

N°d'Ordre : 4988



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par

Anne LÉTONDOR

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR
SPÉCIALITÉ : NUTRITION

**EFFETS DES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 SUR LES PROCESSUS CIBLES DES RÉTINOÏDES
IMPLIQUÉS DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LA MÉMOIRE AU COURS DU
VIEILLISSEMENT**

Directeur de thèse : Dr Serge Alfos

Soutenue le 16 Décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Laurent BEZIN, Chargé de recherche, CNRS, Lyon	Président
M. Wojciech KREZEL, Directeur de recherche, INSERM, Strasbourg	Rapporteur
M. Frédéric CALON, Professeur, Université Laval, Quebec	Rapporteur
M. Serge ALFOS, Ingénieur d'étude, IPB, Bordeaux	Examineur
Mme Véronique PALLET, Professeur, IPB, Bordeaux	Examineur
Mme Carole VAYSSE, Responsable Département Nutrition et Santé, ITERG, Bordeaux	Examineur

Parce que je te garde auprès de moi, il ya un peu de toi ici,

A Johan, mon fréro.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : Laurent Bezin pour avoir accepté d'en être le président, ainsi que Wojciech Krezel et Frédéric Calon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie également Sophie Layé directrice du laboratoire NutriNeuro ainsi que Carole Vaysse responsable de l'équipe Nutrition métabolisme et Santé de l'ITERG pour m'avoir accueillie.

Je remercie également Serge Alfos, Carole Vaysse, Benjamin Buaud et Véronique Pallet pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, un pied à Nutrineuro, l'autre à l'ITERG. Quand je suis arrivée au labo je faisais des neurosciences, désormais je fais des neurosciences et de la nutrition, et pour ça merci!

J'adresse une mention spéciale pour Serge qui en tant que directeur de thèse (et maître incontesté de la biologie moléculaire !) a su se rendre disponible et certainement faire preuve de patience pour m'encadrer, me former... me supporter (?!) durant ces 3 années, et auprès de qui j'ai beaucoup appris, tant sur le plan scientifique que humain. Merci également à Benjamin pour m'avoir encadrée, formée et initiée aux sciences des lipides !

Merci également à l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet. Je pense notamment à Daniel Béracochéa, Gaëlle Dominguez et Ali Krazem, avec qui j'ai pu collaborer. Un grand merci à Laurence Fonseca, Sandrine Djoukitch et Emeline Montesinos, qui m'ont formé et aidé à extraire tout ces lipides, et sans qui le décryptage des chromatogrammes serait sans doute resté un mystère pour moi!! Merci également à Pascale Roux et ta patate habituelle (et pour ta descente en mon nom dans le stock de noix de l'INRA ;) !, Rachel Hamiani, Mathieu Cadet, Philippe Birac et Maël Guillard ainsi que Véronique DP. pour leur précieuse aide technique. Un petit clin d'œil également à celles qui ont géré l'aspect administratif de tout ça, Julie D, Marie.P.Manain, Stephanie et Muriel B.

Merci également aux étudiants de master Benjamin Servat et Coralie Herrouin et Camille Huet qui ont participé activement à ce projet et ont sans aucun doute contribué à faire avancer le « schmilblick » plus vite.

Bien sûr ces remerciements n'en seraient pas si j'ommétais de citer les personnes qui m'ont permis de m'intégrer et ont grandement contribué à enrichir ma vie sociale tant au laboratoire qu'en dehors. Merci donc aux déménageurs du dimanche Katia et Guillaume, Pauline, Pascale, Serge (encore), Marianne, pour toutes ces discussions scientifiquement très

enrichissantes mais aussi pour ces bons moments partagés autour d'un repas le midi (tout aussi bon...ou presque), ou d'un verre le soir!!

Merci également aux personnes du labo qui ont apporté un regard plus extérieur au projet et bien souvent m'ont donné des conseils avisés. Merci donc aux autres membres de l'équipe : Marie.P. Moisan, JC Helbling, Aline, Nath. A, Jean Benoît, Cathy, Annabelle, notamment pour tous vos conseils au cours des interminables réunions où les étudiants présentent ;). Merci également à Guillaume...et ton point de vue « objectif ! », Muriel D. pour m'avoir apporté tes lumières en comportement ainsi que Sophie.

Un grand merci aux acolytes du bureau des thésards Chloé, Fred, et les membres secrets du clan des barbus (affichés ou dans l'âme) : Fabrice, Damien, Julien... sans qui la vie du bureau aurait été bien monotone...et peut être un peu trop plus beaucoup calme ! Pendant ces trois années j'ai donc pu compter sur votre aide, apprécier votre bonne humeur et nos discussions (peut être pas toujours très scientifiques mais tout aussi intéressantes), et les « pétages de câble » collectifs et réguliers, qui caractérisent tout thésard à partir de la deuxième année...courage Fred et Julien !

Merci également aux étudiants du bureau « du bout du couloir » et aux compagnons de route, Amandine L., Charlotte, JC, Thomas, Julie B. et Julie L., Aurore, Amandine M., Gabi, Anne-Laure, Julie R., Hélène, Helen et Alexia, autant pour les échanges au milieu du couloir que pour les bières bu ensemble, ainsi qu'aux étudiants de master, notamment Amandine C. et Laure, qui ont fait preuve (mais pas que) d'une efficacité redoutable dans le ravitaillement en sucres rapides.

Enfin, je tiens à remercier tous les autres membres de NutriNeurO et de l'ITERG que j'aurai pu oublier dans ces quelques lignes et qui m'ont accompagné tout au long de ces trois années, passés finalement bien vite!

Et bien sûr, je remercie les amis sur qui j'ai pu compter et avec qui j'ai pu prendre un peu de « hauteur », et le mot est faible pour certains week-ends, sur ces trois années !!!

Le dernier paragraphe je le garde pour remercier mes parents et ma sœur pour m'avoir aidée, soutenue, supportée, motivée... vous avez su être là quand il fallait et bien plus encore, et c'est ce qui m'a permis d'en arriver jusque là ! Merci !
...M'enfin faut juste que je vous dise...Papa, Maman,... ça y est c'est décidé j'arrête les études ;)

Avant-propos

Le travail de cette thèse a été effectué dans le cadre d'une collaboration CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche) n°145/2011 tripartite entre l'ANRT (Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie), l'ITERG (Institut des Corps gras) et le laboratoire INRA NutriNeuro (Nutrition et Neurobiologie intégrée, UMR 1286). Les résultats de ce travail ont donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

Publications avec comité de lecture en tant que 1^{er} auteur :

Létondor A., Buaud B., Vaysse C., Djoukitch S., Montesisnos E., Herrouin C., Servat B., Layé S., Pallet V., Alfos S. Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 LC-PUFA supplemented aged rats. Soumise à British Journal of Nutrition.

Létondor A., Buaud B., Vaysse C., Djoukitch S., Herrouin C., Servat B., Richard E., Layé S., Pallet V., Alfos S. N-3 Polyunsaturated fatty acids and vitamin A have synergetic effect on spatial memory in aged rats. En preparation pour soumission.

Communications par affiche :

Létondor A., Alfos S., Servat B., Buaud B., Vaysse C., Pallet V. Effets de suppléments nutritionnelles en AGPI-LC n-3 et/ou vitamine A sur la plasticité synaptique au cours du vieillissement.

. 12^{ème} journée de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'université de Bordeaux, Arcachon, 28 mars 2012.

. Journée de la SFR Neurosciences de Bordeaux, Bordeaux, 29 mai 2012.

Létondor A., Beracochéa D., Krazem A., Herrouin C., Buaud B., Vaysse C., Pallet V., Alfos S. DHA improves spatial memory and modulates gene expression in the brain of aged mice. 13^{ème} journée de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'université de Bordeaux, Arcachon, 10 avril 2013.

Létondor A., Beracochéa D., Krazem A., Herrouin C., Buaud B., Vaysse C., Pallet V., Alfos S. DHA improves spatial memory in aged mice, correlation with RXR γ mRNA expression in the hippocampus. Congrès de la Société Française des Neurosciences (SFN), Lyon, 21-24 mai 2013.

Létondor A., Buaud B., Vaysse C., Servat B., Layé S., Pallet V., Alfos S. n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin A have synergic effects on spatial memory in aged rats. Young scientist symposium, Bordeaux, IECB, 27-28 mai 2013.

Effets des AGPI-LC n-3 sur les processus cibles des rétinoïdes impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire au cours du vieillissement

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement cérébral, notamment dans le maintien des processus de plasticité synaptique et de mémoire au cours du vieillissement. Il est maintenant bien admis que ces acides gras peuvent moduler la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques *via* leur liaison à des récepteurs nucléaires tels que les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) et les RXR (retinoid X receptor). Les RXR sont les partenaires communs d'hétérodimérisation de nombreux autres récepteurs, dont le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (AR), RAR (retinoic acid receptor), métabolite actif de la vitamine A. Ainsi, les RXR jouent un rôle majeur dans la régulation des voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail était de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'action des AGPI-LC n-3 sur les processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances mnésiques au cours du vieillissement, notamment en abordant de manière spécifique les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes. Les approches expérimentales mises en place ont consisté notamment à évaluer chez le rat âgé les effets de suppléments nutritionnelles en AGPI-LC n-3 et/ou vitamine A sur les performances de mémoire, ainsi que l'action du DHA administré seul sur différents types de mémoire dépendants de l'hippocampe.

Nos principaux résultats montrent une altération du métabolisme des acides gras et de la vitamine A au cours du vieillissement. Ces changements métaboliques sont associés à une hypoexpression des voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes, accompagnée de déficits mnésiques. Nous montrons par ailleurs un effet synergique d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3 et en vitamine A sur le maintien des performances de mémoire chez l'animal âgé. De plus, cette supplémentation permet de prévenir, dans l'hippocampe, les changements de composition en AGPI n-3 ainsi que l'hypoexpression des ARNm de RXR γ et de kinases régulées par l'AR et les AGPI n-3.

Ces résultats plaident en faveur d'une action synergique des AGPI-LC n-3 et de la vitamine A sur le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement, *via* une action combinée sur leurs voies de signalisation, lesquelles participeraient ainsi au maintien de certains processus de plasticité synaptique sous-tendant la mémoire et qui se trouvent être altérés avec l'âge.

Mots clés : Acide gras polyinsaturé à longue chaîne n-3, vitamine A, récepteurs nucléaires, cerveau, mémoire, vieillissement

Effects of n-3 LC-PUFAs on retinoid target processes involved in synaptic plasticity and memory during aging

N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFAs) play a critical role in brain functioning, notably in the maintenance of synaptic plasticity and memory processes during aging. It is now well accepted that n-3 PUFAs can modulate transcription of genes involved in synaptic plasticity processes underlying the memory performances through binding and activating nuclear receptors such as PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), and RXRs (retinoid X receptors). RXRs are the common heterodimerization partner of numerous nuclear receptors, among them the retinoic acid receptor (RAR), which binds retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A. Thus, RXRs play a key role in the regulation of n-3 PUFA and retinoid signaling pathways.

In this context, the aim of this work was to study the mechanisms involved in the action of n-3 PUFAs on neurobiological processes underlying the memory performances during aging, and more particularly by assessing specifically the molecular mechanisms involved in interactions between n-3 PUFA and retinoid signaling pathways. For this purpose, we studied the effects of dietary supplementations in n-3 PUFAs and/or vitamin A on memory performances in aged rats. We also studied the specific effect of unesterified DHA pharmacological treatments on different hippocampal-dependent memory tasks.

Our main results showed impairments in fatty acid and vitamin A metabolism during aging. These modifications were associated with an hypoexpression of n-3 PUFA and retinoid signaling pathways, and memory deficits. Furthermore, we demonstrated a synergetic effect of the joint n-3 LC-PUFA and vitamin A dietary supplementation on the maintenance of memory performances in aged rats. Moreover, in the hippocampus, this supplementation prevented the n-3 PUFA compositional changes, and also the mRNA hypoexpression of RXR γ and of several kinases regulated by RA and n-3 PUFAs which were observed during aging.

These results suggest a beneficial synergetic effect of n-3 LC-PUFAs and vitamin A on the maintenance of memory performances during aging, through a combined action on their signaling pathways, which could be involved in the maintenance of synaptic plasticity processes underlying memory performances impaired during aging.

Key Words: n-3 polyunsaturated fatty acids, vitamin A, nuclear receptors, brain, memory, aging.

Table des matières

Table des illustrations -----	15
Liste des tableaux -----	16
Liste des abréviations -----	17
Introduction -----	19
I - Données générales sur les acides gras polyinsaturés -----	21
I.1 - Présentation des acides gras polyinsaturés:-----	21
I.2 - Biodisponibilité des acides gras polyinsaturés-----	24
I.3 - Devenir métabolique des acides gras polyinsaturés-----	28
I.3.1 - Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés :-----	28
I.3.2 - Biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne-----	30
I.3.3 - Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs-----	32
I.3.3.1 - Eicosanoïdes-----	32
I.3.3.2 - Protectines et résolvines-----	34
I.3.3.3 - Autres métabolites oxygénés ou oxydés et anandamides-----	34
I.4 – Données de consommation des acides gras polyinsaturés-----	35
I.4.1 - Sources alimentaires des AGPI-----	35
I.4.2 - Apports nutritionnels conseillés et données de consommation des acides gras polyinsaturés :-----	37
I.4.2.1 - Apports nutritionnels conseillés-----	37
I.4.2.2 - Données de consommation-----	38
I.5 - Rôles physiologiques des AGPI-----	41
I.5.1 - Rôle structural des AGPI-----	41
I.5.2 - Les acides gras polyinsaturés, précurseurs de médiateurs bioactifs-----	42
I.5.3 – Les acides gras polyinsaturés, modulateurs de l’expression génique-----	44
I.5.4 - Les acides gras polyinsaturés, sources énergétiques-----	46
II - Le cerveau, organe cible des acides gras polyinsaturés -----	48
II.1 - Données de composition en AGPI au sein du cerveau-----	48
II.2 - Accumulation des AGPI n-3 au cours du développement-----	51
II.3 - Mécanismes d’apport des AGPI au sein des membranes cérébrales-----	52
II.3.1 - Métabolisme intracérébral-----	52

