilloteau D, Bodard S, Besnard JC, Chalon S, Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids, 2000, *J Lipid Res*, 41(1):32-40

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, 2000, *Neurosci Lett*, 284(1-2):25-8

Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S, The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids, 2002, *Am J Clin Nutr*, 75(4):662-7

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G, Neuron-to-astrocyte signalling is central to the dynamic control of brain microcirculation, 2003, *Nat Neurosci*, 6(1):43-50

Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G, Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes, 2003, J Physiol, 553(Pt 2):407-14

Zschocke J, Bayatti N, Clement AM, Witan H, Figiel M, Engele J, Behl C, Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions, 2005, J Biol Chem, 280(41):34901-32



# Annexes

## ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture cellulaire

	MEME (Sigma M2279)	HAM-F12 (Sigma, N4888)	MEME (Invitrogen, Gibco 21090-055)
<b>Sels inorganiques</b>			
• CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.2	0.0441	0.264
• CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	—	0.0000025	—
• FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000834	—
• MgCl•6H <sub>2</sub> O	—	0.123	—
• MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.09767 (anhydre)	—	0.2
• KCl	0.4	0. 0.224	0.4
• NaHCO <sub>3</sub>	2.2	1.176	2.2
• NaCl	6.8	7.599	6.8
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	— (anhydre)	0.14204	—
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.122 (anhydre)	—	0.158
• ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000863	—
<b>Acides Aminés</b>			
• L-Alanine	—	0.009	—
• L-Arginine•HCl	0.126	0.211	0.126
• L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	—	0.01501	—
• L-Aspartic Acid	—	0.0133	—
• L-cystine	—	—	0.024
• L-Cysteine•HCl•H <sub>2</sub> O	0.0313	0.035	—
• L-Glutamic Acid	—	0.0147	—
• Glycine	—	0.00751	—
• L-Histidine•3HCl•H <sub>2</sub> O	0.042	0.02096	0.042
• L-Isoleucine	0.052	0.00394	0.052
• L-Leucine	0.052	0.0131	0.052
• L-Lysine•HCl	0.0725	0.0365	0.073
• L-Methionine	0.015	0.00448	0.015
• L-Phenylalanine	0.032	0.00496	0.032
• L-Proline	—	0.0345	—
• L-Serine	—	0.0105	—
• L-Threonine	0.048	0.0119	0.048
• L-Tryptophan	0.01	0.00204	0.01
• L-Tyrosine 2Na•2H <sub>2</sub> O	0.0519	0.00778	0.036
• L-Valine	0.046	0.0117	0.046
<b>Vitamines</b>			
• Vitamine B-8 (Biotine)	—	0.0000073	—
• Vitamine B-4 (Chlorure de Choline )	0.001	0.01396	0.001
• Vitamine B-9 (Acide folique)	0.001	0.00132	0.001
• Vitamine B-7 (Inositol)	0.002	0.018	0.002
• Vitamine B-3 (Niacinamide)	0.001	0.000037	0.001
• Vitamine B-5 (Acide penthoténique)	0.001	0.00048	0.001
• Vitamine B-6 (Pyridoxine)	0.001	0.000062	0.001
• Vitamine B-2 (Riboflavine)	0.0001	0.000038	0.0001
• Vitamine B-1 (Thiamine)	0.001	0.00034	0.001
• Vitamin B-12	—	0.00136	—
<b>Autres</b>			
• D-Glucose	1.0	1.802	1
• Hypoxanthine	—	0.00408	—
• Linoleic Acid	—	0.000084	—
• Phenol Red (sodium)	0.011	0.0013	0.01
• Putrescine•HCl	—	0.000161	—
• Pyruvic Acid (sodium)	—	0.11	—
• Thioctic Acid	—	0.00021	—
• Thymidine	—	0.00073	—
• L-Glutamine	0.292	0.146	—
• Sodium Bicarbonate	2.2	—	—

**ANNEXE 2 : Composition lipidique des sérums de culture cellulaire (en %AGT)**

	<b>Sérum de Veau Foetal (SVF)</b>	
	<b>Culture SH_SY5Y</b>	<b>Culture primaire d'astrocytes</b>
16:0	20,69	17,05
18:0	13,25	9,75
<b>Somme Saturés</b>	<b>38,91</b>	<b>47,07</b>
<b>Somme Insaturés</b>	<b>35,05</b>	<b>23,49</b>
18:2 n-6	6,8	13,15
20:4 n-6	5,35	4,24
22:5 n-6	0,08	0,09
<b>Somme n-6</b>	<b>14,67</b>	<b>19,59</b>
18:3 n-3	0,42	1,3
22:5 n-3	3,19	1,83
22:6 n-3	4,33	2,23
<b>Somme n-3</b>	<b>9,07</b>	<b>7,06</b>
<b>Somme n-9</b>	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>
<b>Somme DMA</b>	<b>1,82</b>	<b>2,32</b>

**ANNEXE 3 : Composition lipidique de la PE, PC et PS des cortex de rats (exprimés en  $\mu$ moles/g de tissu)**

	Déf		Eq		Enr	
	NS	S	NS	S	NS	S
$\Sigma$ AGS	7,08 $\pm$ 0,5	6,75 $\pm$ 0,5	6,53 $\pm$ 0,4	6,12 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2
$\Sigma$ AGMI	4,14 $\pm$ 0,3	3,97 $\pm$ 0,2	3,67 $\pm$ 0,4	3,51 $\pm$ 0,3	3,74 $\pm$ 0,2	4,58 $\pm$ 0,2
20:4 n-6	3,95 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,87 $\pm$ 0,2	3,39 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	2,82 $\pm$ 0,2	2,68 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,82 $\pm$ 0,1
22:5 n-6	2,71 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,54 $\pm$ 0,1	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,1 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,01
$\Sigma$ AGPI n-6	9,34 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	8,88 $\pm$ 1	5,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	4,44 $\pm$ 0,4	4,14 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	4,32 $\pm$ 0,3
20:5 n-3	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
22:6 n-3	3,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,32 $\pm$ 0,2	6,24 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	4,94 $\pm$ 0,5	6,41 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	6,57 $\pm$ 0,2*
$\Sigma$ AGPI n-3	3,59 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,41 $\pm$ 0,2	6,59 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	5,07 $\pm$ 0,5	6,58 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	6,75 $\pm$ 0,2*
$\Sigma$ AGPI n-9	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,01
$\Sigma$ DMA	6,49 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,4	5,63 $\pm$ 0,4	5,27 $\pm$ 0,3	5,53 $\pm$ 0,3	6,38 $\pm$ 0,2
AGPI n-6/AGPI n-3	2,55 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	2,62 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,64 $\pm$ 0,04
PE	14,8 $\pm$ 0,9	14,18 $\pm$ 0,9	13,63 $\pm$ 0,9	12,02 $\pm$ 0,6	12,78 $\pm$ 0,7	14,04 $\pm$ 0,5

**Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidyléthanolamine (PE) du cortex frontal de rat**

$\Sigma$  AGS : somme des acides gras saturés ;  $\Sigma$  AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ;  $\Sigma$  AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ;  $\Sigma$  DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficients en AGPI n-3 ; Eq : Équilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne  $\pm$  SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en  $\mu$ moles/g de tissus. Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS ( $p < 0,05$ ) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire ( $p < 0,05$ )