II.3.2 - Apport des acides gras polyinsaturés à longue chaîne au cerveau par la circulation sanguine -----	53
II.3.2.1 - Forme d'apport plasmatique des AGPI -----	56
II.3.2.2 - Forme d'apport alimentaire des AGPI -----	57
II.4 - Rôles des acides gras polyinsaturés dans le fonctionnement cérébral-----	58
II.4.1 - Importance du niveau d'apport en acides gras polyinsaturés: -----	58
II.4.2 - AGPI n-3 et modulation de la plasticité cérébrale -----	60
II.4.3 - AGPI n-3 et modulation des capacités mnésiques -----	61
III - Données générales sur la vitamine A -----	64
III.1 - Présentation des rétinoïdes-----	64
III.2 - Métabolisme général de la vitamine A -----	66
III.3 - Données de consommation en vitamine A -----	70
III.3.1 - Sources alimentaires de la vitamine A -----	70
III.3.2 - Apports nutritionnels conseillés et données de consommation en vitamine A -----	70
III.4 - Rôles physiologiques des rétinoïdes -----	73
III.4.1 – Rôles généraux des rétinoïdes-----	73
III.4.2 – Les rétinoïdes, modulateurs de l'expression génique -----	73
IV - Le cerveau, organe cible de l'acide rétinoïque -----	75
IV.1 – Transport du rétinol vers le cerveau -----	75
IV.2 - Métabolisme cérébral -----	75
IV.3 - Rôle de l'acide rétinoïque dans le fonctionnement cérébral -----	76
IV.3.1 - Acide rétinoïque et modulation de la plasticité cérébrale-----	76
IV.3.2 - Acide rétinoïque et modulation des performances mnésiques -----	77
V - Mode d'action cellulaire des AGPI n-3 et des rétinoïdes-----	79
V.1 - La superfamille des récepteurs nucléaires -----	79
V.1.1 - Structure générale des récepteurs nucléaires -----	81
V.1.2 - Mode d'action génomique des récepteurs nucléaires-----	83
V.2 - Les récepteurs nucléaires des acides gras-----	84
V.2.1 - Les PPAR-----	84
V.2.2 - Distribution tissulaire des PPAR -----	85
V.2.3 - Localisation des PPAR dans le SNC -----	86
V.2.4 - Rôles des PPAR dans le cerveau mature -----	87
V.2.5 - Les RXR -----	88
V.3 – Les récepteurs nucléaires des rétinoïdes -----	88

V.3.1 - Les RAR et les RXR -----	88
V.3.2 – Régulation de l’expression des récepteurs nucléaires de l’AR -----	89
V.3.3 - Distribution tissulaire des récepteurs nucléaires de l’AR -----	90
V.3.4 - Gènes cibles de l’acide rétinoïque dans le cerveau mature -----	91
V.4 - Action non génomique des récepteurs nucléaires des acides gras et de l’acide rétinoïque----	94
VI - Interactions entre les voies de signalisation des acides gras polyinsaturés n-3 et de l’acide rétinoïque -----	97
VI.1 - Interactions métaboliques -----	97
VI.2 - Interactions nucléaires -----	98
VII - Le vieillissement cérébral -----	100
VII.1 - Données générales sur le vieillissement cérébral-----	100
VII.2 – Processus mnésiques et altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement -----	101
VII.2.1 - Implication de l’hippocampe et du cortex préfrontal dans les processus mnésiques--	101
VII.2.2 - Altérations de la mémoire au cours du vieillissement :-----	102
VII.2.3 - Altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement-----	104
VII.2.3.1 - Altérations morphologiques-----	104
VII.2.3.1 - Altérations de la plasticité cérébrale-----	105
VII.3 - Rôle des AGPI n-3 au cours du vieillissement-----	107
VII.3.1 - Conséquences du vieillissement sur le contenu cérébral en AGPI n-3 -----	107
VII.3.2 - Rôle des AGPI-LC n-3 dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement-----	108
VII.4 - Rôle de la vitamine A au cours du vieillissement -----	111
VII.4.1 - Conséquences du vieillissement sur le métabolisme de la vitamine A -----	111
VII.4.2 - Rôle de la vitamine A dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement-----	113
Objectifs de la thèse -----	115
Chapitre 1 : Effets du vieillissement et d’une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA sur les contenus sanguins et cérébraux en AGPI-LC n-3 : Recherche de biomarqueurs sanguins du statut cérébral en DHA-----	119
Chapitre 2: Effets de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A sur la mémoire spatiale au cours du vieillissement et implication des voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes. -----	159
Chapitre 3: L’administration de DHA non estérifié améliore les performances mnésiques de souris âgées : Implication du RXRγ-----	199
Discussion générale-----	229
I - Résumé des principaux résultats obtenus -----	232

I.1 : Première étude : Effets du vieillissement et d'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA sur les contenus sanguins et cérébraux en AGPI-LC n-3 : Recherche de biomarqueurs sanguins du statut cérébral en DHA -----	232
I.2 : Effets de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A sur la mémoire spatiale au cours du vieillissement et implication des voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes -----	233
I.3 : Etude des effets d'injections de DHA non estérifié sur les performances mnésiques d'animaux âgés : Implication du RXR γ -----	235
II – Les altérations métaboliques et cellulaires des voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes induites par le vieillissement participent à la mise en place des déficits mnésiques	236
II.1 : Le vieillissement est associé à des altérations métaboliques et à des modifications de la composition cérébrale en AGPI-LC n-3-----	236
II.2 : Le vieillissement est associé à des altérations des voies de signalisation cellulaire des AGPI n-3 et des rétinoïdes, participant à la mise en place des déficits mnésiques -----	239
III : Une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A permet de prévenir les déficits mnésiques liés à l'âge-----	241
III.1 : Conséquences métaboliques de la supplémentation en AGPI n-3 et en vitamine A au cours du vieillissement-----	241
III.2 : La supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A permet de maintenir les voies de signalisation cellulaires des AGPI n-3 et des rétinoïdes et participe au maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement -----	242
Perspectives -----	245
Etude chez l'animal et mécanistique -----	245
Perspectives chez l'Homme -----	246
Conclusion -----	248
Références bibliographiques -----	249

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Structure d'un triacylglycérol et d'un glycérophospholipide</i>	22
<i>Figure 2 : Structure et nomenclature des représentants des principales familles d'acides gras</i>	23
<i>Figure 3 : Schéma général de la digestion des lipides</i>	25
<i>Figure 4 : Absorption des lipides à travers les entérocytes</i>	25
<i>Figure 5 : Devenir métabolique des acides gras dans la cellule</i>	29
<i>Figure 6 : Biosynthèse des acides gras insaturés et familles d'acides gras</i>	31
<i>Figure 7 : Voies de synthèse enzymatique des prostanoïdes (voie des cyclooxygénases) et des leucotriènes (voie de la 5-lipoxygénase)</i>	33
<i>Figure 8 : Mécanisme généraux de régulation de l'expression de gènes par les acides gras</i>	45
<i>Figure 9 : Composition en acides gras du cortex frontal humain</i>	50
<i>Figure 10 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique</i>	55
<i>Figure 11 : Formules chimiques et voies de synthèse de quelques rétinoïdes</i>	65
<i>Figure 12 : Métabolisme général de la vitamine A chez les vertébrés</i>	67
<i>Figure 13 : Métabolisme intracellulaire de l'acide rétinoïque</i>	69
<i>Figure 14: Organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires</i>	80
<i>Figure 15: Structure en domaines des récepteurs nucléaires</i>	82
<i>Figure 16: Modèle du mécanisme d'activation de la transcription par l'hétérodimère RAR/RXR</i>	82
<i>Figure 17 : Mécanisme d'action non génomique des récepteurs nucléaires, exemple du RAR</i>	96
<i>Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes interactions nucléaires entre la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des AGPI n-3</i>	99
<i>Figure 19 : Classification des systèmes de mémoire</i>	103
<i>Figure 20 : Illustration du déclin cognitif lors du vieillissement normal chez l'Homme</i>	103

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Composition moyenne en AGPI n-3 et n-6 de quelques aliments</i>	36
<i>Tableau 2 : Apports nutritionnels conseillés en acides gras pour un adulte consommant 2000 Kcal</i>	38
<i>Tableau 3 : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation d'après différentes études</i>	40
<i>Tableau 4 : Principales fonctions physiologiques régulées par les acides gras polyinsaturés n-3</i>	47
<i>Tableau 5 : Composition en acides gras de différents tissus d'origine humaine</i>	50
<i>Tableau 6 : Teneurs en rétinol et β-carotène d'aliments riches en vitamine A</i>	71
<i>Tableau 7 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine A pour certaines catégories de la population française</i>	72
<i>Tableau 8 : Symptômes observés en cas de déficience ou d'excès d'apport en vitamine A</i>	74
<i>Tableau 9 : Localisation de PPARδ dans le système nerveux central, détecté chez le rat et la souris</i>	87
<i>Tableau 10 : Distribution cérébrale des récepteurs aux rétinoïdes RAR et RXR et de leurs protéines de liaison CRBP et CRABP</i>	91
<i>Tableau 11 : Liste de gènes cibles de l'acide rétinoïque</i>	92

Liste des abréviations

ADH	Alcool déshydrogénase
AET	Apport énergétique total
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGPI-LC	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS	Acide gras saturé
AGT	Acide gras totaux
AKT	Protéine kinase B
ALA	Acide α -linoléique, 18:3 n-3
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionic acid
ANC	Apports nutritionnels conseillés
AR	Acide rétinoïque
ARA	Acide arachidonique, 20:4 n-6
BHE	Barrière hémato-encéphalique
β2M	β 2 microglobuline
CAT	Carnitine acyl transférase
CAMKII	Calmodulin-dependant protein kinase II
COX	Cyclo-oxygénase
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
CRBP	Cellular retinol binding protein
CREB	cAMP response element-binding protein
DGLA	Acide dihomogamma-linoléique, 20:3 n-6
DHA	Acide docosahexaénoïque, 22:6 n-3
DPA	Acide docosapentaénoïque, 22:5 n-6 ou n-3
EPA	Acide eicosapentaénoïque, 20:5 n-3
ER	Equivalent rétinol

ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
FABP	Fatty acid binding protein
FATP	Fatty acid transport protein
GAP-43	Neuromoduline
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
LA	Acide linoléique, 18:2 n-6
LOX	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
NMDA	<i>N</i> -méthyl- <i>D</i> -aspartate
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Prostaglandine
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PLT	Potentialisation à long terme
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element
Ppib	Peptidylpropyl isomérase B
PS	Phosphatidylsérine
PSD-95	Post-synaptic density protein-95
RAR	Retinoic acid receptor
RARE	Retinoic acid response element
RC3	Neurogranine
RXR	Retinoid X receptor
SM	Sphingomyéline
SNC	Système nerveux central
TG	Triglycéride
THA	Acide tétracosahéxaénoïque
TrkA	Tropomyosin-related kinase A
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
UI	Unité internationale

Introduction

Le vieillissement ou sénescence est un processus normal et inéluctable touchant tous les êtres vivants à partir de leur maturité et se traduisant par de multiples modifications (ou altérations) intervenant aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau des tissus et organes. Il s'agit d'un processus multifactoriel, résultant de causes pouvant être génétiques comme environnementales, aboutissant à l'affaiblissement progressif des capacités physiques et psychiques de l'individu. A ce titre, le vieillissement cérébral est à l'origine d'altérations des fonctions cognitives et notamment de la mémoire, pouvant conduire à une dépendance dans le cas de pathologies neurodégénératives, génératrice d'un fardeau économique. Dans le contexte actuel de vieillissement de la population, devenu aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique, il est donc primordial de développer des stratégies de prévention afin de retarder les effets délétères du vieillissement cérébral.

Dans cette optique, l'alimentation, facteur environnemental auquel l'individu est exposé tout au long de sa vie, fait partie des nouvelles hypothèses de recherche sur laquelle il semble possible d'agir. Parmi les nutriments d'intérêt pour le cerveau, ce travail s'est focalisé sur deux types de nutriments : les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) et plus particulièrement ceux de la série n-3, et un nutriment liposoluble qu'est la vitamine A. Ce choix repose sur un ensemble de données de la littérature mettant en évidence une implication de ces nutriments dans le fonctionnement cérébral adulte.

Le cerveau est après le tissu adipeux, l'organe le plus riche en lipides et notamment en AGPI-LC n-3. Il a été montré que la consommation d'aliments riches en AGPI-LC n-3 participerait au maintien des fonctions cognitives au cours du vieillissement normal ou pathologique (Dyall S. C. and Michael-Titus 2008). Parmi les différents rôles physiologiques attribués à ces acides gras, il est fait mention de leur implication dans la modulation de l'expression génique. Ce mécanisme d'action met en jeu des facteurs de transcription parmi lesquels, les récepteurs nucléaires PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) et RXR (retinoid X receptors) qui régulent l'expression de gènes cibles impliqués dans la modulation de la plasticité synaptique. Le récepteur RXR est également décrit comme pouvant lier l'acide 9-*cis* rétinolique, métabolite actif de la vitamine A.

La vitamine A est un nutriment essentiel dont le métabolite actif, l'acide rétinoïque (AR), est connu depuis longtemps pour jouer des rôles majeurs au cours du développement embryonnaire. Ce n'est que plus récemment que son rôle dans le fonctionnement du cerveau adulte a été décrit. En effet, l'AR peut réguler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de la plasticité cérébrale par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires RAR (retinoic acid receptors) et RXR. De plus des données obtenues dans notre laboratoire ont montré que le vieillissement était associé à une baisse de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes, participant ainsi à la mise en place des troubles mnésiques liés à l'âge (Etchamendy et al. 2001, Mingaud et al. 2008).

Plusieurs données font également état de multiples niveaux d'interaction entre les voies d'action des AGPI et de la vitamine A dans l'organisme. Ainsi, il a été rapporté non seulement des interactions au niveau métabolique entre ces nutriments mais également au niveau de leur action cellulaire via notamment leurs récepteurs nucléaires. Les RXR jouent un rôle majeur dans ces interactions, d'une part en tant que partenaires d'hétérodimérisation communs avec les PPAR et les RAR et, d'autre part, en tant que récepteurs nucléaires pouvant lier à la fois l'acide 9-*cis* rétinoïque et certains AGPI. L'ensemble de ces données suggère ainsi de possibles effets synergiques entre les voies d'action des AGPI et de la vitamine A sur la régulation des mécanismes moléculaires sous-tendant les processus mnésiques.

Dans ce contexte bibliographique, l'objectif de notre travail a consisté à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'action bénéfique des AGPI n-3 sur les processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances mnésiques au cours du vieillissement, notamment en abordant de manière spécifique les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les voies de signalisation des AGPI et de la vitamine A.

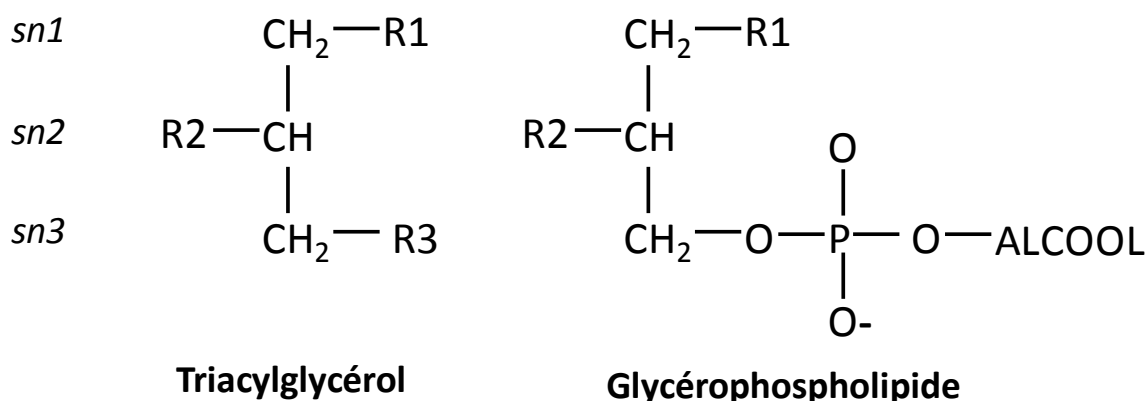
I - Données générales sur les acides gras polyinsaturés

Dans le contexte actuel de vieillissement de la population, comprendre les mécanismes associés au vieillissement cérébral normal ou pathologique, en particulier le déclin cognitif et mnésique, représente en enjeu majeur de santé publique.

Parmi les facteurs environnementaux ayant une incidence sur le vieillissement cérébral, l'alimentation, en particulier lipidique, fait partie des pistes de recherche actuelles. Certains nutriments apparaissent en effet indispensables au fonctionnement cérébral. C'est le cas des acides gras polyinsaturés et de la vitamine A.

I.1 - Présentation des acides gras polyinsaturés:

Chez l'Homme, les lipides représentent 35 à 45% des besoins énergétique journaliers. Ils sont présents dans l'alimentation sous deux formes majoritaires : les triglycérides (ou triacylglycérols, TG) qui représentent 95 à 98% des lipides alimentaires ingérés et les phospholipides (PL). Les TG sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras (AG). Dans l'organisme, les triglycérides, situés principalement dans le tissu adipeux, constituent la forme majoritaire de stockage de l'énergie. Les phospholipides quant à eux sont des lipides dits « de structure » car ce sont les principaux constituants des membranes cellulaires (Legrand 2007). Ils regroupent les glycérophospholipides et les sphingomyélines et sont constitués le plus souvent d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique lié lui-même à un alcool aminé ou un groupement osidique (glycérophospholipides), ou d'une molécule de sphingosine liée à un alcool aminé (sphingomyéline) (*figure 1*).



sn1 à *sn3* sont les positions stéréochimiques des atomes de carbone sur le squelette glycérol. *sn1* et *sn3* sont des positions dites « externes », *sn2* est une position dite « interne ». R1 à R3 représentent les groupements acyl d'acides gras

Figure 1 : Structure d'un triacylglycérol et d'un glycérophospholipide

Les molécules d'AG qui composent les TG et les PL proviennent soit de l'alimentation, soit du métabolisme énergétique. Ces AG sont constitués d'un squelette hydrocarboné comprenant généralement 12 à 22 atomes de carbone, et lié à un groupement méthyle (CH₃) à une extrémité et à un groupement carboxyle (COOH) à l'autre. Ils sont classés en trois grandes catégories en fonction du nombre d'insaturations présentes sur la chaîne de carbone : Les acides gras saturés (AGS) ne comprenant aucune double liaison, les acides gras monoinsaturés (AGMI) possédant une seule double liaison et les acides gras polyinsaturés (AGPI), possédant au moins deux double liaisons.

La nomenclature dite « oméga » des AG repose sur le nombre d'atomes de carbone d'une part, et le nombre et l'emplacement des doubles liaisons d'autre part. Par convention, les physiologistes utilisent la notation suivante: C_x:_y n-z, où x représente le nombre d'atomes de carbone, y, le nombre de double liaisons et z, l'emplacement de la première double liaison numéroté à partir de l'extrémité méthyle (Legrand 2007) (*figure 2*).

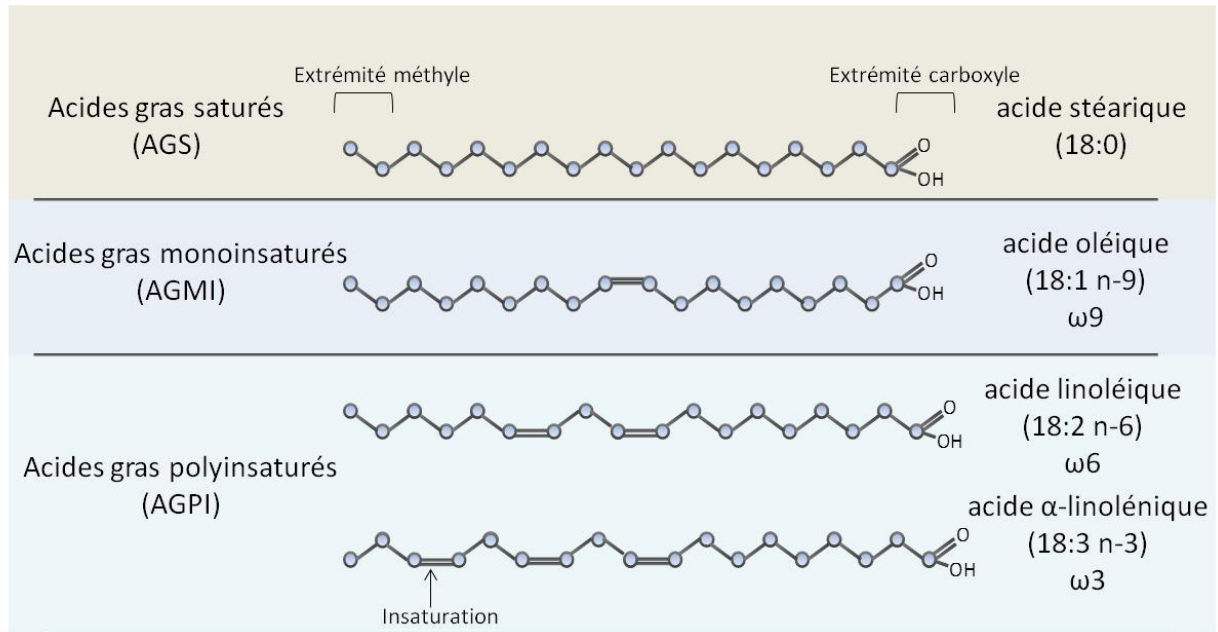


Figure 2 : Structure et nomenclature des représentants des principales familles d'acides gras

Adapté de Guesnet et al. 2005

On distingue ainsi deux familles principales d'AGPI, ceux de la série n-6 (ou omégas 6) et ceux de la série n-3 (ou omégas 3) ayant pour précurseurs respectifs l'acide linoléique (18:2 n-6, LA) et l'acide α-linolénique (18:3 n-3, ALA). Ces deux précurseurs, sont dits « indispensables » car non synthétisables par les vertébrés dont les cellules ne possèdent pas, contrairement aux cellules végétales, les enzymes (Δ -12 et Δ -15 désaturases) permettant d'introduire des doubles liaisons à l'extrémité méthyle et la production successive du LA et de l'ALA à partir de l'acide oléique (18:1 n-9) (Wallis et al. 2002). Le LA et l'ALA sont apportés exclusivement par l'alimentation et sont rigoureusement requis pour la croissance normale et les fonctions physiologiques des cellules (Burr and Burr 1929, Guesnet et al. 2005). Le LA et l'ALA peuvent ensuite être convertis dans l'organisme en dérivés à longues chaînes (AGPI-LC), qualifiés d'« acides gras conditionnellement indispensables » puisque synthétisables mais strictement obligatoires. Ces deux familles d'AG sont regroupées sous le terme d' « acides gras essentiels ». (Legrand 2007).

I.2 - Biodisponibilité des acides gras polyinsaturés

Les AG apportés par l'alimentation ne le sont pas sous forme dite « libre » ou « non estérifiée » mais sont généralement amenés sous forme de divers esters plus ou moins complexes. Les triglycérides, diglycérides et les phospholipides représentent 99% des AG alimentaires. Cependant, la biodisponibilité des AG provenant de l'alimentation dépend de l'ensemble des étapes du processus de digestion, comprenant l'émulsification, l'hydrolyse l'absorption et le transport vers les tissus de l'organisme. Le bon déroulement de ces étapes résulte de l'influence de nombreux paramètres tels que le statut enzymatique de l'individu, la composition du bol alimentaire, les caractéristiques physiques et chimiques propres à chaque AG (longueur de la chaîne, position des doubles liaisons, solubilité, polarité...), la nature du vecteur (triglycéride, phospholipide, ester de cholestérol...) voire la position de la liaison au glycérol, qui conditionnent le devenir métabolique des AG (Mu and Hoy 2004).

Brièvement, la première étape déterminante du processus de digestion est l'émulsification. Par définition, les lipides sont insolubles dans l'eau ou dans une phase aqueuse. Pour être digérés dans un milieu aqueux, les lipides alimentaires sont émulsifiés par les sels biliaires au niveau de l'intestin, permettant la formation de micelles mixtes contenant des AG libres et des 2-mono-acylglycérols (*figure 3*).

Après l'étape d'émulsification, les lipides sont hydrolysés par l'action successive de diverses lipases. Chez l'Homme, elle débute au niveau de l'estomac par l'action de la lipase gastrique qui permet la production d'AG libres et de diglycérides à partir de 10 à 30% des TG alimentaires. Elle se poursuit ensuite par l'action de la lipase pancréatique au niveau du duodénum et de la lipase intestinale dans l'intestin grêle. Le processus de digestion est différent pour les PL alimentaires qui ne sont hydrolysés que par l'action de la phospholipase pancréatique. Notons par ailleurs que l'action des diverses lipases est spécifique de la position des AG sur le squelette de glycérol, pouvant ainsi influencer leur devenir métabolique et leur biodisponibilité (Mu and Hoy 2004).

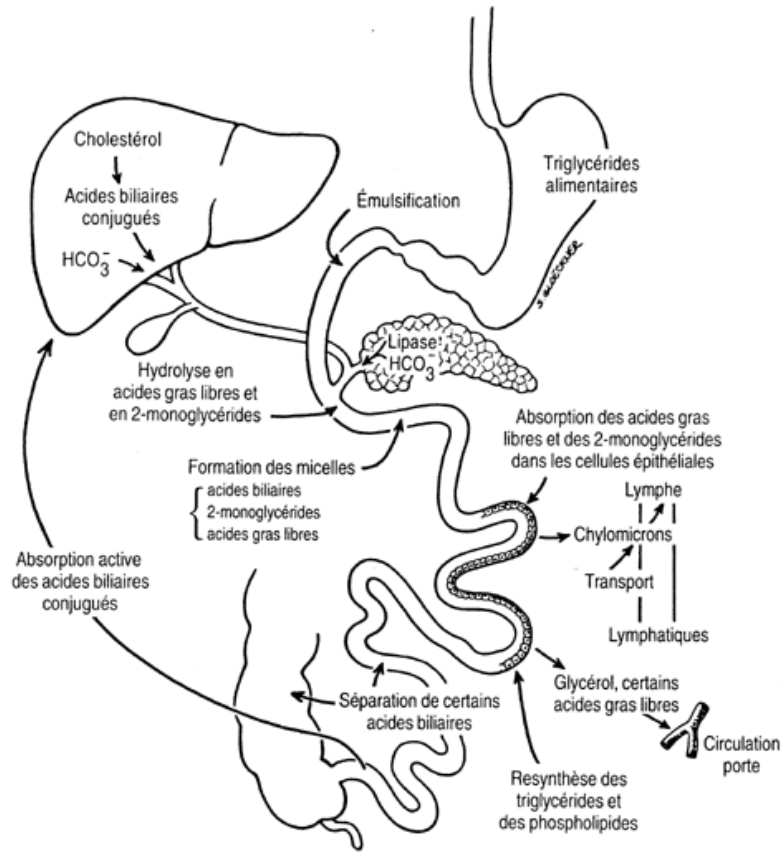


Figure 3 : Schéma général de la digestion des lipides

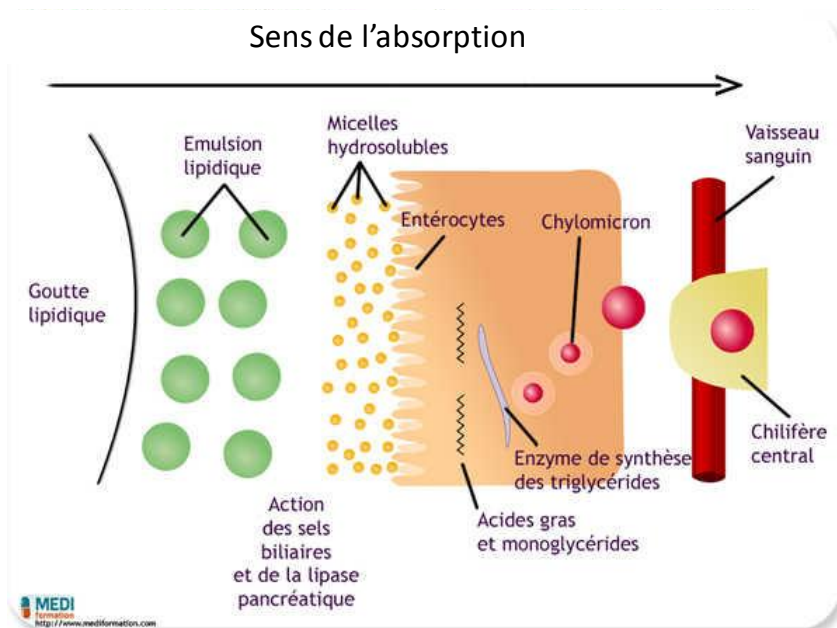


Figure 4 : Absorption des lipides à travers les entérocytes

L'étape d'absorption, comme les autres étapes de la digestion peut également influencer la biodisponibilité des molécules d'AG. Elle se fait au niveau des microvillosités intestinales où les AG, les 2-monoglycérides et les lysophospholipides résultant de l'hydrolyse sont absorbés dans les entérocytes puis acheminés vers le réticulum endoplasmique pour être recombinaison en TG et en PL. La plupart des données sur l'étude du mécanisme d'absorption sont en faveur d'une diffusion passive des AG à travers la paroi des entérocytes (Thomson et al. 1989), cependant, certaines observations suggèrent l'intervention de molécules de transport telles que les protéines de liaison des acides gras (Fatty acid-binding protein, FABPs) (Storch and Corsico 2008) dont le rôle exact est encore discuté. Cependant, selon leur composition en AG, les lipides ingérés ne sont pas totalement absorbés (entre 95 à 99%), dépendant notamment de l'emplacement de la liaison des AG avec le squelette glycérol (Aoyama et al. 1996). Les lipides ainsi absorbés sont ensuite resynthétisés sous forme de TG ou de PL sous l'action de diverses enzymes anabolisantes dans les entérocytes de la paroi intestinale avant leur transport aux tissus cibles. Les AG libres et les 2-monoglycérides sont ainsi ré-estérifiés en TG alors que les lyso-phospholipides peuvent être à nouveau hydrolysés ou utilisés pour la resynthèse des PL (*figure 4*) (Lands 2012).