	Déf		Eq		Enr	
	NS	S	NS	S	NS	S
<b>Σ AGS</b>	<b>28,56 ± 3,5</b>	<b>27,33 ± 2,3</b>	<b>24,04 ± 0,7</b>	<b>24,79 ± 1,7</b>	<b>27,36 ± 2,8</b>	<b>28,08 ± 1,9</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>14,09 ± 2,2</b>	<b>12,49 ± 1</b>	<b>12,25 ± 1,9</b>	<b>11,03 ± 0,7</b>	<b>12,17 ± 1,2</b>	<b>13,24 ± 0,9</b>
<b>20:4 n-6</b>	3,05 ± 0,5	2,66 ± 0,2	2,62 ± 0,4	2,2 ± 0,2	2,22 ± 0,3	2,17 ± 0,2
<b>22:5 n-6</b>	0,98 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,09	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,1	0,02 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>4,76 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>4,12 ± 0,4</b>	<b>3,27 ± 0,5<sup>ab</sup></b>	<b>2,79 ± 0,2</b>	<b>2,83 ± 0,4<sup>b</sup></b>	<b>2,86 ± 0,2</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,01 ± 0,01	0 ± 0	0,01 ± 0,01	0 ± 0	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>22:6 n-3</b>	1,05 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,08	1,89 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,1	2,13 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,2
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>1,13 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>0,92 ± 0,08</b>	<b>1,98 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>1,56 ± 0,1</b>	<b>2,24 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>2,2 ± 0,2</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,03 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>0,23 ± 0,03</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,2 ± 0,03</b>	<b>0,15 ± 0,01</b>	<b>0,19 ± 0,02</b>	<b>0,21 ± 0,02</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>4,15 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>4,5 ± 0,1</b>	<b>1,63 ± 0,05<sup>c</sup></b>	<b>1,81 ± 0,08</b>	<b>1,26 ± 0,03<sup>d</sup></b>	<b>1,31 ± 0,02</b>
<b>PC</b>	<b>26,17 ± 4</b>	<b>22,54 ± 1,9</b>	<b>22,74 ± 3,2</b>	<b>20,17 ± 1,4</b>	<b>22,41 ± 2,4</b>	<b>23,3 ± 1,6</b>

### Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylcholine (PC) du cortex frontal de rat

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficitaires en AGPI n-3 ; Eq : Équilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en μmoles/g de tissus. Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire (p<0,05)

	Déf		Eq		Enr	
	NS	S	NS	S	NS	S
<b>Σ AGS</b>	<b>20,85 ± 2,9</b>	<b>21,73 ± 1,7</b>	<b>13,86 ± 1,2</b>	<b>12,99 ± 1,7</b>	<b>17,79 ± 4,1</b>	<b>18,7 ± 2,7</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>9,88 ± 1,2</b>	<b>10,8 ± 1,2</b>	<b>6,5 ± 0,7</b>	<b>6,42 ± 0,9</b>	<b>8,46 ± 1,7</b>	<b>10,22 ± 1,6</b>
<b>20:4 n-6</b>	1,9 ± 0,3	1,87 ± 0,3	1,55 ± 0,1	1,48 ± 0,2	1,41 ± 0,3	1,66 ± 0,2
<b>22:5 n-6</b>	3,93 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,47 ± 0,5	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,03	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,03
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>7,08 ± 1,2<sup>a</sup></b>	<b>6,56 ± 1</b>	<b>2,81 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>2,7 ± 0,4</b>	<b>2,43 ± 0,4<sup>b</sup></b>	<b>2,83 ± 0,3</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,1 ± 0,05
<b>22:6 n-3</b>	3,67 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,6	7,04 ± 0,8 <sup>b</sup>	6,48 ± 0,9	6,86 ± 1,2 <sup>b</sup>	7,18 ± 0,6
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>3,85 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>3,65 ± 0,6</b>	<b>7,2 ± 0,8<sup>b</sup></b>	<b>6,67 ± 0,9</b>	<b>7,06 ± 1,3<sup>b</sup></b>	<b>7,39 ± 0,6</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>0,04 ± 0,01</b>	<b>0,05 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,03 ± 0,01</b>	<b>0,03 ± 0,01</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>0,61 ± 0,08</b>	<b>0,75 ± 0,1</b>	<b>0,51 ± 0,09</b>	<b>0,41 ± 0,06</b>	<b>0,54 ± 0,1</b>	<b>0,58 ± 0,06</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,89 ± 0,07<sup>a</sup></b>	<b>1,87 ± 0,07</b>	<b>0,4 ± 0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,4 ± 0,01</b>	<b>0,34 ± 0,01<sup>b</sup></b>	<b>0,38 ± 0,02</b>
<b>PS</b>	<b>21,15 ± 2,9</b>	<b>21,77 ± 2,3</b>	<b>15,45 ± 1,2</b>	<b>14,61 ± 1,9</b>	<b>18,15 ± 3,8</b>	<b>19,87 ± 2,5</b>

### Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylsérine (PS) du cortex frontal de rat

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals ; Déf : Déficitaires en AGPI n-3 ; Eq : Équilibrés ; Enr : Enrichis en AGPI-LC n-3 ; NS : Non Stressés ; S : Stressés

La composition lipidique corticale a été analysée sur des échantillons de cortex frontal, prélevés sur des rats recevant différents apports alimentaires en AGPI n-3 (déficient en AGPI n-3, équilibré, enrichi en AGPI-LC n-3) et soumis ou non à un stress chronique de contention. Les valeurs (Moyenne ± SEM ; n=7 par groupe) sont exprimées en μmoles/g de tissus. Les résultats ont été analysés pour chaque AGPI par une ANOVA 2 facteurs (régime\*stress), suivie de tests post-hoc de Bonferroni. a, b, c : pour chaque type d'AG, effet significatif du régime alimentaire chez les rats NS (p<0,05) ; \* : pour chaque type d'AG, effet significatif du stress par rapport à groupe NS du même lot alimentaire (p<0,05)

**ANNEXE 4 : Composition lipidique de la PE, PC et PS des cellules SH\_SY5Y exprimée en %AGT lorsque l'incubation pendant 24h à l'OH-C précède la supplémentation en AGPI**

24h de culture		C 100 nM	Témoins	C 100 nM	Témoins	C 100 nM
Suivie de 48h de culture	Témoins	Témoins	DHA	DHA	AA	AA
<b>Σ AGS</b>	<b>21,1</b>	<b>22,5</b>	<b>27,4</b>	<b>23,1</b>	<b>26,3</b>	<b>22,8</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>19,7</b>	<b>18,2</b>	<b>13,5</b>	<b>13,4</b>	<b>12,4</b>	<b>12,5</b>
<b>20:4 n-6</b>	13,1	13,7	5,7	6,3	17,0	20,5
<b>22:5 n-6</b>	1,0	0,9	0,3	0,3	3,4	3,5
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>19,6</b>	<b>19,7</b>	<b>9,2</b>	<b>9,5</b>	<b>36,6</b>	<b>39,8</b>
<b>20:5 n-3</b>	1,0	1,6	3,0	3,4	0,1	0,4
<b>22:6 n-3</b>	13,6	14,1	27,7	31,4	6,6	7,2
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>18,8</b>	<b>19,5</b>	<b>35,5</b>	<b>40,0</b>	<b>9,4</b>	<b>10,4</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>2,1</b>	<b>1,8</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>18,6</b>	<b>18,3</b>	<b>13,9</b>	<b>13,4</b>	<b>14,8</b>	<b>13,7</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>3,9</b>	<b>3,8</b>

**Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidyléthanolamine (PE) des cellules SH\_SY5Y**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

24h de culture		C 100 nM	Témoins	C 100 nM	Témoins	C 100 nM
Suivie de 48h de culture	Témoins	Témoins	DHA	DHA	AA	AA
<b>Σ AGS</b>	<b>46,1</b>	<b>45,9</b>	<b>51,1</b>	<b>51,1</b>	<b>49,9</b>	<b>49,5</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>42,8</b>	<b>43,0</b>	<b>27,7</b>	<b>26,1</b>	<b>26,2</b>	<b>25,7</b>
<b>20:4 n-6</b>	2,9	3,0	2,0	2,2	10,3	10,5
<b>22:5 n-6</b>	0,2	0,2	0,1	0,1	1,6	1,6
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>5,1</b>	<b>5,0</b>	<b>3,9</b>	<b>4,7</b>	<b>19,5</b>	<b>20,5</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,3	0,4	2,4	2,9	0,2	0,0
<b>22:6 n-3</b>	2,2	2,3	11,6	12,2	1,8	1,8
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>3,6</b>	<b>3,6</b>	<b>16,1</b>	<b>17,0</b>	<b>3,0</b>	<b>2,7</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>6,6</b>	<b>7,5</b>

### Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylcholine (PC) des cellules SH\_SY5Y

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

<b>24h de culture</b>	<b>Témoins</b>	<b>C 100 nM</b>	<b>Témoins</b>	<b>C 100 nM</b>	<b>Témoins</b>	<b>C 100 nM</b>
<b>Suivie de 48h de culture</b>		<b>Témoins</b>	<b>DHA</b>	<b>DHA</b>	<b>AA</b>	<b>AA</b>
<b>Σ AGS</b>	<b>45,1</b>	<b>40,2</b>	<b>41,3</b>	<b>41,5</b>	<b>40,9</b>	<b>44,1</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>36,4</b>	<b>31,8</b>	<b>31,6</b>	<b>25,4</b>	<b>34,7</b>	<b>28,6</b>
<b>20:4 n-6</b>	3,3	2,9	2,9	4,8	6,1	5,7
<b>22:5 n-6</b>	0,5	0,1	0,2	0,2	1,5	1,8
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>8,4</b>	<b>9,2</b>	<b>9,3</b>	<b>12,7</b>	<b>17,4</b>	<b>19,5</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,7	1,4	0,9	1,0	0,3	0,9
<b>22:6 n-3</b>	4,2	12,1	11,9	13,6	2,3	2,6
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>6,6</b>	<b>16,1</b>	<b>15,5</b>	<b>17,1</b>	<b>4,3</b>	<b>5,2</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>2,7</b>	<b>2,6</b>	<b>2,4</b>	<b>3,2</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>4,1</b>	<b>3,8</b>

### **Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylsérine (PS) des cellules SH\_SY5Y**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

**ANNEXE 5 : Composition lipidique de la PE, PC et PS des cellules SH\_SY5Y exprimée en %AGT lorsque l'incubation pendant 24h à l'OH-C succède à la supplémentation en AGPI**

48h de culture	Témoins	Témoins	DHA	DHA	AA	AA
Suivie de 24h de culture		C 100 nM	Témoins	C 100 nM	Témoins	C 100 nM
<b>Σ AGS</b>	<b>21,1</b>	<b>21,0</b>	<b>22,5</b>	<b>21,7</b>	<b>21,9</b>	<b>23,6</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>19,7</b>	<b>22,5</b>	<b>12,8</b>	<b>12,3</b>	<b>11,2</b>	<b>11,4</b>
<b>20:4 n-6</b>	13,1	12,5	4,8	4,9	20,3	19,7
<b>22:5 n-6</b>	1,0	1,0	0,2	0,1	4,0	4,0
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>19,6</b>	<b>18,8</b>	<b>7,5</b>	<b>7,5</b>	<b>40,1</b>	<b>40,6</b>
<b>20:5 n-3</b>	1,0	0,4	3,8	4,0	0,1	0,3
<b>22:6 n-3</b>	13,6	13,0	31,2	32,4	8,2	7,0
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>18,8</b>	<b>17,2</b>	<b>42,0</b>	<b>43,3</b>	<b>11,2</b>	<b>10,1</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>2,1</b>	<b>3,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>18,6</b>	<b>17,4</b>	<b>14,9</b>	<b>14,8</b>	<b>15,2</b>	<b>14,0</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>3,6</b>	<b>4,0</b>

**Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidyléthanolamine (PE) des cellules SH\_SY5Y**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

<b>48h de culture</b>	<b>Témoins</b>	<b>Témoins</b>	<b>DHA</b>	<b>DHA</b>	<b>AA</b>	<b>AA</b>
<b>Suivie de 24h de culture</b>		<b>C 100 nM</b>	<b>Témoins</b>	<b>C 100 nM</b>	<b>Témoins</b>	<b>C 100 nM</b>
<b>Σ AGS</b>	<b>46,1</b>	<b>43,7</b>	<b>49,5</b>	<b>48,3</b>	<b>50,7</b>	<b>52,0</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>42,8</b>	<b>45,4</b>	<b>31,9</b>	<b>32,2</b>	<b>27,7</b>	<b>26,8</b>
<b>20:4 n-6</b>	2,9	3,0	1,6	1,7	9,1	8,6
<b>22:5 n-6</b>	0,2	0,2	0,0	0,0	1,7	1,6
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>5,1</b>	<b>5,2</b>	<b>3,8</b>	<b>3,8</b>	<b>17,6</b>	<b>17,3</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,3	0,2	2,3	2,4	0,3	0,2
<b>22:6 n-3</b>	2,2	2,7	9,0	9,6	2,0	1,7
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>3,6</b>	<b>3,7</b>	<b>13,7</b>	<b>14,7</b>	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>1,1</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>5,5</b>	<b>6,4</b>

### **Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylcholine (PC) des cellules SH\_SY5Y**

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

48h de culture	Témoins	Témoins	DHA	DHA	AA	AA
Suivie de 24h de culture		C 100 nM	Témoins	C 100 nM	Témoins	C 100 nM
<b>Σ AGS</b>	<b>45,1</b>		<b>37,6</b>	<b>39,7</b>	<b>48,6</b>	<b>40,9</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>36,4</b>		<b>28,2</b>	<b>27,7</b>	<b>28,6</b>	<b>34,7</b>
<b>20:4 n-6</b>	3,3		2,6	2,4	4,8	6,2
<b>22:5 n-6</b>	0,5		0,1	0,1	1,5	1,6
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>8,4</b>		<b>8,3</b>	<b>7,8</b>	<b>16,3</b>	<b>18,3</b>
<b>20:5 n-3</b>	0,7		1,3	1,1	0,3	0,4
<b>22:6 n-3</b>	4,2		17,7	17,4	2,0	2,4
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>6,6</b>		<b>23,6</b>	<b>23,3</b>	<b>3,6</b>	<b>4,2</b>
<b>Σ AGPI n-9</b>	<b>0,8</b>		<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>Σ DMA</b>	<b>2,7</b>		<b>2,2</b>	<b>1,3</b>	<b>2,8</b>	<b>1,8</b>
<b>AGPI n-6/AGPI n-3</b>	<b>1,3</b>		<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>4,5</b>	<b>4,4</b>

### Teneurs en acides gras principaux de la phosphatidylsérine (PS) des cellules SH\_SY5Y

Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras polyinsaturés ; Σ DMA : somme des diméthylacétals

## **ANNEXE 6 : Communications scientifiques affichées**

## INTRODUCTION

An adequate balance between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in neuronal and astrocytic membranes is essential for a healthy functioning of the central nervous system (CNS). Ongoing studies on this topic suggest that a deficiency in n-3 PUFA may be associated with a lower resistance of the CNS to chronic injury induced by stress and aging.