Le transport et le devenir des AG au niveau des tissus cibles varient en fonction de la longueur de chaîne des acides gras absorbés. Ainsi, les acides gras à chaînes courtes et moyennes (longueur inférieure ou égale à 12 atomes de carbone) entrent directement dans la circulation sanguine et sont acheminés au foie par la veine porte alors que les AG à plus longue chaîne (supérieure ou égale à 14 atomes de carbone) sont intégrés aux chylomicrons. Ces lipoprotéines contiennent majoritairement des TG localisés en leur centre à hauteur de 90%. On retrouve les PL en moindre quantité (8%) à la périphérie des chylomicrons dont la tête polaire permet l'émulsion nécessaire au transport des molécules hydrophobes vers les tissus cibles par la voie lymphatique. L'adressage des chylomicrons se fait principalement vers le tissu adipeux pour être stockés et vers le foie afin de permettre l'élaboration de lipoprotéines. Des études chez l'Homme ont montré que la composition en AG des TG et des PL intégrés aux chylomicrons était similaire à celle des lipides alimentaires. Cependant la composition en AG constituant les PL retrouvés dans les chylomicrons serait moins sensible

aux variations que celle des TG, résultant en partie de l'action régio-spécifique des lipases gastriques et pancréatiques qui hydrolysent préférentiellement les AG externes liés au glycérol et permettant la conservation de l'AG positionné en *sn2* (Aoe et al. 1997).

Ainsi, ces différentes étapes, notamment du fait de la spécificité des enzymes, conditionnent la biodisponibilité des acides gras pour les tissus cibles. L'étude de l'efficacité de la forme d'apport des AG au niveau des tissus de l'organisme a fait l'objet de plusieurs travaux menés chez l'Homme et sur différents modèles animaux dont les résultats divergent. En effet, des travaux menés chez le porc ont montré que l'acide docosahexaénoïque (22:6 *n*-3, DHA) serait préférentiellement absorbé aux niveaux lymphatique et plasmatique lorsqu'il est apporté sous forme de TG par comparaison à la forme PL (Amate et al. 2002, Mathews et al. 2002). Une autre étude menée chez des rates a montré en revanche que, outre une absorption intestinale équivalente, l'acide arachidonique (20:4 *n*-6, ARA) et le DHA, amenés sous forme de PL ou de monoglycéride étaient préférentiellement transférés vers les tissus cibles par rapport aux formes TG ou esters éthyliques de ces AG (Valenzuela et al. 2005). Chez l'Homme, les résultats obtenus diffèrent également. Ainsi certaines études menées chez l'Homme ont montré une absorption équivalente des AGPI-LC *n*-3 lorsqu'ils étaient apportés sous forme de TG ou d'esters éthyliques (Hansen et al. 1993, Krokan et al. 1993, Nordoy et al. 1991) alors que certaines autres ont montré des cinétiques différentes d'apparition des AG et notamment du DHA, dans divers compartiments plasmatiques, dépendantes de la forme d'apport (PL ou TG) (Brossard et al. 1997, Lemaitre-Delaunay et al. 1999). Par ailleurs, l'équipe de Carnielli a montré plus spécifiquement une différence d'absorption des AGPI-LC selon le type de vecteur (TG ou PL) utilisé. Ainsi, l'efficacité de l'absorption des AGPI-LC *n*-3 ingérés sous forme de PL serait meilleure que celle de molécules ingérées sous forme de TG (Carnielli et al. 1998).

L'ensemble de ces données soutient l'hypothèse que la biodisponibilité des acides gras est étroitement liée à la forme d'apport dans l'organisme pouvant ainsi influencer leur action sur les fonctions physiologiques dans lesquelles ils sont impliqués. Dans la suite de cette introduction bibliographique, nous nous attacherons à présenter le rôle de la forme

d'apport utilisée sur l'accumulation et le devenir métabolique des AG dans le cerveau (Cf II.3.2).

I.3 - Devenir métabolique des acides gras polyinsaturés

I.3.1 - Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés :

Les acides gras circulant sont hydrolysés une nouvelle fois en acides gras libres (AGL) ce qui permet le passage de la membrane plasmique et leur incorporation dans les cellules via l'action de protéines de transport (Fatty Acid Transport Proteins, FATP) puis de protéines de liaison (FABP). Une fois rentrés dans la cellule, les acides gras polyinsaturés peuvent être engagés vers différentes voies métaboliques dont la principale est celle de la β -oxydation qui se déroule au sein des mitochondries et des peroxysomes (*figure 5*) (Norheim et al. 2012). Auparavant, les AG sont thioestérifiés en acyl-CoA qui vont réagir avec la carnitine pour donner l'acyl-carnitine sous l'action de l'enzyme carnitine acyl transférase I (CAT-I). L'acyl-carnitine traverse la membrane mitochondriale interne avant la reformation en acyl-CoA sous l'action de la CATII. Cet acyl-CoA va alors être le substrat de réactions en chaînes qui constituent le processus de β -oxydation. A chaque fin de cycle, la molécule d'acyl-CoA initiale raccourcie de 2 carbones et un acétyl-CoA sont libérés (Alessandri et al. 2009). Les molécules d'acétyl-CoA sont généralement oxydées en CO₂ dans le cycle de Krebs ou bien conduisent à la libération de corps cétoniques.

Le catabolisme représente la principale voie métabolique des AGPI indispensables (Cunnane 2004), qui sont par ailleurs plus activement dégradés par la voie de la β -oxydation (+50%) que ne le sont les AGS ou les AGMI, en raison de leur affinité plus forte pour le complexe enzymatique permettant l'entrée des AG dans la mitochondrie (Clouet et al. 1989). Cette voie est quantitativement 200 fois plus importante que celle de la bioconversion des AGPI en dérivés à longue chaîne permettant de maintenir l'homéostasie de ces dérivés à l'intérieur des tissus (Rapoport Stanley I. et al. 2010).

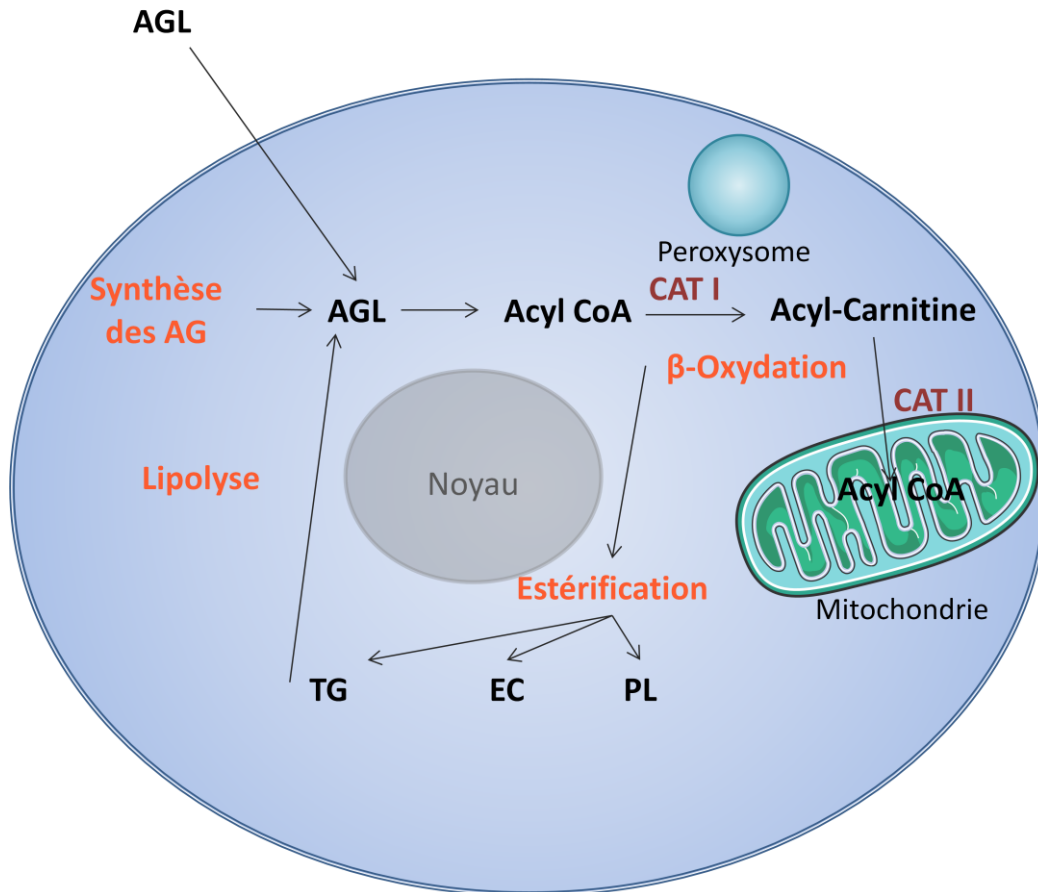


Figure 5 : Devenir métabolique des acides gras dans la cellule

Adapté de Norheim et al. 2012

AGL : Acide gras libre ; CAT I : Carnitine Acyl transférase I ; CAT II : Carnitine Acyl transférase II ; EC : Ester de cholestérol ; PL : Phospholipide ; TG : Triglycéride.

I.3.2 - Biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne

Les précurseurs métaboliques des deux familles d'acides gras indispensables : l'ALA et le LA, subissent une série de réaction enzymatiques produisant des dérivés à longue chaîne ($\geq 18C$) appartenant respectivement à la série des n-3 et à la série des n-6. Ces acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) sont produits par une succession de désaturations (désaturases Δ -5 et Δ -6) et d'élongations (élongases ELOVL2 et ELOVL5) dans le réticulum endoplasmique (Guillou et al. 2010). Les doubles liaisons et les atomes de carbone supplémentaires sont ajoutés à partir de l'extrémité carboxyle permettant ainsi la conservation de la conformation initiale des précurseurs (n-6 ou n-3) indispensables (*figure 6*). Les principaux AGPI-LC formés par cette voie de bioconversion sont les acides dihomo- γ -linoléinique (DGLA ; 20:3 n-6) et l'acide arachidonique (ARA, 20:4 n-6) produits à partir du LA pour la série n-6, et les acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3), docosapentaénoïque (DPA n-3, 22:5 n-3) et docosahéxaénoïque (DHA, 22:6 n-3) produits à partir de l'ALA pour la série n-3 (Guillou et al. 2010). Par ailleurs, certaines données montrent qu'une étape de rétroconversion peroxysomale (β -oxydation) est requise pour la synthèse du DHA (Sprecher 2000). En effet, le DPA n-3 est d'abord allongé en acide tétracosapentaénoïque (TPA, 24:5 n-3) qui subit ensuite une étape de désaturation produisant l'acide tétracosahéxaénoïque (THA, 24:6 n-3). Le TPA est ensuite transféré au niveau des peroxysomes pour y subir un seul cycle de β -oxydation raccourcissant la molécule initiale de 2 atomes de carbones et générant ainsi une molécule de DHA (Guillou et al. 2010).

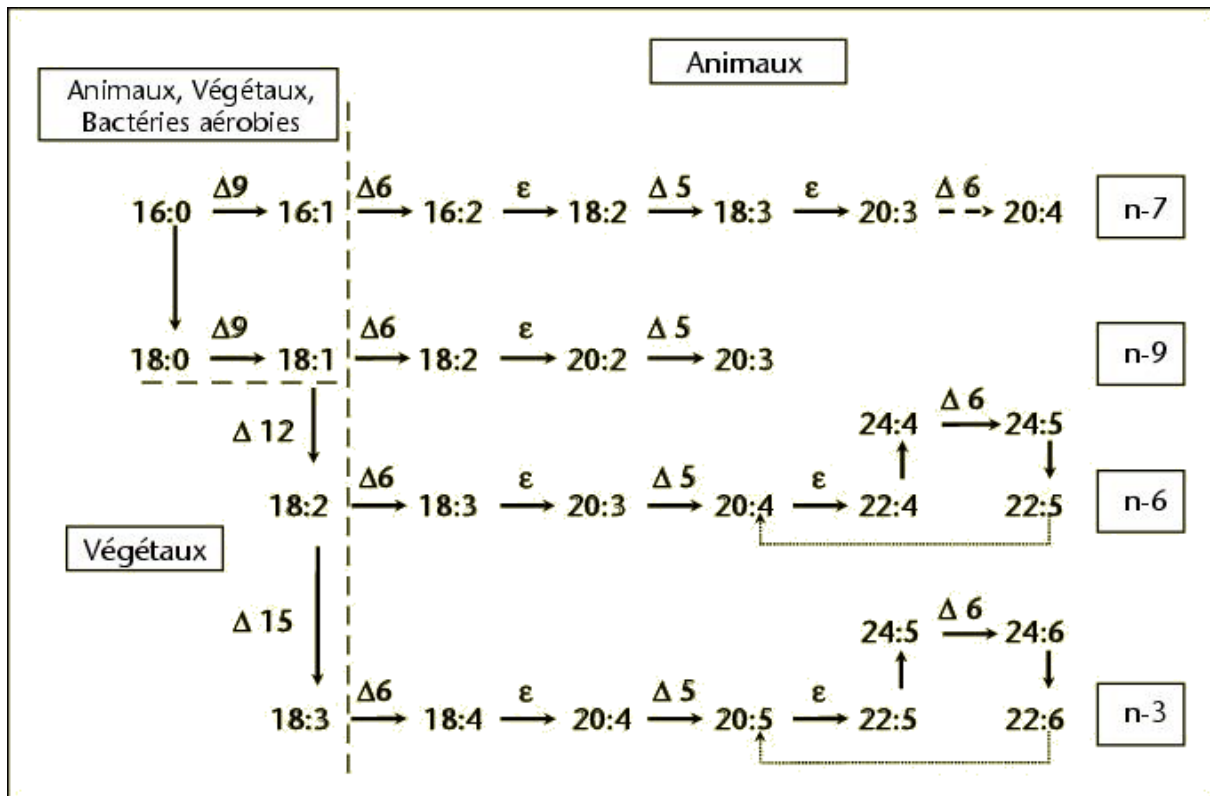


Figure 6 : Biosynthèse des acides gras insaturés et familles d'acides gras

Source : Legrand et al. 2004

Le symbole Δ indique une désaturation, avec la place de la double liaison introduite repérée à partir de l'extrémité carboxyle COOH. Le symbole ϵ indique une élongation. Les familles n-7 et n-9 ne sont pas essentielles car leurs précurseurs sont synthétisables par les mammifères. Les acides gras des familles n-6 et n-3 constituent les acides gras essentiels.

Bien que la conversion des précurseurs indispensables en dérivés à longue chaîne ne représente pas plus de 1% de leur devenir métabolique chez l'Homme (Plourde and Cunnane 2007), cette voie de bioconversion prend son importance notamment lorsque l'apport alimentaire en acides gras indispensables est déséquilibré. En effet, les enzymes de conversion: désaturases et élongases nécessaires à la formation des AGPI-LC sont communes aux deux séries d'AG indispensables n-3 et n-6 impliquant le maintien d'un équilibre métabolique entre les deux séries, chacune pouvant interférer sur la conversion des AG de l'autre (Barcelo-Coblijn Gwendolyn and Murphy 2009, Blanchard et al. 2013, Smink 2012). L'importance relative de ces deux voies de synthèse dans l'organisme est donc largement contrôlée par l'apport nutritionnel et la disponibilité relative de chaque précurseur

(Nakamura and Nara 2004). Plusieurs études ont en effet mis en évidence l'interdépendance de ces deux voies de synthèse, montrant qu'en cas d'apports trop faibles en ALA et trop élevés en LA, la synthèse de DHA est limitée, au profit de la synthèse de l'ARA et de son dérivé le DPA n-6 caractéristique des situations de déficience en AGPI n-3 (Moriguchi et al. 2004, Salem et al. 2001). A l'inverse, un apport plus faible en LA comparativement à l'apport en ALA permet de stimuler la conversion de l'ALA en DHA (Igarashi et al. 2012). Il est intéressant de noter que la conversion en AGPI-LC est également fortement influencée par la concentration en dérivés eux-mêmes, qui agissent en tant que rétro-inhibiteurs sur les enzymes de conversion (Hofacer et al. 2011). En outre, certaines études ont mis en évidence un taux de conversion des AG de la série n-3 supérieur à celui des AG de la série n-6, traduisant une affinité plus forte de la $\Delta 6$ désaturase pour l'ALA que pour le LA (Bézar et al. 1994).

Ainsi, chez le rat, un régime riche en EPA et en DHA administré pendant 3 semaines diminue l'activité $\Delta 6$ -désaturase hépatique de près de 50% vis à vis du LA, mais influence peu la conversion de l'ALA (Christiansen et al. 1991). Chez l'Homme, il a été montré une forte diminution du taux de conversion plasmatique de l'ALA en EPA et en DPA n-3 chez des personnes ayant reçu un régime riche en EPA et en DHA sur une période de 8 semaines (Burdge et al. 2003).

1.3.3 - Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs

1.3.3.1 - Eicosanoïdes

Certains AGPI-LC à 20 atomes de carbone synthétisés par la conversion enzymatique des AG indispensables LA et ALA sont également les précurseurs principaux de médiateurs lipidiques oxygénés hautement spécifiques appelés eicosanoïdes, intervenant dans la modulation de nombreuses fonctions cellulaires. Ces molécules, issues du DGLA et de l'ARA pour la série des n-6 et de l'EPA pour la série des n-3 peuvent produire des effets complémentaires ou opposés en fonction de la famille (n-3 ou n-6) considérée. Ainsi, l'ARA et l'EPA sont les principaux précurseurs d'eicosanoïdes dans les tissus (Calder 2011, Maskrey et al. 2013). L'entrée des AGPI-LC à 20 atomes de carbone dans les voies enzymatiques d'oxygénation nécessite au préalable leur libération de la position sn-2 des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A2 (PLA₂), principalement par l'isoforme PLA₂

calcium dépendante cytosolique (cPLA₂), hautement spécifique de la position sn-2. Il existe trois voies principales de biosynthèse des eicosanoïdes dans les tissus : la voie des cyclooxygénases (Rosenthal et al. 1987) générant les prostanoïdes comprenant les prostaglandines, précurseurs des prostacyclines, et les thromboxanes, la voie des lipoxygénases (LOX) conduisant à la voie des acides gras hydroperoxydés et hydroxylés puis à la synthèse des leucotriènes (LT) (Figure 7).

Les prostanoïdes sont des AGPI cyclisés et hydroxylés, composés d'un cycle comprenant 5 à 6 atomes de carbone portant des groupements carbonyles ou époxydes. Les prostanoïdes se distinguent en trois séries (série 1, 2 et 3) dérivant respectivement du DGLA, de l'ARA et de l'EPA et peuvent être synthétisés dans la plupart des tissus dont le système nerveux central (SNC).

Les leucotriènes sont des molécules caractérisées par la présence de trois doubles liaisons conjuguées (« triènes ») et des groupements hydroxyles ou époxyde ou bien un groupement sulfure sur lequel est fixé un acide aminé. Les leucotriènes dérivent également du DGLA, de l'ARA et de l'EPA et sont classés en trois autres séries (séries 3, 4 et 5 respectivement). Ils sont principalement synthétisés dans les cellules participant à la mise en place des processus inflammatoires (monocytes, macrophages, basophiles, mastocytes, neutrophiles).

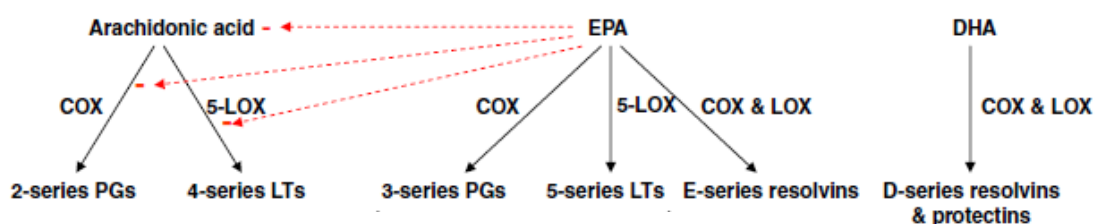


Figure 7 : Voies de synthèse enzymatique des prostanoïdes (voie des cyclooxygénases) et des leucotriènes (voie de la 5-lipoxygénase)

Adapté de Calder et al. 2011

COX : Cyclooxygénase ; LOX : Lipoxygénase ; LT : Leucotriènes ; PG : Prostaglandines.

1.3.3.2 - Protectines et Resolvines

L'EPA et le DHA sous l'action séquentielle de la COX-2 et de la 5-LOX donnent également lieu à la formation d'un autre type de molécules appelées resolvines. Les resolvines de la série E dérivent de l'EPA et sont produites par les cellules endothéliales alors que les resolvines de la série D sont formées à partir du DHA spécifiquement dans le cerveau (Serhan et al. 2004). Le DHA peut également être le précurseur d'une autre famille de molécules appelées protectines, qui sont formées par l'action séquentielle de la 15-LOX puis de la 5-LOX. Lorsque la synthèse a lieu dans les tissus nerveux, on parle de neuroprotectines, telle que la neuroprotectine D1 (Bazan N. G. et al. 2011, Maskrey et al. 2013). Les dérivés oxygénés formés à partir du DHA sont regroupés sous le terme de docosanoïdes. Les resolvines et les protectines sont pour la plupart des AGPI portant 2 à 3 groupements hydroxyles et 3 doubles liaisons conjuguées.

1.3.3.3 - Autres métabolites oxygénés ou oxydés et anandamides

Par ailleurs, l'ARA et l'EPA peuvent être engagés dans d'autres voies d'oxygénation enzymatiques telle que la voie des lipoxigénases conduisant à la synthèse d'hydroperoxydes et de lipoxines (Calder 2006, Serhan et al. 2004).

Une autre voie d'oxygénation non enzymatique permet la formation des isoprostanes et des neuroprostanes dérivant de l'ARA et de l'EPA (Roberts et al. 2005).

Une dernière classe de molécules appelées anandamides formées principalement à partir de l'ARA forme une famille de neuromédiateurs capables de se fixer et d'activer les récepteurs aux cannabinoïdes endogènes CB1 et CB2 (Snider et al. 2010).

L'ensemble des molécules présentées dans cette partie exercent des fonctions importantes dans un grand nombre de processus physiologiques qui seront détaillés dans la suite de ce manuscrit (*Cf 1.5.1*).

I.4 – Données de consommation des acides gras polyinsaturés

I.4.1 - Sources alimentaires des AGPI

Les AGPI de notre alimentation proviennent de sources végétales et animales (Tableau 1).

Les huiles végétales sont particulièrement riches en précurseurs LA et ALA et sont donc les principales sources alimentaires de ces AGPI. Ainsi, les huiles de tournesol et d'arachide sont particulièrement riches en LA (respectivement 77% et 30% en moyenne des acides gras totaux (AGT)). Compte tenu de sa teneur élevée en LA, l'huile de tournesol est également qualifiée de linoléique. L'ALA est majoritairement retrouvé dans les huiles de noix, de colza et de soja (respectivement 12, 10 et 8% en moyenne des AGT) qui sont qualifiées d'huiles linoléniques. Ainsi, les huiles linoléniques possèdent un ratio n-6/n-3 très élevé, tandis que le ratio des huiles linoléniques est plus faible (<10). Il est intéressant de noter que contrairement aux animaux, les végétaux ne possèdent pas les enzymes ($\Delta 6$ et $\Delta 5$ désaturases) permettant de former les dérivés à longues chaînes issus de l'ALA et du LA. On retrouve également ces précurseurs en quantités plus ou moins importantes dans les produits animaux terrestres tels que la viande le lait ou les œufs. L'ALA est contenu en moindre quantités dans certains légumes verts tels que l'épinard ou la mâche (Simopoulos A. P. and Salem 1986).

Les AGPI-LC de notre alimentation courante sont quant à eux principalement d'origine animale. Ceux de la série n-6 se retrouvent dans les produits animaux d'origine terrestre (viande, œuf, lait) ainsi que le lait maternel alors que les AGPI-LC de la série n-3 sont majoritairement fournis par des produits animaux marins et le lait maternel. Cependant, les produits animaux d'origine terrestre peuvent également être source d'AGPI-LC n-3 dans des quantités variables selon le régime alimentaire des animaux (Simopoulos A. P. 2001). De même, les teneurs en AGPI-LC contenus dans le lait maternel sont largement dépendantes de l'alimentation de la mère (Guesnet and Alessandri 2011).

Par ailleurs, notons qu'au cours de ces dernières années, l'industrie agroalimentaire a porté un intérêt croissant sur l'utilisation de micro algues capables de synthétiser des AGPI-LC tels que l'EPA et le DHA, dans la composition de formules infantiles et de compléments

alimentaires afin de proposer un meilleur apport en AGPI-LC n-3 dans l'organisme (Lenihan-Geels et al. 2013).

Tableau 1 : Composition moyenne en AGPI n-3 et n-6 de quelques aliments

	AGT	AGPI n-3			AGPI n-6		Ratio n-6/n-3
		ALA (18:3)	EPA (20:5)	DHA (22:6)	LA (18:2)	ARA (20:4)	
	(g/100g)	(g/100g des AGT)					
<u>Huiles</u>							
Tournesol	100	0,1	-	-	77,0	-	770
Arachide	100	0,0	-	-	30,5	-	-
Colza	100	10,0	-	-	23,0	-	2
Soja	100	8,0	-	-	54,0	-	7
Olive	100	0,5	-	-	10,0	-	20
<u>Poissons</u>							
Saumon	5,2	1,1	13,5	18,9	1,6	0,7	0,1
Truite	9,6	1,7	7,0	20,4	4,8	0,8	0,1
Thon	1,2	1,6	11,3	19,4	1,6	3,2	0,2
<u>Viandes</u>							
Poulet	3,1	0,9	0,3	0,6	12,2	0,5	7,1
Bœuf	8,8	0,3	Trace	Trace	2,1	0,4	8,3
Porc	1,6	0,5	Trace	0,4	8,1	0,5	9,6

Adapté de Larsson et al. 2004, Marszalek and Lodish 2005

AGT : Acides gras totaux ; AGPI : Acides gras polyinsaturés.

Les compositions en AGT sont données en g/100g d'aliments, les compositions en AGPI sont données en g/100g du contenu en acides gras totaux.

I.4.2 - Apports nutritionnels conseillés et données de consommation des acides gras polyinsaturés :

I.4.2.1 - Apports nutritionnels conseillés

Les AGPI des familles n-6 et n-3, de par leur nature et leur abondance dans l'alimentation influencent la santé de l'Homme et ont une incidence dans l'étiologie d'un certain nombre de pathologies (maladies métaboliques, cardiovasculaires, inflammatoires, neurodégénératives ou obésité). Cependant l'interdépendance des molécules appartenant aux deux familles d'acides gras essentiels nécessite le maintien d'un équilibre d'apport dans l'alimentation entre les AGPI n-6 et n-3.

Sur la base de données bibliographiques acquises à partir d'études épidémiologiques ainsi que sur des modèles animaux et *in-vitro*, l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), maintenant désignée sous le nom de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), a mis à jour en 2010 les valeurs des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les acides gras. Ces recommandations nutritionnelles sont basées sur le calcul des besoins physiologiques de chaque classe d'AG tout en considérant leurs implications physio-pathologiques. Ces ANC définissent, en tenant compte de l'âge et de l'état physiologique du sujet, une fourchette d'apport pour les AGT ainsi que des valeurs d'apport en précurseurs LA et ALA et de l'ensemble des AGPI-LC, comprenant notamment le DHA. Ces données sont présentées dans le tableau 2.

Ainsi, les données disponibles ont conduit à définir chez l'adulte, d'après les besoins physiologiques et optimaux, un apport en lipides totaux de 35 à 40% de l'apport énergétique total (Bellovino et al. 2003). Chez l'Homme adulte en bonne santé ayant un apport énergétique de 2000 kcal/jour, les ANC établis pour le LA et l'ALA correspondent respectivement à 4% et 1% de l'AET soit un apport en LA de 8 g/jour et un apport en ALA de 2 g/jour. Ces valeurs impliquent donc le maintien du ratio LA/ALA strictement inférieur à 5 afin d'éviter une compétition excessive entre les acides gras de la série n-6 et les acides gras de la série n-3. Concernant les AGPI-LC, les ANC établis pour l'EPA et le DHA sont de 250 mg/jour pour chacun d'eux, ce qui représente un apport de 0.25% de l'AET pour la somme EPA+DHA.