## OBJECTIVES

The aim of the study was to compare the response to chronic stress exposure of 6 month-old rats receiving different n-3 PUFA supplies. In this preliminary study, we analysed stress response through the assessment of different parameters : physiological (growth), biochemical (lipid contents in frontal cortex and plasma corticosterone levels), behavioral (impulsiveness and anxiety level) and synaptic activity (electrophysiology in the CA1 area (hippocampus) and monoamine contents in the frontal cortex).

## MATERIALS AND METHODS

**Animals :** Wistar male rats received either an n-3 PUFA deficient (**deficient rats**), a balanced (providing n-3 PUFA precursor,  $\alpha$ -linolenic acid : **ALA-rats**) or an enriched (providing the precursor and the long-chain n-3 PUFA : **DHA+EPA-rats**) diet. The dietary protocol was applied to the mothers 15 days before mating and then to the offspring after weaning. All the animals are weighted weekly.

**Restraint stress :** At 6-months old, half of the rats were subjected to a chronic restraint stress procedure, 6h/day for 21 days.

Rat in restraint container



**Brain lipid and monoamine contents (FCX) :** The lipid composition of the 3 main phospholipid classes (phosphatidylethanolamine PE, phosphatidylcholine PC, phosphatidylserine PS) was determined by gas chromatography (GC) and monoamine contents were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection.

**Plasma corticosterone measurement :** Blood sampling was performed on rat's tail and the corticosterone level was determined by radioimmunoassay (RIA).

**Behavior :** The animals were tested after the stress period in an openfield (latency to move) and in an elevated plus maze (number of entries in the anxiogenic open arms/total arms) for emotional behavior.



Openfield

Elevated Plus Maze



**Electrophysiological measurements :** recordings were obtained at room temperature from the apical dendritic layer of the CA1 area of hippocampus using micropipettes filled with 2 M NaCl. Field EPSPs (fEPSPs) are evoked by electrical stimulation of CA1 afferent fibres located in the stratum radiatum.

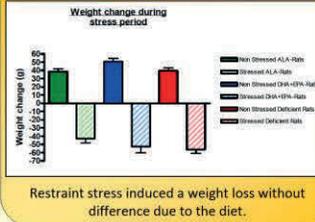
Cellular organisation of rat hippocampus



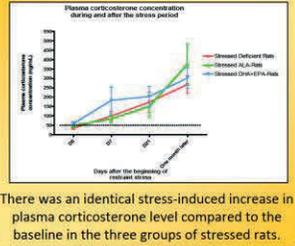
## DISCUSSION-CONCLUSION

Our results underline that the dietary n-3 PUFA supply, which determines the PUFA composition of cerebral membranes, influences synaptic function and behavioral stress response. N-3 PUFA enrichment acts particularly on the synaptic function, by increasing synaptic efficiency, but this effect is antagonized by chronic stress. Our results also suggest that n-3 deficiency induces stress-like effects on some behavioral and electrophysiological traits. Additional studies will be performed to measure the expression of synaptic (V-Glut 1&2, synaptophysin) and stress markers (glucocorticoids receptors) in an attempt to characterize these observations further.

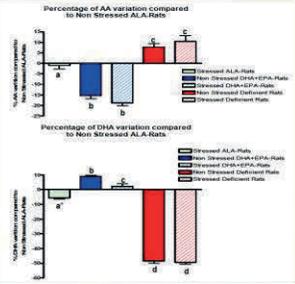
## GROWTH



## PLASMA CORTICOSTERONE LEVEL

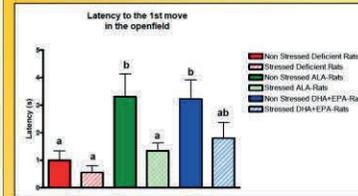


## BRAIN LIPID COMPOSITION



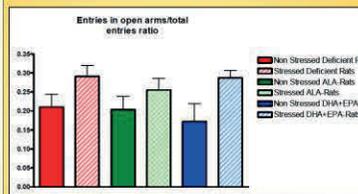
## BEHAVIOR

### 1. Openfield : measure of animals' impulsiveness



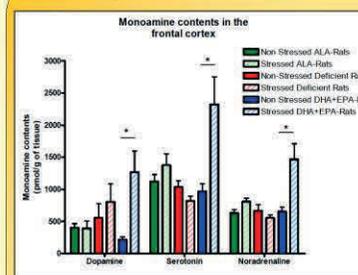
Deficient rats showed a reduced latency to move, equivalent to the one measured in the stressed rats of the three dietary groups, suggesting an increase in impulsiveness.

### 2. Elevated plus Maze : analysis of anxiety level



There was a non-significant trend (P<0.1) to stress-induced increase in the entries in open arms/total entries ratio in the three dietary groups, suggesting higher sensation seeking in restrained rats.

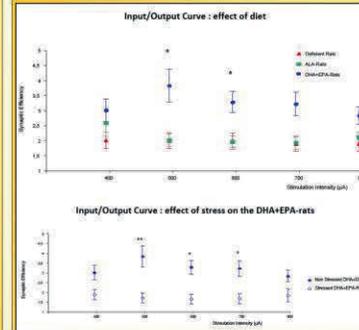
## MONOAMINE CONTENTS



Restraint stress induced an increase in monoamine metabolism in the DHA+EPA group.

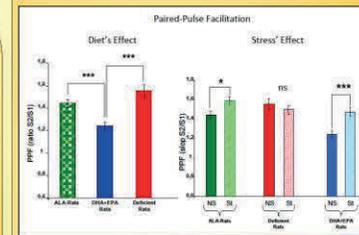
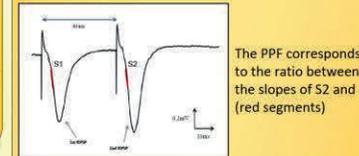
## ELECTROPHYSIOLOGICAL MEASURES

### 1. Input/Output Curve



The DHA+EPA-group presented a higher synaptic efficiency than the deficient and the ALA- groups, but this was cancelled by the restraint stress procedure.

### 2. Paired-Pulse facilitation

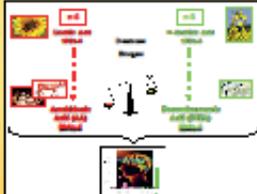


The PPF was decreased in the DHA+EPA-rats compared to ALA- and to deficient rats, indicating an increase in the presynaptic glutamate release consistent with the observed greater synaptic efficiency. Restraint stress significantly increased the PPF in the ALA- and in the DHA+EPA-rats to the same level as deficient rats, showing here a reduction of the presynaptic glutamate release.

## INTRODUCTION

An adequate balance between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in neuronal and astrocytic membranes is essential for a healthy functioning of the central nervous system (CNS). Ongoing studies suggest that a deficiency in n-3 PUFA may be associated with a lower resistance of the CNS to stress.

Humans, like other mammals, are unable to produce the desaturations characterizing the 2 series of PUFA; they must find the n-3 and n-6 PUFA precursors,  $\alpha$ -linolenic and linoleic acids, in their diet to synthesize the corresponding long chain PUFA (DHA, AA) which are essential constituents of cell membranes. Due to the competition between both series for the same metabolic enzymes, the n-3/n-6 PUFA ratio in cell membranes is highly dependent on the n-3/n-6 PUFA dietary balance. The growing imbalance between the 2 main PUFA series (n-6 and n-3) in Western diet may induce a restraint availability of DHA for the brain. This may have pathophysiological consequences on brain development and function (e.g. neurotransmission and neuroprotection). We are particularly interested in these effects on the CNS to cope with stress.