Tableau 2 : Apports nutritionnels conseillés en acides gras pour un adulte consommant 2000 Kcal

		BESOIN PHYSIO- LOGIQUE MINIMAL*	PREVENTION DU RISQUE					ANC 2010
			Syndrome métabolique- diabète- obésité	Pathologies cardiovasculaires	Cancers : sein et côlon**	Pathologies neuro- psychiatriques	Autres pathologies : DMLA***	
Lipides totaux ^a		30 ^b	30-40	35-40 ^c	35-40	35-40 ^d	<40	35-40 ^c
AG indispensables	Acide linoléique C18 :2 n-6	2	2 ^e	5	2 ^e	2 ^e	≤4 ^f	4 ^g
	Acide α-linolénique C18 :3 n-3	0,8	0,8 ^e	1 ^h	0,8 ^e	0,8 ^e	0,8 ^e	1 ^h
AG non indispensables	Acide docosahexaénoïque DHA, C22 :6 n-3	250 mg	500 mg	500-750 mg ⁱ	500mg	≥ 200-300 mg	500 mg	250 mg
	Acide eicosapentaénoïque EPA, C20 :5 n-3	-						250 mg ^j
	Acide laurique (C12:0) + Acide myristique (C14:0) + Acide palmitique (C16:0)	-	-	≤8 ^h	-	-	-	≤ 8
	Acides Gras Saturés totaux	-	- ^k	≤12	≤12 ^l	-	-	≤12
	Acide oléique C18 :1 n-9	-	-	≤20 ^m	-	-	-	15-20
Autres AG non indispensables ⁿ		-	-	-	-	-	-	-

Source : Avis de l'AFSSA relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras (1^{er} mars 2010)

Les valeurs sont exprimées, en pourcentage de l'apport énergétique total, excepté pour l'EPA et le DHA dont les valeurs sont exprimées en milligrammes.

Dans le cadre de la prévention de certains risques pathologiques, ces ANC peuvent être modifiés. Ainsi, il est recommandé d'avoir un apport compris entre 500 et 750 mg par jour d'EPA+DHA dans le cadre de la prévention de pathologies cardiovasculaires.

Néanmoins, en l'absence de données spécifiques pour les personnes âgées et de données suggérant que les besoins pour ces personnes sont différents, ce sont les ANC définis chez l'adulte qui s'appliquent au sujet âgé.

1.4.2.2 - Données de consommation

Un certain nombre d'enquêtes épidémiologiques et d'études interventionnelles ont été réalisées chez l'Homme afin d'évaluer les habitudes alimentaires et la contribution de chaque groupe d'aliment à nos apports quotidiens. Ces données sont largement répertoriées par l'Anses en vue d'établir les ANC pour la population française. Elles montrent que la

consommation en lipides totaux des français représente 38% à 40% de l'AET, situé dans la fourchette de 35% à 40% préconisée par l'Anses en 2010. Cependant, les études révèlent un déséquilibre dans la répartition des différentes classes de lipides (AGS, AGMI, AGPI) dans notre alimentation comparativement aux proportions recommandées. En effet, les données obtenues lors de l'étude Individuelle des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) (2006-2007) montrent un apport excessif en AGS (près de 40% de l'AET) contrairement à la limite recommandée de 12% de l'AET. En revanche, la consommation en AGMI se situe à environ 13%, soit en dessous du seuil de 15 à 20% de l'AET déterminé par l'Anses.

En ce qui concerne les apports en AGPI, les données obtenues dans différentes études sur le niveau de consommation en LA et ALA pour la population française notamment, montrent un apport moyen en ALA situé entre 0,6 g/jour selon l'étude menée chez les femmes en Aquitaine (Combe and Boué 2001) et 1 g/jour pour l'étude de SUplémentations en Vitamines et Minéraux AntioXydants (SU.VI.MAX), (Hercberg et al. 2004), soit moins de la moitié des 2 g/jour recommandés. En revanche l'apport en LA mesuré dans ces études oscille chez les hommes entre 10,6 g/jour pour l'étude SU.VI.MAX et 17,6 g/jour pour l'étude INCA 2. Ces valeurs sont largement supérieures aux 4 g/jour recommandés par les ANC et participent à l'élévation du ratio LA/ALA entre 11 et 17, contrairement au ratio strictement inférieur à 5 préconisé.

Tableau 3 : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation d'après différentes études

Etudes	Population	Rapport LA/ALA
Transfair (1995 – 1996)	300 hommes	} >13,8
(Hulshof et al. 1999)	463 femmes	
Aquitaine (1996 – 1999)	61 femmes parturientes	} 15
(Combe et Boué 2001)	79 femmes non parturientes	
SU.VI.MAX (1994 – 2002)	2119 hommes	11,1
(Hercberg et al. 2004)	2889 femmes	10,8
INCA 1 (1998 – 1999)	1985 adultes (> 15 ans)	11,5
(Razanamahefa et al. 2005)	1018 enfants (3 – 14 ans)	12,7
INCA 2 (2006 – 2007)	2624 adultes (> 15 ans)	} 17,6
	1018 enfants (3 – 14 ans)	

ALA : acide α -linoléique ; LA : acide linoléique

Peu d'études ont en revanche permis de déterminer les apports nutritionnels en AGPI-LC, en particulier les AGPI-LC appartenant à la série n-3. Les données issues de l'étude SU.VI.MAX menée sur une cohorte de 5008 personnes, ont montré un apport moyen en EPA de 150 mg/jour chez les hommes et de 118 mg/jour chez les femmes (contre 250 mg/jour préconisés par les ANC 2010). La consommation moyenne en DHA était cependant de 273 mg/jour chez les hommes et de 226 mg/jour chez les femmes, soit des valeurs assez proches de 250 mg/jour recommandé par les ANC (Astorg et al. 2004). Cependant la variabilité des niveaux d'apport en DHA mesurés dans cette étude suggère que ces valeurs ne sont peut-être pas représentatives de la population française.

En effet, ces estimations d'apports en AGPI n-3 dans la population française doivent être considérées avec précaution, compte tenu des limites des tables de composition

nutritionnelles souvent incomplètes pour ces nutriments, ainsi que des biais liés au report de consommation d'un nutriment consommé en faible quantité et à fréquence variable d'un jour à l'autre. En dépit de ces imprécisions, les données des différentes études de consommation s'accordent et permettent d'affirmer que la population française est en situation d'insuffisance d'apport en AGPI n-3, notamment d'ALA, vis à vis d'un apport élevé en AGPI n-6. Notons que dans la majorité des sociétés occidentales, le ratio global n-6/n-3 n'a cessé d'augmenter au cours du siècle dernier (Musket et al. 2004, Simopoulos Artemis P. 2011) en conséquence d'un changement des modes de consommation.

Le ratio LA/ALA est un déterminant important dans le maintien de l'homéostasie et au cours du développement de l'organisme. Du fait en partie de la compétition entre les deux séries d'AGPI indispensables, l'excès d'apport en AGPI n-6 par comparaison avec un apport trop faible en AGPI de la série n-3 contribue à favoriser la survenue d'un grand nombre de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, le diabète, l'obésité ou des troubles cognitifs. Le maintien d'un ratio LA/ALA à une valeur faible contribuerait en revanche à la prévention de ces mêmes pathologies (Simopoulos A. P. 2006, Simopoulos Artemis P. 2011).

I.5 - Rôles physiologiques des AGPI

Les rôles attribués aux AGPI recensés dans la littérature sont divers et nombreux, nous résumerons ici les principaux.

I.5.1 - Rôle structural des AGPI

Les AGPI sont incorporés dans les PL membranaires et leur structure est à l'origine de modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire, modulant ainsi l'activité des enzymes, transporteurs, canaux ioniques et récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation inter- et intracellulaire. En effet, l'incorporation des AGPI dans les PL de la membrane induit une fluidité membranaire plus importante, due à la présence de doubles liaisons sur leur chaîne aliphatique. Ceci induit d'une part la constitution de micro-environnements membranaires peu ordonnés et flexibles, facilitant les changements de conformation nécessaires à l'activité de protéines intrinsèques. D'autre

part, l'incorporation des AGPI dans les membranes induit la ségrégation latérale d'autres domaines membranaires plus ordonnés et enrichis en AGS, cholestérol et sphingolipides appelés radeaux lipidiques (ou « lipid rafts »). Ces radeaux lipidiques constituent des domaines stables propices à l'ancrage dans les membranes d'un certain nombre de protéines transmembranaires et de récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire, constituant ainsi de véritables plateformes de signalisation (Simons and Toomre 2000, Wassall et al. 2004). Les faibles teneurs en AGPI dans les radeaux lipidiques, rendent ces domaines plus rigides que le reste de la membrane, leur permettant de se déplacer au sein de celle-ci (Simons and Toomre 2000). Le DHA est l'AGPI possédant la plus grande flexibilité conformationnelle en raison des six doubles liaisons qui se comportent comme des articulations autour desquelles peuvent s'effectuer des torsions rotationnelles (Gawrisch et al. 2003, Stillwell and Wassall 2003). Ainsi, il a été montré que la concentration élevée de cet AG dans les membranes excitables des cellules photoréceptrices de la rétine permet d'une part les changements conformationnels de la rhodopsine nécessaires à la transduction du signal dans la cellule et d'autre part, favorise la ségrégation des radeaux lipidiques au sein des membranes (Niu et al. 2004).

Un autre processus membranaire, directement impliqué dans le fonctionnement du système nerveux, concerne la libération synaptique de neurotransmetteurs par exocytose. En effet, les AGPI sont également des constituants des membranes vésiculaires et peuvent ainsi moduler les processus de stockage et de libération présynaptique de plusieurs neurotransmetteurs. Les résultats de plusieurs études menées sur des rats carencés en AGPI n-3 ont montré une augmentation de la libération basale de certains neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine et la sérotonine (Aid et al. 2003, Kudas et al. 2004) suggérant un phénomène de « fuite », ce qui réduit le stock de neurotransmetteurs contenus dans les vésicules et perturbe sa mobilisation en réponse à une stimulation. Ce phénomène pourrait contribuer à une moins bonne efficacité de l'influx nerveux pouvant être à l'origine des troubles cognitifs observés en situation de carence en AGPI n-3 (Fedorova and Salem 2006).

I.5.2 - Les acides gras polyinsaturés, précurseurs de médiateurs bioactifs

Les médiateurs lipidiques de la famille des eicosanoïdes sont mobilisés à partir de la membrane plasmique par la phospholipase A2. Les AGPI à 20 atomes de carbone ainsi libérés peuvent alors être le substrat de réactions d'oxygénation induisant la production de

médiateurs bioactifs hautement spécifiques appelés eicosanoïdes. Rappelons que les prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes des séries 1, 2 et 3 sont produits par la voie COX à partir du DGLA, de l'ARA et de l'EPA respectivement. La 5-LOX permet la formation des leucotriènes de la série 4 à partir de l'ARA et ceux de la série 5 à partir de l'EPA (*Cf 1.3.3*). Il existe donc une compétition entre les différentes séries vis à vis des enzymes COX et 5-LOX. Ainsi, les précurseurs des endopéroxydes des séries 1 et 3 entrent en compétition avec leur homologue de la série 2, et le précurseur des leucotriènes de la série 5 s'oppose à celui de la série 4. Cette compétition, découlant de l'équilibre alimentaire entre les AGPI de la famille n-3 et ceux de la famille n-6, est à l'origine de la balance métabolique influant la synthèse de molécules bioactives dont les propriétés sont généralement opposées (Calder and Grimble 2002, Schmitz and Ecker 2008). En effet, les molécules générées à partir de l'ARA peuvent être des médiateurs proagrégants et vasoconstricteurs (endopéroxydes de la série 2) ou bien pro-inflammatoires (leucotriènes de la série 4). Notons également que les eicosanoïdes dérivés de l'ARA sont capables d'activer des facteurs de transcription tels que les récepteurs aux proliférateurs de peroxyosomes (PPAR), comme cela sera décrit dans la suite de cette introduction (*Cf V.2.1*). En revanche, les eicosanoïdes dérivés de l'EPA sont des molécules aux propriétés anti-agrégantes et vasodilatatrices (endopéroxydes de la série 3) et non inflammatoires (leucotriènes de la série 5).

L'EPA et le DHA sont de plus les précurseurs de résolvines des séries E et D jouant un rôle anti-inflammatoire (Calder 2011). Ainsi, dans le cerveau, ces dérivés ont une activité neuroprotectrice (Bazan 2011).

Le DHA est également précurseur des docosanoïdes : (neuro)protectine D1 et neuroprostanes), lui conférant des fonctions spécifiques dans le cerveau. La neuroprotectine D1 a des effets anti-inflammatoires en inhibant l'infiltration des leucocytes (Laye 2010, Serhan et al. 2004) et est également impliquée dans le processus d'apoptose (Bazan Nicolas G. 2007). Les neuroprostanes exercent également des effets neuroprotecteurs.

Certains dérivés de l'ARA tels que le N-arachidonyl-éthanolamine (NAE ou anandamide) et le 2-arachidonylglycérol (2-AG) sont des molécules signal capable de se lier et d'activer les

récepteurs aux cannabinoïdes couplés aux protéines G tels que les CB1 et les CB2. Ces récepteurs sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques et physiopathologiques tels que l'addiction aux drogues, l'obésité, le contrôle de l'homéostasie énergétique, l'inflammation ou le cancer (Kirkham and Tucci 2006). Au niveau cérébral, le système endocannabinoïde est entre autres, impliqué dans les processus de plasticité synaptique jouant un rôle dans la libération de neurotransmetteurs et la dépolarisation membranaire (Castillo et al. 2012). Ainsi, des données récentes ont rapporté qu'un régime déficient en AGPI n-3 était associé à des altérations de la plasticité synaptique induite par une désensibilisation du récepteur CB1 (Lafourcade et al. 2011).

I.5.3 – Les acides gras polyinsaturés, modulateurs de l'expression génique

De nombreuses études ont rapporté que certains nutriments peuvent influencer les processus métaboliques et physiologiques via la régulation de l'expression de certains gènes, en particulier en se liant à des facteurs de transcription (Norheim et al. 2012). Au cours des années 2000, l'étude des différentes possibilités d'interactions nutriments – génome a ainsi donné naissance au concept de nutriginomique (Muller and Kersten 2003). Ainsi, les AG, font partie de ces facteurs environnementaux pouvant influencer l'expression des gènes. En effet, il a été mis en évidence que les AG, notamment les AGPI et leurs dérivés oxygénés, sont les activateurs naturels de facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui provoquent la prolifération des peroxysomes appelés « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPAR et régulent ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes (Kliwer et al. 1997) (*figure 8*). D'autres facteurs de transcription activés par les acides gras et leurs dérivés ont également été identifiés, parmi lesquels RXR (retinoid X receptor), SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein 1), HNF4 (hepatic nuclear factor 4) et LXR (liver X receptor). Dans la suite de cette introduction, nous nous attacherons à décrire en détail les mécanismes d'action des deux récepteurs qui nous ont intéressés au cours de ce travail : les PPAR et les RXR (*Cf partie V*).