## OBJECTIVES

The aim of the study was to compare the response to chronic stress exposure of 6 month-old rats receiving different n-3 PUFA supplies. In this preliminary study, we analysed stress responses through the assessment of different parameters: physiological (growth), biochemical (lipid contents in frontal cortex and plasma corticosterone levels), behavioral (impulsiveness and anxiety level) and synaptic activity (electrophysiology in the CA1 area (hippocampus) and monoamine contents in the frontal cortex).

## MATERIALS AND METHODS

**Animals:** Wistar male rats received either an n-3 PUFA deficient (**deficient rats**), a balanced (providing n-3 PUFA precursor,  $\alpha$ -linolenic acid: **ALA-rats**) or an enriched (providing the precursor and the long-chain n-3 PUFA: **DHA+EPA-rats**) diet. The dietary protocol was applied to the mothers 15 days before mating and then to the offspring after weaning. All the animals are weighted weekly.

**Restraint stress:** At 6-months old, half of the rats were subjected to a chronic restraint stress procedure, 6h/day for 21 days.



**Behavior:** The animals were tested after the stress period in an openfield (latency to move) and in an elevated plus maze (number of entries in the aversive open arms/total arms) for emotional behavior.



Openfield



Elevated Plus Maze

**Electrophysiological measurements:** recordings were obtained at room temperature from the apical dendritic layer of the CA1 area of hippocampus using micropipettes filled with 2 M NaCl. Field EPSPs (fEPSPs) are evoked by electrical stimulation of CA1 afferent fibres located in the stratum radiatum.

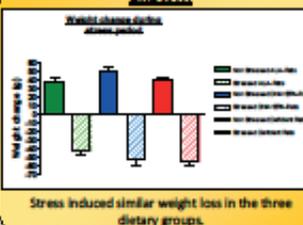
Cellular organisation of rat hippocampus



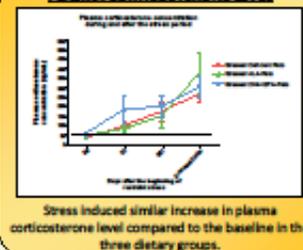
**Plasma corticosterone measurement:** Blood sampling was performed on rat's tail and the corticosterone level was determined by radioimmunoassay (RIA).

**Brain lipid and monoamine contents (GC):** The lipid composition of the 3 main phospholipid classes (phosphatidylethanolamine PE, phosphatidylcholine PC, phosphatidylserine PS) was determined by gas chromatography (GC) and monoamine contents were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection.

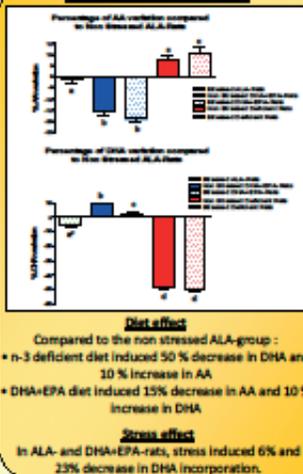
## GROWTH



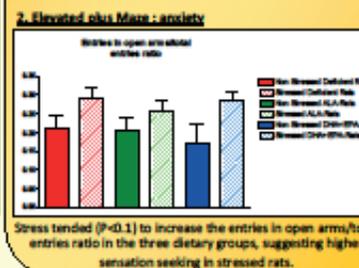
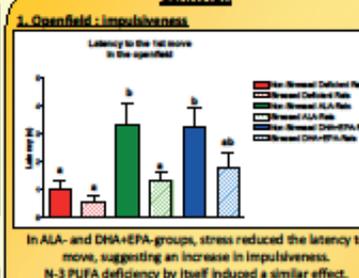
## PLASMA CORTICOSTERONE LEVEL



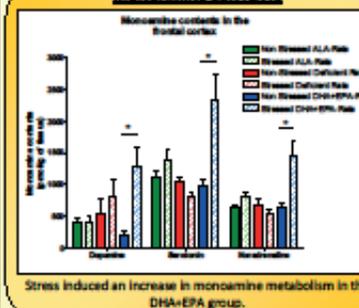
## BRAIN LIPID COMPOSITION



## BEHAVIOR



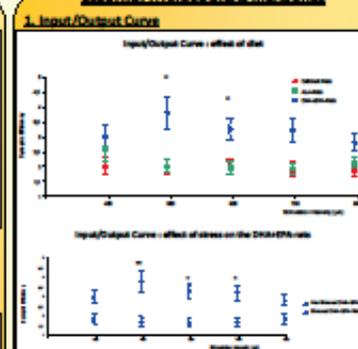
## MONOAMINE CONTENTS



## DISCUSSION-CONCLUSION

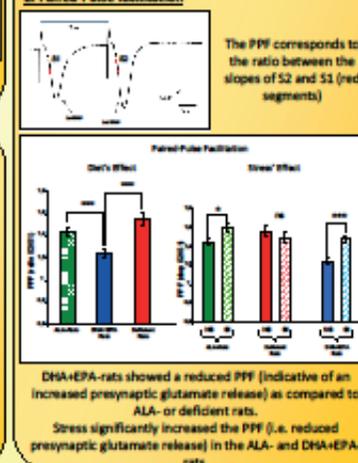
Our results indicate that the dietary n-3 PUFA supply, which determines the PUFA composition of cerebral membranes, influences synaptic function and behavioral stress response. N-3 PUFA enrichment increases synaptic efficiency, but this effect is antagonized by chronic stress. Our results also suggest that n-3 PUFA deficiency induces stress-like effects on some behavioral and electrophysiological traits. Additional studies will be performed to measure the expression of synaptic (V-Glut 1&2, synaptophysin) and stress markers (glucocorticoids receptors) to confirm these observations.

## ELECTROPHYSIOLOGICAL MEASURES



The DHA+EPA-group showed a higher synaptic efficiency than the deficient and the ALA-groups, but this was cancelled by the stress procedure.

## 2. Paired-Pulse facilitation





Latour A. (1), Grintal B. (1), Champell-Potokar G. (1), Hennebelle M. (1), Harbey E. (1), Guesnet P. (1), Vancassel S. (1), Billard J.M. (2), Renault A. (3), Lavielle M. (1) & Denis I. (1)  
 (1) NuReLiCe - INRA, Jouy-En-Josas, France ; (2) INSERM U894, Paris, France ; (3) groupe Saint Hubert, Rungis, France

### INTRODUCTION

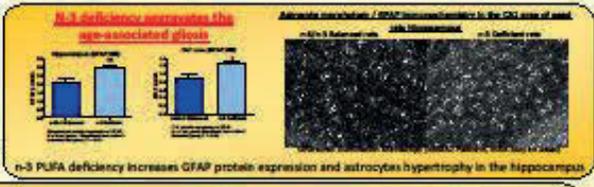
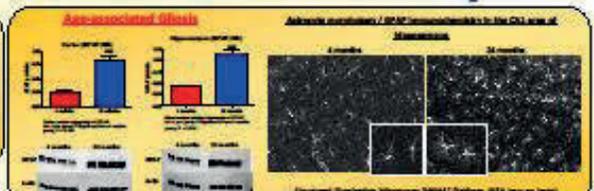
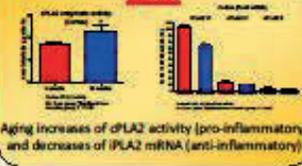
Brain cells (astrocytes and neurons) are characterized by high amounts of docosahexaenoic acid (DHA), the main long chain n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) and arachidonic acid (AA), the main n-6 PUFA, in their membranes phospholipids. The DHA/AA ratio in brain cell membranes is related to the ratio of n-3/n-6 PUFAs in the diet, which is currently too low in western diet. In rodent, a decrease in brain DHA, resulting from n-3 PUFA dietary deprivation, is associated with impaired cognitive capacities and behavioural disturbances. In humans low dietary intakes of n-3 PUFA have been associated to cognitive decline in aging and associated neuropathologies (Alzheimer's disease, depression...). Nevertheless, the role of membrane DHA in cellular physiology and especially in astrocytes is still questioning.