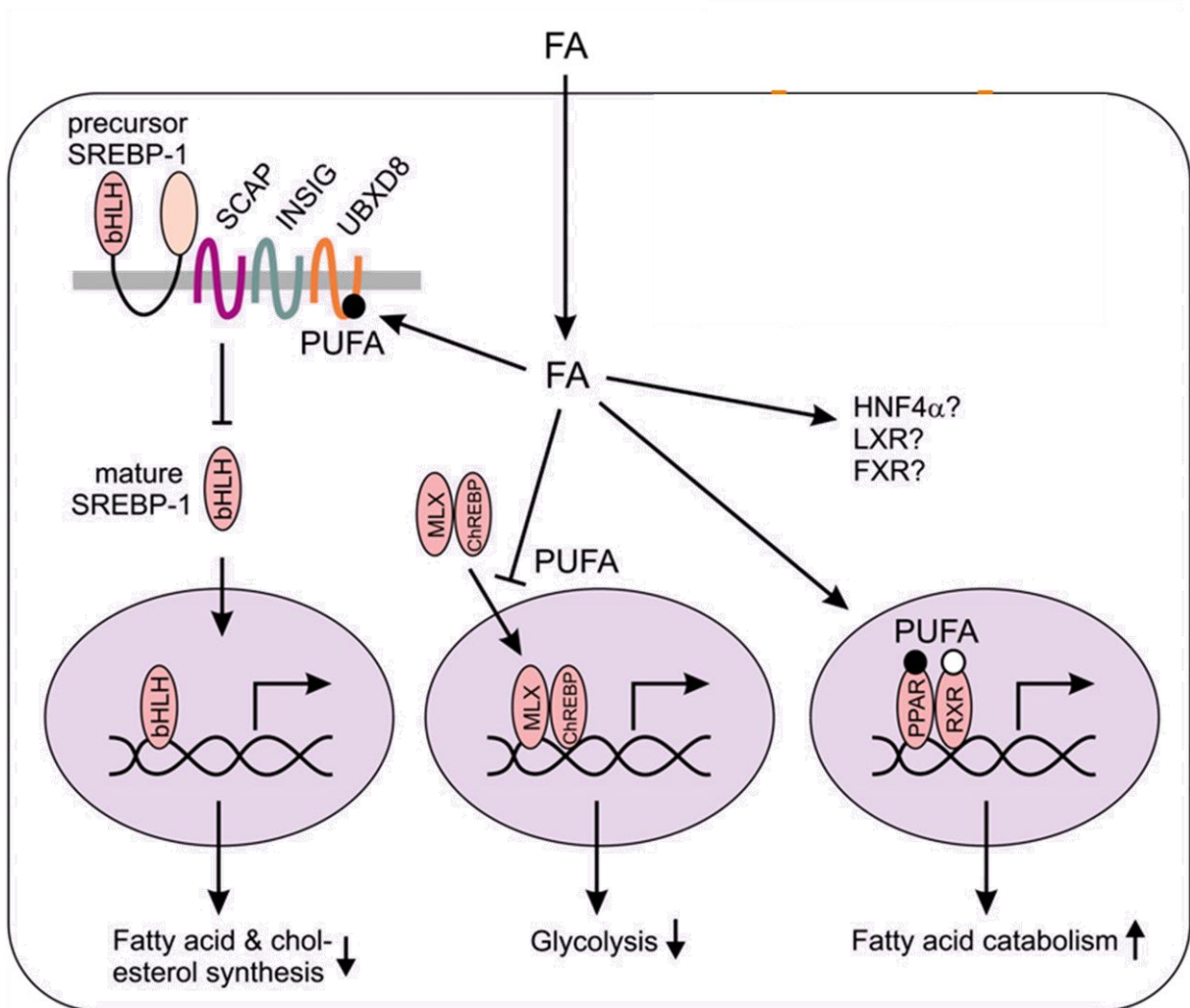


Figure 8 : Mécanisme généraux de régulation de l'expression de gènes par les acides gras

Adapté de Georgiadi et Kersten 2012

FA: fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid;

bHLH: basic helix-loop-helix; ChREBP: Carbohydrate-responsive element binding protein; FXR: Farnesoid X receptor; HNF4: hepatic nuclear factor 4; INSIG: Insulin induced gene; LXR: liver X receptor; SREBP-1: sterol regulatory element-binding protein 1; TLR4: Toll-like receptor; SCAP: SREBP cleavage activating protein

I.5.4 - Les acides gras polyinsaturés, sources énergétiques

Au même titre que les autres AG, les AGPI sont également de très bons substrats de la β -oxydation mitochondriale et représentent donc une source d'énergie non négligeable pour l'organisme comme présenté précédemment (Cunnane 2004).

Compte tenu des rôles physiologiques majeurs exercés par les AGPI n-3 et n-6 dont une liste non exhaustive est présentée dans tableau 4, de nombreuses études ont montré qu'un déséquilibre d'apport alimentaire en oméga 6 et en oméga 3 pouvait favoriser l'incidence de certaines pathologies chez l'homme (Guesnet et al. 2005).

Depuis plusieurs années maintenant, de nombreux travaux ont montré l'intérêt spécifique des AGPI n-3 et tout particulièrement des AGPI-LC n-3 présents en abondance dans les huiles de poisson (EPA et DHA) sur le plan de la physiologie cardiovasculaire (Leaf et al. 2003) et de l'inflammation (Laye 2010). Par ailleurs, ils font l'objet d'un nombre croissant d'investigations en ce qui concerne la prévention de certaines pathologies du SNC mais également du déclin cognitif lié à l'âge.

Dans la suite de cette introduction bibliographique, nous nous attacherons à présenter certains aspects de la composition lipidique du cerveau, des propriétés fonctionnelles des AGPI au niveau du SNC notamment au cours du vieillissement et en regard de données moléculaires relatives à l'implication de la vitamine A dans le fonctionnement cérébral.

Tableau 4 : Principales fonctions physiologiques régulées par les acides gras polyinsaturés n-3

Systèmes et organes	Fonction
Système nerveux central	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Cognition ↗ production de docosanoïdes et neuroprotectines ↘ Dépression
Rétine	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Acuité visuelle
Système cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> Anti-arythmique Anti -thrombotique
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> Anti-inflammatoire ↗ production d'eicosanoïdes et de résolvines ↘ Nombre de macrophages et de la production de cytokines inflammatoires ↘ Sensibilisation aux allergènes et à l'asthme
Métabolisme	<ul style="list-style-type: none"> Transport du cholestérol ↘ concentration de cholestérol circulant ↘ Stress oxydant ↗ Sensibilité à l'insuline
Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> ↘ de la dégradation des muscles squelettiques
Peau	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Perméabilité de la peau
Différents types cellulaires	<ul style="list-style-type: none"> ↗ croissance cellulaire et différenciation Anti-carcinogénique

Source : Kremmyda et al. 2011

II - Le cerveau, organe cible des acides gras polyinsaturés

De tous les tissus du corps humain, le cerveau est immédiatement après le tissu adipeux, le plus riche en lipides. Ces lipides, représentent environ 50% du poids sec du cerveau, composant 50% des membranes cérébrales et plus de 70 % de la gaine de myéline (Lauritzen et al. 2001, Yehuda et al. 2005). Les membranes cérébrales sont constituées majoritairement d'AGPI, qui représentent 35% des AGT du cerveau dont le DHA et l'ARA sont les plus représentés, par opposition à leur précurseurs LA et ALA. Ainsi, par comparaison avec d'autres tissus, le cerveau humain est l'un des organes les plus riches en DHA (7,2 g/100 g d'AGT) (Tableau 5).

II.1 - Données de composition en AGPI au sein du cerveau

Les lipides des membranes cérébrales se composent principalement de phospholipides (PL), soit 50% des lipides totaux. Les autres lipides composant les membranes cérébrales sont le cholestérol (20%), les cérébrosides (15 à 20%) et dans des proportions moindres des gangliosides et des sulfatides (Sastri 1985). Les PL sont représentés dans le cerveau par différentes classes dont les principales sont la phosphatidylcholine (PC, 42 à 44% des PL), la phosphatidylsérine (PS, 11 à 13% des PL) et le phosphatidylinositol (PI, 2 à 3% des PL) et les glycérophospholipides à éthanolamine (GPE), groupe composé lui-même de la phosphatidyléthanolamine (PE, 36 à 40% des PL) et des plasmalogènes (remplacement de l'acide gras, généralement en position sn-1, par un alcool gras). A ces principales classes s'ajoutent la sphingomyéline (SM) et quelques lysophospholipides (Sastri 1985).

L'analyse de la composition en acides gras du cortex humain dont les données ont été obtenues à partir de cortex prélevés sur des sujets (15 femmes et 15 hommes) âgés de 29 à 45 ans (McNamara R.K. and Carlson 2006) a permis d'observer que les AGS (majoritairement composés des acides stéarique 18:0 et palmitique 16 :0) représentent près de 36% des AGT du cerveau, les AGMI environ 28% (l'acide oléique 18:1 n-9 étant majoritaire) et les AGPI n-6 et n-3 environ 31% (respectivement 17% des AGT pour la série n-

6 et 14% pour la série n-3) (*Figure 9*). Parmi ces derniers, l'ARA et le DHA sont largement représentés (respectivement 9 et 13,5 % des AGT) ; le LA et le DPA n-6 représentent ensemble environ 2% des AGT ; l'ALA, l'EPA et le DPA n-3 comptant chacun pour moins de 1% des AGT. Concernant le cas particulier de l'ARA et du DHA, le premier est préférentiellement incorporé en position sn-2 des PI (25 à 30% des PI totales) et des PE (10 à 20% des PE totales). Le DHA quant à lui, est majoritairement incorporé en position sn-2 des PE et des PS (25 à 35 % des PE et des PS totales) (McNamara R.K. and Carlson 2006). Au sein des GPE, le DHA peut en particulier être incorporé dans les plasmalogènes qui composent dans le cerveau la moitié de ce groupe de PL, le plus important quantitativement avec la PC.

Différentes études menées chez le rongeur ont montré que l'abondance des AGPI n-3 et notamment du DHA qui représente 17% des AGPI dans le cerveau diffère d'une région à l'autre (Horrocks and Farooqui 2004, Xiao et al. 2005). En effet, le DHA est préférentiellement incorporé dans les membranes du cortex préfrontal et de l'hippocampe (16 à 22% des AGT). La proportion de cet AGPI est moindre dans les membranes du striatum (14% des AGT) ou l'ensemble pons-medulla (10% des AGT) (Carrié et al. 2000a, Dyall S.C. et al. 2007, Favrelière et al. 1998, Soderberg et al. 1991, Xiao et al. 2005). Chez le primate non humain nouveau-né, les teneurs en DHA les plus élevées sont retrouvées dans le globus pallidus, le colliculus supérieur et le putamen (14% des AGT) puis dans les régions corticales dont le cortex frontal (12,9% des AGT) (Diau et al. 2005).

A l'intérieur de ces structures, le DHA est retrouvé plus spécifiquement dans les cônes de croissance des axones et les synaptosomes, les astrocytes, la gaine de myéline et les membranes mitochondriales (Suzuki et al. 1997).

Tableau 5 : Composition en acides gras de différents tissus d'origine humaine

Fatty acid	Adipose tissue	RBC	Placenta	Liver	Testis	Brain cerebrum	Retina
Total SFA	27.2	43.1	39.4	42.0	39.6	45.9	48.2
Total MUFA	59.7	23.0	11.6	23.8	20.0	29.7	14.2
18:2n-6	10.5	9.3	9.5	17.5	5.6	0.6	1.4
18:3n-3	0.8	n.d.	–	0.3	0.7	tr.	n.d.
20:3n-6	0.2	1.5	4.3	1.6	6.7	1.2	2.1
20:4n-6	0.3	15.2	21.1	7.7	13.4	7.7	9.6
20:5n-3	tr.	0.7	0.1	0.4	–	tr.	0.1
22:4n-6	n.d.	1.6	1.6	0.3	2.1	5.4	1.8
22:5n-6	–	–	1.0	0.3	0.4	1.1	0.8
22:5n-3	0.2	1.8	1.3	0.5	–	0.2	1.3
22:6n-3	0.3	3.2	4.8	3.4	8.5	7.2	19.7
Total PUFA	13.1	33.3	44.4	32	30.7	23.4	37.2
Total LCPUFA	1.1	24.0	34.2	14.2	24.4	22.8	35.5
Total n-6	11.2	27.6	37.6	27.4	28.2	16.0	16.0
Total n-3	1.9	5.7	6.3	4.6	9.2	7.4	21.1
Total C22-FA	0.5	6.6	8.7	4.5	11.0	13.9	23.6
C20/C22	1.3	2.6	2.9	2.2	1.2	0.6	0.5
n-3/n-6	0.17	0.21	0.16	0.17	0.33	0.46	1.32

Adapté de Lauritzen et al. 2001

Valeurs exprimées en % des AGT ; Tr. : traces ; n.d. : non détecté

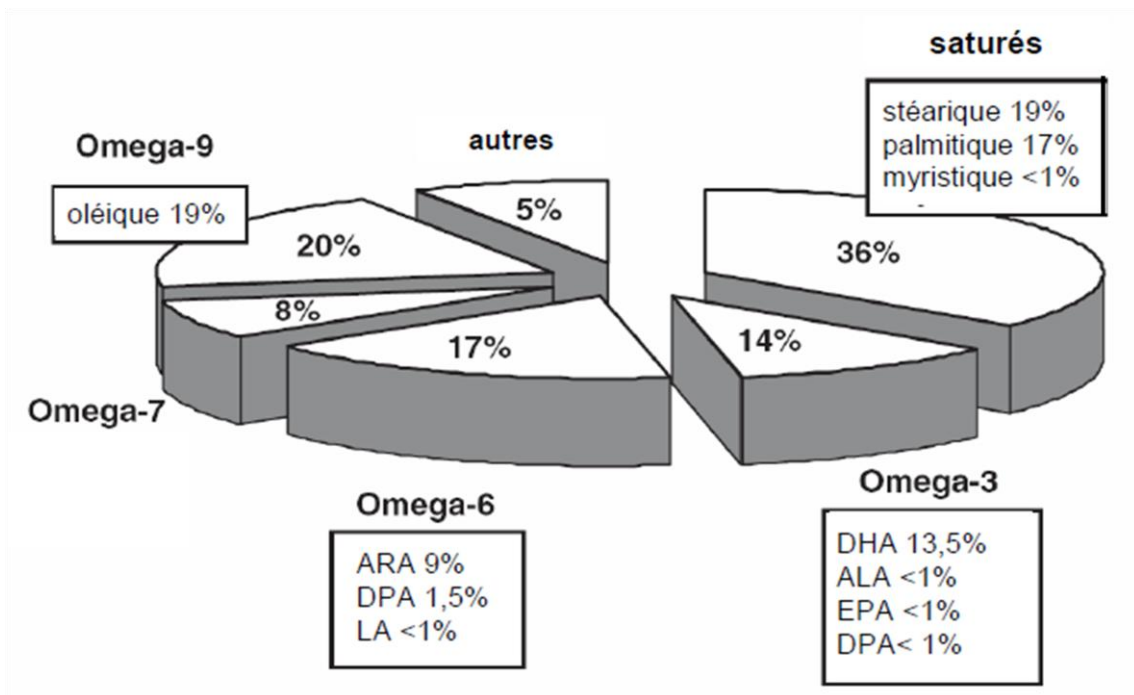


Figure 9 : Composition en acides gras du cortex frontal humain

Adapté de Mc Namara et Carlson 2006

Valeurs exprimées en % des AGT ; ALA : acide α -linoléique (18:3 n-3) ; ARA : acide arachidonique (20:4 n-6) ; DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) ; DPA : acide docosapentaénoïque (22:5 n-6 ou n-3) ; EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) ; LA : acide linoléïque (18 :2n-6).