### n-3 and n-6 PUFA (polyunsaturated fatty acids) in diet and cell membrane

The two series of PUFA are characterized by the position of the first desaturation on their carbon chain (n-3 or n-6). Humans, like other mammals, are unable to produce these desaturations and must find the n-3 and n-6 precursors,  $\alpha$ -linolenic and linoleic acids, in their diet (vegetable oil) to synthesize the corresponding long chain PUFA (DHA, AA) which are essential constituents of cell membranes. The balance of n-3/n-6 precursors in the diet determines the n-3/n-6 ratio in cell membranes, because n-3 and n-6 PUFA compete for the same metabolic enzymes. During the 30 last years, the amount of n-6 PUFA has considerably increased in western diet while that of n-3 PUFA has decreased. Unbalanced n-3/n-6 ratio are frequently found in human milk and plasma, and may have physiopathological consequences on brain development and aging.



### Ageing activation of pro-inflammatory pathway



### OBJECTIVES

We have shown that the amount of DHA in membrane phospholipids influences astrocyte physiology (Champell-Potokar et al., 2006; Grintal et al., 2009). Because astrocytes have a key role in maintaining a safe microenvironment for neurons, we have investigated the possible consequences of an n-3 PUFA deficiency on several features of astroglial function in aging rats. We have analysed the impact of n-3 deficiency on:



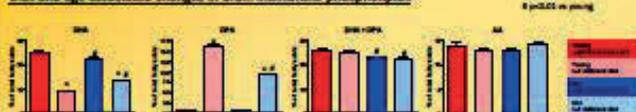
- The emergence of astrogliosis (GFAP expression)
- AA signalling cascade (dPLA2 activity)
- Astroglial regulation of glutamatergic synapse (glutamate uptake and serine racemase expression)
- Glutamatergic transmission (expression of VGLUT1 and synaptophysin).

### n-3 deficiency aggravates the age-associated reduction of glutamate uptake



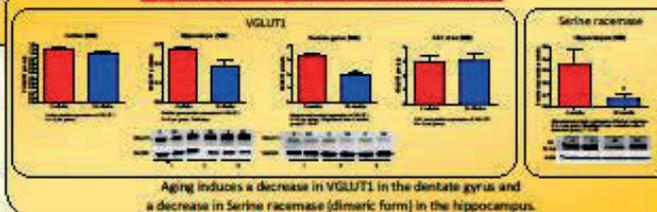
### MATERIALS AND METHODS

#### Diet and age associated changes in brain membrane phospholipids



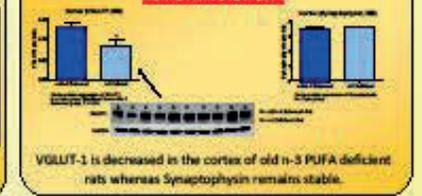
**Western Blotting:** GFAP(Sigma,1/1000), GLT1(Millipore,1/2000), VGLUT1(Millipore,1/500), Synaptophysin(Millipore,1/2000), Serine racemase(Santa cruz,1/500)  
**Enzymatic activity:** Absorbance measurement (405nm) of 5-Thio-2-Nitrobenzoic acid, reaction product of DTNB (5,5'-dithio-bis-2-Nitrobenzoic acid) and a synthetic substrate thiol group (Arachidonoyl Thio-PC) released by dPhospholipase A2 in sn-2 position. (Cayman chemical)  
**Glutamate transport activity:** D-3HAspartate uptake measured on freshly isolated cell suspensions from rat Hippocampus (CA1)  
**Immunohistochemistry:** GFAP(Sigma,1/500), GLT1(Millipore,1/2000)

### Ageing alters glutamatergic transmission in the hippocampus



Ageing induces a decrease in VGLUT1 in the dentate gyrus and a decrease in Serine racemase (dimeric form) in the hippocampus.

### n-3 deficiency alters glutamatergic transmission in the cortex of old rats



VGLUT-1 is decreased in the cortex of old n-3 PUFA deficient rats whereas Synaptophysin remains stable.

### Conclusion and Prospects

In conclusion, these results indicate that omega-3 deficiency increases the astroglial hallmarks of brain aging, such as a reduced glutamate uptake and the hypertrophy of astrocytes. This increased astrocyte aging may be associated to an alteration of the glutamatergic transmission in the cortex and hippocampus, as suggested by the decreased expression of VGLUT-1 found in the cortex of old deficient rats.

Our results give some physiological basis to explain that low n-3PUFA intakes contribute to cognitive decline in humans, as shown by several observational studies. To complete these results, we will study: the level of low-grade chronic inflammation (microglial activation and cytokines production), the efficacy of the glutamatergic synapse (electrophysiological measures) and the cognitive function associated to hippocampal synaptic plasticity (spatial memory).

Hennebelle M.(1), Latour A.(1), Denis S.(1), Champeil-Potokar G.(1), Potier B.(2), Billard J.M.(2), Lavalie M.(1), Vancassel S.(1) and Denis I.(1)

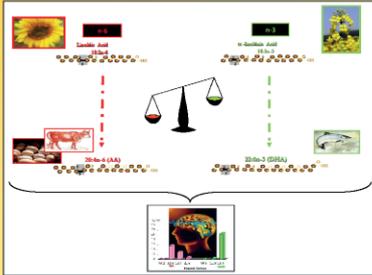
(1) NuReLiCe - INRA, Jouy-En-Josas, France ; (2) INSERM U894, Paris, France

**INTRODUCTION**

An adequate balance between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in neuronal and astrocytic membranes is essential for a healthy functioning of the central nervous system (CNS). Ongoing studies on this topic suggest that a deficiency in n-3 PUFA may be associated with a lower resistance of the CNS to chronic injury induced by stress and aging.

Lipids represent 30 % of brain composition, in which 15 % is DHA. N-3 PUFA play key roles in brain development, neurotransmission, modulation of ion channels or neuroprotection.

The lipid content of brain cell membranes depends on dietary intake. During the last four decades, there is a growing dietary imbalance between the 2 main PUFA series (n-6 and n-3) in western diet, inducing a restraint availability of n-3 PUFA to the brain.



When subjected to a stress, the organism generates a response activating the HPA (hypothalamus-pituitary-adrenals) axis and inducing physiological and behavioral changes for the animals. This response is adaptive, but could become deleterious if it is excessive and/or prolonged.

N-3 PUFA may have a neuroprotective role by delaying and/or attenuating excessive stress responses.

The aim of the study is to compare the stress response of 6 months-old rats receiving different n-3 PUFA supplies.

**MATERIALS AND METHODS**

**Animals :** Wistar male rats received an n-3 PUFA deficient (**deficient rats**), balanced (providing n-3 PUFA precursor,  $\alpha$ -linolenic acid : **balanced rats**) or enriched (providing the precursor and the long-chain n-3 PUFA : **enriched rats**) diet. The dietary protocol was applied to the mothers 15 days before the conception of the experimental rats.

**Restraint stress :** At 6-months old, half of the rats were subjected to a restraint stress, 6h/day for 21 days.

Rat in restraint container



**Brain lipid composition :** The lipid composition of the 3 main phospholipid classes (phosphatidylethanolamine PE, phosphatidylcholine PC, phosphatidylserine PS) was determined by gas chromatography (GC)

**Behaviour :** The animals were tested after the stress period in an openfield and in an elevated plus maze for emotional behaviour.



Openfield

Elevated Plus Maze

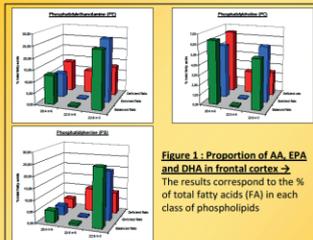


**Electrophysiological measurements :** recordings were obtained at room temperature from the apical dendritic layer of the CA1 area of hippocampus using micropipettes filled with 2 M NaCl. Field EPSPs (fEPSPs) are evoked by electrical stimulation of CA1 afferent fibres located in the stratum radiatum.

Cellular organisation of rat hippocampus



**EFFECT OF DIET ON BRAIN LIPID COMPOSITION**



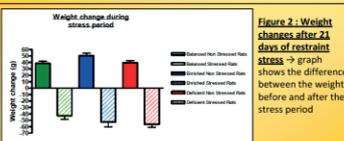
**Figure 1 : Proportion of AA, EPA and DHA in frontal cortex** → The results correspond to the % of total fatty acids (FA) in each class of phospholipids

The n-3 PUFA dietary intakes affect the PUFA composition of the different classes of phospholipids (PE, PC and PS) in the frontal cortex.

Compared to the balanced diet :

- the n-3 PUFA deficiency induces a 50 % decrease in DHA content compensated by an increase in DPA (22:5 n-6).
- the enriched diet results in a decrease in AA (-15 %) and DPA (-50 %) contents. There is also a slight increase in DHA (+ 10 %) in PE and PC and a slight decrease in PS (-15 %).

**EFFECT OF RESTRAINT STRESS ON BODY WEIGHT**

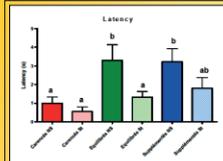


**Figure 2 : Weight changes after 21 days of restraint stress** → graph shows the difference between the weight before and after the stress period

Restraint stress induces a weight loss without difference due to the diet.

**EFFECT OF DIET AND STRESS ON BEHAVIOR**

**1. Openfield : measure of animals' activity**

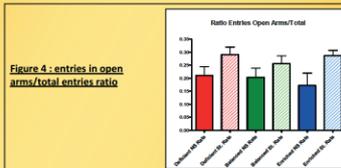


**Figure 3 : Latency to the 1st move in the openfield** → Measurement of the time spent before the rat leaves the first square (4 feet out)

The latency before the 1st move is reduced in the deficient group compared to the 2 other groups, suggesting higher impulsiveness.

Latency is reduced by the restraint stress procedure in the balanced and in the enriched diet groups, reaching level measured in the deficient group.

**2. Elevated plus Maze : analyze of anxiety level**



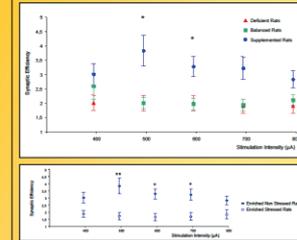
**Figure 4 : entries in open arms/total entries ratio**

Results show a non-significant trend ( $P < 0,1$ ) to a stress-induced increase in the entries in open arms/total entries ratio.

This result suggests higher sensation seeking in restrained rats, which is concordant with their increased impulsiveness.

**EFFECT OF DIET AND STRESS ON ELECTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS**

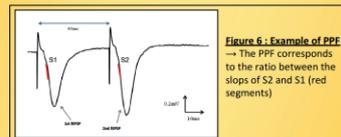
**1. Input/Output Curve**



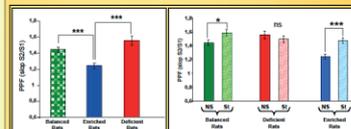
**Figure 5 : Input/Output curve** → The aim is to record, for a same number of neuronal fibres stimulated, the response to stimulus of different intensities, reflecting thus synaptic efficiency

The enriched group presents a greater synaptic efficiency which is cancelled by the exposition to restraint stress.

**2. Paired-Pulse facilitation**



**Figure 6 : Example of PPF** → The PPF corresponds to the ratio between the slopes of S2 and S1 (red segments)



**Figure 6 : Paired-Pulse facilitation** → The aim is to look at the facilitation of the response to the 2<sup>nd</sup> stimulus comparing to the 1<sup>st</sup> one ; this parameter reflects the extent of presynaptic glutamate release.

The PPF was decreased in the n-3 PUFA enriched rats, indicating an increase in the presynaptic glutamate release. This may explain the greater synaptic efficiency in this group.

Restraint stress increases PPF in the balanced and in the enriched rats to the same level as deficient rats, showing here a reduction of the presynaptic glutamate release.

**CONCLUSION**

Our results underline that the dietary n-3 PUFA supply, which determines the lipid content of cerebral cells, influences synaptic function and behavioral traits. Indeed, compared to the balanced group, we observed that a n-3 PUFA deficiency decrease DHA content in frontal cortex while an enrichment increases it and decrease AA content.

Our behavioral study shows that the n-3 PUFA deficiency mimics stress effect by increasing the impulsiveness of the animals. But we do not have any difference between the three dietary groups in the behavioral response induced by restraint stress.

Electrophysiological measures show that the enriched group presents a greater synaptic efficiency in the CA1 area of hippocampus than the two other dietary groups. Presynaptic glutamate release seems to be linked with the n-3 PUFA content of diet and then with the DHA content of cerebral cells. Effects of n-3 PUFA supplies are reversed by stress procedure.

To conclude, these preliminary results show that an enriched n-3 PUFA diet increases synaptic efficiency and presynaptic glutamate release in CA1. Data don't show a protective effect of n-3 PUFA supplementation on the impact of stress on synaptic efficiency and behavior, but suggest a stress-like effect of n-3 PUFA deficiency.

Additional investigations will be performed to explain the observed effects: expression of synaptic markers (V-Glut 1&2, synaptophysine) and stress markers (expression of glucocorticoids receptors and plasma corticosterone measurement)

## n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) deficiency aggravates the age-related alteration in glutamatergic synaptic transmission and astroglial function in rat hippocampus.

A. Létour, B. Grinvald, G. Champell-Potokar, M. Hennebelle, M. Lavielle, S. Vancassel, JM. Billard\*, B. Poitier\*, I. Denis  
 NuReLice - INRA - 78352 Jouy-en-Josas - France \* Université Paris Descartes UMR 894 - Paris - France

### INTRODUCTION

The two series of PUFA are characterized by the position of the first desaturation on their carbon chain (n-3 or n-6). Humans, like other mammals, are unable to produce these desaturations and must find the n-3 and n-6 precursors,  $\alpha$ -linolenic and linoleic acids, in their diet (vegetable oil) to synthesize the corresponding long chain PUFA (DHA, AA) which are essential constituents of cell membranes. The balance of n-3/n-6 precursors in the diet determines the n-3/n-6 ratio in cell membranes, because n-3 and n-6 PUFA compete for the same metabolic enzymes. During the 30 last years, the amount of n-6 PUFA has considerably increased in western diet while that of n-3 PUFA has decreased.

### HYPOTHESIS

The imbalance between n-3 and n-6 PUFA in western diet may therefore result in a low brain DHA status supposed to participate to the age-related cognitive decline and associated brain damages.

### OBJECTIVES

To test this hypothesis, we have compared young (4 month-old) and old (22-24 month-old) rats fed with an n-6/n-3 PUFA balanced diet or n-3 PUFA deficient diet (throughout lifetime) by performing *in vivo* analyses on the CA1 area of hippocampus. n-3 PUFA deficient diet induces a decrease in more than 50% of DHA in rat brain content vs n-6/n-3 balanced diet.

Because astrocytes have a key role in maintaining a safe microenvironment for neurons, we have investigated the possible consequences of an n-3 PUFA deficiency on several features of astroglial function and neurotransmission on aging rats.

We have analysed the impact of n-3 deficiency on:

- Glutamatergic synaptic transmission by measuring
  - excitatory post-synaptic potentials (EPSP)
  - paired-pulses facilitation ratio (PPF, an index of glutamate release)
  - protein expression of VGLUT1, VGLUT2, synaptophysin, GLUT1 and NMDAR1
- Astroglial function by measuring
  - the emergence of astrogliosis (GFAP expression)
  - the number of astrocytes (GFAP positive)
  - astroglial regulation of glutamatergic synapse (glutamate uptake and GLUT1 expression)

### Glutamatergic synaptic transmission

**n-3 deficiency aggravates the age-associated reduction of glutamatergic transmission in CA1 area.**

**n-3 deficiency aggravates the age-associated decrease in VGLUT1 and VGLUT2 protein expression in CA1 area.**

**n-3 deficiency aggravates the age-associated decrease in NMDAR1 protein expression in CA1 area but not GLUT1.**

### Astroglial function

**n-3 deficiency aggravates the age-associated gliosis and increases the number of astrocytes in CA1 area.**

**Age reduces glutamate uptake and GLUT1 protein expression in CA1 area.**

### CONCLUSION

Age was associated to decreased excitatory post-synaptic potentials (EPSP) (-35%), increased paired-pulses facilitation ratio (PPF, an index of glutamate release) (+13%) in the CA1 area of hippocampal slices and decreased expression in VGLUT-1 (-30 to -40% depending on the hippocampal area), indicating a reduced glutamatergic transmission partly due to decreased glutamate pre-synaptic release.

Age also decreased D<sup>2</sup>H-Aspartate uptake by membrane suspensions from the CA1 area due to reduction of GLUT1 protein expression and induced astrogliosis characterized by increased GFAP expression (x1.5).

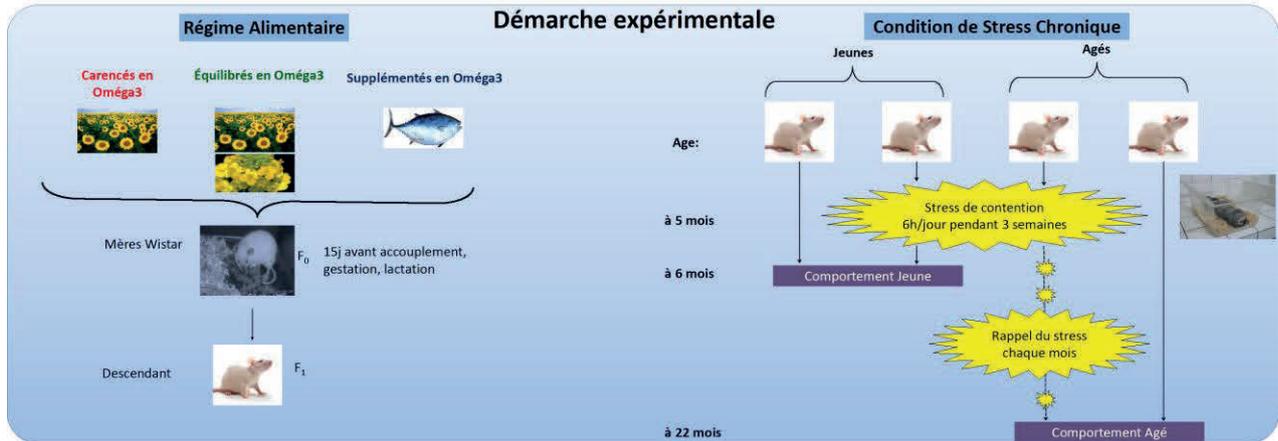
These age-induced changes were significantly reinforced in old n-3PUFA deficient rats (-36% EPSP, +12% PPF, -30% VGLUT-1 expression, -15% D<sup>2</sup>H-Aspartate uptake, +30% GFAP expression, +10% of GFAP positive astrocytes number, reduction of GLUT-1 immunolabeling), while no change was found in young rats. This indicates that n-3PUFA deficiency exacerbates the hallmarks of hippocampal aging characterized by astrogliosis and decreased glutamatergic transmission.

Our results showing the influence of the n-3 PUFA status on hippocampal aging may explain the inverse relationship between n-3 PUFA intakes and cognitive decline found in several observational studies.

Laure Balasse<sup>1</sup>, Marie Hennebelle<sup>2</sup>, Alizée Latour<sup>2</sup>, Monique Lavalie<sup>2</sup>, Isabelle Denis<sup>2</sup>, Sylvie Vancassel<sup>2</sup>, Pascale Gisquet<sup>1</sup>.  
 (1) Univ Paris-Sud, CNRS, UMR 8195, Orsay, F-91405, France  
 (2) INRA, NuRIICe, UR 909, Jouy en Josas, F-78352, France

## Introduction:

Le déséquilibre observé dans l'alimentation occidentale entre les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et AGPI n-6 compromet l'incorporation de l'acide docosahexaénoïque (DHA), principal AGPI n-3 dans le cerveau, dans les membranes des cellules cérébrales. Un apport alimentaire insuffisant AGPI n-3 entraîne donc un déficit du taux de DHA dans le cerveau et il a été montré que ce déficit est associé à une altération de l'émotivité et de capacités cognitives chez le rongeur. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de l'apport alimentaire en AGPI n-3 chez des rats jeunes et âgés lorsqu'ils sont soumis à un stress chronique.



### Caractérisations comportementales

#### Activité motrice et Statut Emotionnel

**Open Field:** Exploration d'une zone ouverte anxiogène (n=16)

**Elevated Plus Maze:** Exploration libre d'une zone anxiogène (n=16)

**Test Sursaut:** Réaction à la surprise (n=16)

**Bou (120db)**

**Activité Motrice:** Distance parcourue, Nombre de redressements, Nbr. d'entrée dans les bras.

**Statut Emotionnel:** Temps de toiletteage (s), % d'entrée dans bras ouvert, Sursaut à 120db.

#### Apprentissage et mémorisation en conditions anxiogènes

**Labyrinthe de Barnes:** Discrimination spatiale en environnement anxiogène. Critère d'efficacité: <2 erreurs moy./jour, 2 jours consécutifs.

**Mémoire Spatiale:** 6 mois n=16, 22 mois n=5 à 10.

**Peur conditionnée:** gestion du stress en situation anxiogène sans échappement. Conditionnement (n=12).

**Extinction (15 +10 sons):** Temps de freezing pendant le son (s).

Les redressements dans l'open-field est plus important chez les animaux carencés en AGPI n-3.

Le stress augmente le temps de toiletteage. La déficience en AGPI n-3 augmente l'émotivité.

Les rats stressés déficients à 6 mois sont plus réactifs. Les rats âgés sont moins efficaces quel que soit le régime alimentaire.

Effet de l'âge, mais pas du traitement (régimes et/ou stress).

L'extinction de la peur conditionnée est plus efficace chez les rats supplémentés stressés.

## En Résumé:

Nos premiers résultats semblent montrer :

- Une augmentation de l'émotivité chez les rats carencés en Oméga 3
- Une augmentation de l'anxiété chez les animaux stressés chroniquement.
- Une tendance à l'augmentation de l'activité exploratoire chez les rats carencés
- Une diminution de la mémoire spatiale et de l'adaptation au changement de consigne en condition anxiogène chez les rats âgés indépendamment du régime.
- Les animaux supplémentés stressés répondent mieux à l'extinction de la peur conditionnée.