II.2 - Accumulation des AGPI n-3 au cours du développement

Chez l'Homme, l'accumulation des AGPI dans les membranes ces cellules cérébrales est maximale durant la période périnatale, qui s'étend du dernier trimestre de la grossesse aux deux premières années de la vie, et coïncide avec les pics de neurogenèse, de synaptogenèse, de différenciation des neuroblastes et de la myélinisation axonale (Clandinin 1999, Green P. and Yavin 1996, Green P. et al. 1999, Martinez M. and Mougan 1998). Ainsi, l'incorporation du DHA cérébral atteint 14,5 mg/semaine entre la 26^{ème} et la 40^{ème} semaine de la grossesse. Après la naissance, cette accumulation se poursuit de manière linéaire jusqu'à l'âge de deux ans pour atteindre une concentration voisine de 10000 nmol/g (Clandinin et al. 1980, Martinez M. 1992, 1994). Cunnane et al. (2000) précisent à ce sujet que pendant les six premiers mois de la vie, cette importante accumulation cérébrale correspond à la moitié de l'accumulation quotidienne de DHA dans le corps entier.

De même, les études menées sur les rongeurs ont montré une élévation de 98% des teneurs en DHA cérébral entre le 12^{ème} et 17^{ème} jour du stade embryonnaire, et représente à la naissance plus de 10% des AGT. Cette valeur augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau comprise entre 10 et 20% des AGT au 21^{ème} jour postnatal (Green P. and Yavin 1996, Green P. et al. 1999, Schiefermeier and Yavin 2002).

Une fois cette phase de croissance rapide achevée, puis jusqu'à l'âge adulte, le contenu en DHA dans les membranes cérébrales se stabilise, les modifications de composition persistant mais de manière moins importante. Cependant une étude menée chez le rat a montré grâce à l'injection intraveineuse d'ARA et de DHA que les acides gras accumulés dans les membranes cérébrales sont constamment renouvelés à l'âge adulte. Ainsi, 3 à 5% de l'ARA et 2 à 8% du DHA se renouvellent chaque jour dans le cerveau. La durée de ce renouvellement varie en fonction de l'acide gras et du PL auquel il est intégré, avec une demi-vie allant de quelques heures dans les PI et jusqu'à plus de 300 heures dans les PS (Rapoport S. I. 2001).

II.3 - Mécanismes d'apport des AGPI au sein des membranes cérébrales

Il existe deux mécanismes cellulaires principaux recensés dans la littérature permettant l'incorporation des AGPI au sein des membranes cérébrales. En effet, les AGPI accumulés dans le cerveau peuvent soit provenir d'une conversion *in situ* à partir de leurs précurseurs, soit être amenés par la circulation sanguine.

II.3.1 - Métabolisme intracérébral

Bien que la synthèse *in situ* des AGPI-LC à partir de leur précurseurs ne représente qu'environ 6% de la synthèse hépatique (Bourre et al. 1990), des études réalisées sur des cellules en cultures ont montré que les astrocytes, les cellules de l'endothélium cérébral et plus récemment les neurones sont capables de métaboliser le LA et l'ALA cérébral en ARA et en DHA respectivement (Kaduce et al. 2008, Moore 2001). En effet, des données obtenues chez le rat ont montré que le cerveau peut non seulement capter le LA et l'ALA mais également les métaboliser, en raison de la présence des enzymes (élongases et désaturases) permettant leur conversion en AGPI-LC dans les cellules cérébrales (Cunnane et al. 1994, Kitson et al. 2012, Pawlosky et al. 1996). Le LA et l'ALA sont majoritairement incorporés dans les TG qui fournissent la plupart des AG aux différents tissus de l'organisme ou bien restent sous forme d'AGL. Bien que, chacun représente moins de 1% des AGT présents dans les tissus cérébraux (Spector 2001), leur forme d'apport leur confère une grande biodisponibilité et en fait une source d'AGPI-LC potentiellement importante pour le cerveau. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence la capacité d'astrocytes en culture à synthétiser l'ARA et le DHA à partir de leurs précurseurs respectifs ajoutés dans le milieu d'incubation (Bernoud et al. 1998, Moore et al. 1991, Williard et al. 2001). La mesure des concentrations intra- et extracellulaires en dérivés à longues chaînes, a permis de mettre en évidence une meilleure efficacité de conversion de l'ALA comparativement au LA apporté dans les mêmes proportions. Ces mesures ont montré une quantité de DHA 10 fois supérieure au sein des cellules et jusqu'à 45 fois supérieure dans le milieu extracellulaire, à la quantité d'ARA produite (Moore et al. 1991). Le DHA nouvellement synthétisé dans les astrocytes peut être relargué soit sous forme non estérifiée, soit incorporé dans les phospholipides membranaires contenant de la choline (PC et lysoPC). Par ailleurs, le devenir des AGPI-LC au

sein de ces cellules dépend également de la série n-6 ou n-3 à laquelle ils appartiennent. Ainsi, l'ARA capté par les astrocytes reste majoritairement sous cette forme, 25% étant convertis en AGPI-LC à 22 ou 24 atomes de carbone tels que le 22:4 n-6, dont 50% sont ensuite rétro convertis en ARA, favorisant ainsi l'accumulation de cet AGPI dans le cerveau. En ce qui concerne les AGPI n-3, près de 70% de l'EPA capté est métabolisé au sein des astrocytes en DPA n-3 dont 30% sont ensuite allongés en 24:5 n-3 et en autres dérivés, permettant la rétro conversion de moins de 10% de ces molécules en EPA (Williard et al. 2002).

L'utilisation de modèles cellulaires a également permis de mettre en évidence l'implication des neurones, notamment hippocampiques, dans la synthèse *de novo* de l'ARA et du DHA à partir de leurs précurseurs respectifs (Kaduce et al. 2008).

De la même manière, un certain nombre de travaux plus anciens ont rapporté l'existence de cette voie de bio conversion dans les cellules de l'endothélium vasculaire cérébral. Ces données montrent d'une part la conversion du LA en ARA et d'autre part la conversion de l'ALA en DPA n-3, et de manière moins efficace en DHA (Bernoud et al. 1998, Moore et al. 1991, Williard et al. 2001). Par ailleurs, il semblerait que cette voie de conversion soit d'autant plus efficace dans les astrocytes lorsqu'ils sont mis en présence de cellules endothéliales dans le milieu de culture, suggérant ainsi la coopération de ces deux types cellulaires pour fournir des AGPI-LC aux neurones.

La synthèse in-situ de dérivés à longue chaîne a pu être observée dans plusieurs types cellulaires. Néanmoins, cette voie de conversion ne permettrait de couvrir qu'une faible part des besoins en AGPI-LC, la plupart étant couverts par l'apport de dérivés précédemment synthétisés au niveau du foie et apportés au cerveau par la circulation sanguine (Chen C. T. et al. 2008, Gao et al. 2010, Rapoport S. I. 2013).

II.3.2 - Apport des acides gras polyinsaturés à longue chaîne au cerveau par la circulation sanguine

Il est désormais bien admis que la majorité des besoins en AGPI-LC du cerveau sont couverts par la circulation sanguine qui permet l'apport aux différents organes, des produits de la synthèse hépatique des AGPI-LC (Gao et al. 2010, Rapoport Stanley I. et al. 2010).

Des études réalisées chez le rat ont en effet montré que lorsque le régime alimentaire apporte l'ALA en quantité suffisante (4,6% d'ALA dans le régime), la conversion de l'ALA en

DHA par le foie peut subvenir aux besoins du cerveau en DHA (Igarashi et al. 2007b). À l'inverse, lorsque le régime alimentaire est pauvre en ALA, la synthèse de DHA par le foie est augmentée, tandis que l'expression de la iPLA2, phospholipase permettant la mobilisation intracellulaire du DHA, est inhibée dans le cerveau, allongeant ainsi la demi-vie du DHA dans les cellules cérébrales (Igarashi et al. 2007a, Rao et al. 2007). Par ailleurs, une étude réalisée sur le rat vigile a démontré que la synthèse hépatique d'AGPI-LC est environ 30 fois supérieure aux besoins des cellules cérébrales (Rapoport S. I. and Igarashi 2009). Les AGPI-LC ainsi synthétisés sont alors transportés dans le sang à l'aide des lipoprotéines circulantes telles que les LDL et les VLDL ou bien sous forme de complexes d'AGL liés à l'albumine. L'incorporation des AGPI dans les cellules cérébrales nécessite leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituant une interface de protection entre le sang et le fluide interstitiel cérébral (*Figure 10*). Elle participe ainsi au maintien de l'homéostasie cérébrale, grâce à une perméabilité sélective aux nutriments et autres molécules apportées par le flux sanguin (Mitchell and Hatch 2011, Ouellet et al. 2009).

Bien que les mécanismes d'entrée des AGPI au sein des membranes cérébrales soient à l'heure actuelle encore discutés, deux modèles principaux émergent de la littérature. Il est généralement admis que les acides gras peuvent traverser la BHE par un transport actif via la liaison des AG à des molécules de transport transmembranaires telles que les FATP (fatty acid transport protein), la translocase FAT/CD36 (fatty acid translocase) ou bien les protéines de liaison cytosoliques FABP (fatty acid binding protein) (Edmond 2001, Ma et al. 2010).

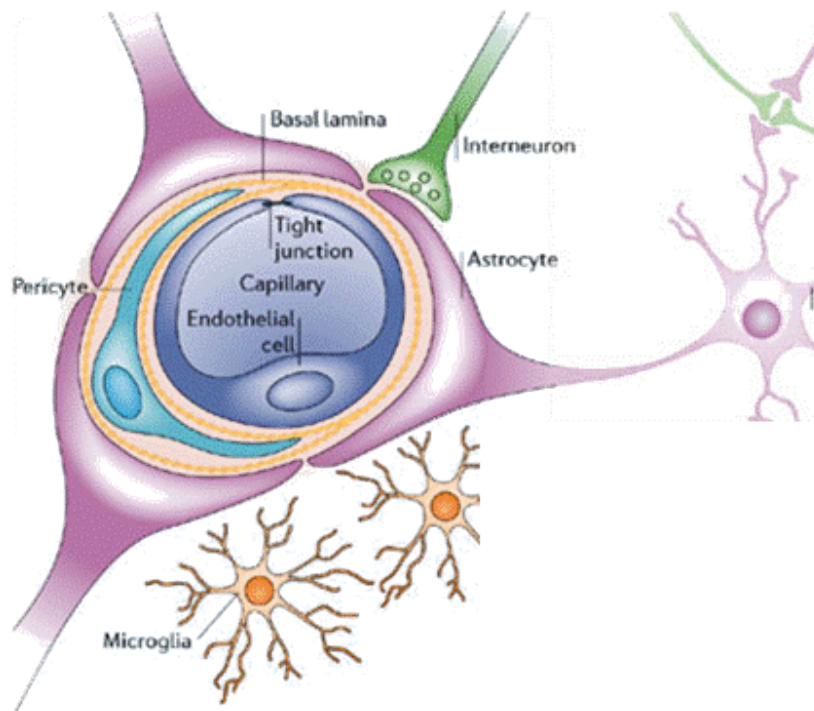


Figure 10 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique

Adapté de Abbot et al. 2006

D'autres auteurs ont obtenu des données en faveur d'une diffusion passive des AG à travers la BHE suivant un mécanisme de « flip-flop », et expliquant que la rapidité d'incorporation des AG dans les cellules cérébrales ne pouvait pas résulter d'un transport actif, plus lent (Hamilton and Brunaldi 2007, Kamp et al. 2003).

Signalons que les deux modèles proposés pour expliquer l'incorporation des AGPI dans le cerveau font intervenir des mécanismes différents (transport actif ou transport passif à travers la BHE) impliquant également des formes d'apport différentes. En effet, de nombreux travaux ont montré que les AG qui traversent le BHE proviennent majoritairement des complexes plasmatiques albumine/AG et dans une moindre mesure des lipoprotéines circulantes (Rapoport S. I. 2001).

II.3.2.1 - Forme d'apport plasmatique des AGPI

Selon certaines données, le pool d'AG libres du plasma pourrait être une source importante d'apport en ARA et DHA au niveau du cerveau, ces deux AGPI représentant respectivement 4,1 et 1,6 % des AGT plasmatiques chez l'Homme (Spector 2001). Plusieurs données recueillies chez le rat ont par ailleurs mis en évidence la capacité du cerveau à incorporer rapidement du DHA préalablement injecté à des souris sous forme libre ainsi que l'augmentation de ses métabolites dans les membranes cérébrales (Belayev et al. 2005, Kabuto et al. 2009). D'autres études ont également mis en évidence une incorporation rapide du DHA dans le cerveau de rats gavés avec du DHA radio marqué sous forme d'ester éthylique (Graf et al. 2010).

Dans le cas où ces AGPI sont transférés sous forme non estérifiée, des données ont rapporté la possible implication de protéines membranaires de transport telles que les FATP 1 et 4 identifiées dans les cellules endothéliales de la BHE ou FAT/CD36 qui en dépit de la forte expression des FATP 1 et 4 semble assurer le transport de la plupart des AG (Mouille et al. 2012). Il a également été mis en évidence que les neurones et les cellules gliales expriment trois familles de FABP (BFABP, EFABP et HFABP) qui sont des protéines chaperonnes permettant de transporter les acides gras (Mitchell and Hatch 2011). Ces protéines présentent une affinité plus ou moins forte aux acides gras en fonction de la série (n-3 ou n-6) et de la longueur de leur chaîne hydrocarbonée. Ainsi, il a été montré que la EFABP se lie préférentiellement aux AGPI-LC et leurs métabolites et est exprimée notamment au cours de la différenciation neuronale et de la neurogenèse. La BFABP, également associée à la différenciation des cellules neuronales présente une forte affinité pour le DHA. A l'inverse, la HFABP est associée à l'incorporation des AGPI n-6 et notamment de l'ARA et est impliquée dans la phase tardive du développement cérébral et pourrait participer à la formation des neurites et à la maturation des synapses, permettant ainsi de supporter les fonctions neuronales à l'âge adulte (Mouille et al. 2012).

En plus de la capacité des AG à pénétrer dans le cerveau sous forme libre, il a également été montré que les AGPI pouvaient être captés par le cerveau sous forme estérifiée, au sein de TG, de PL ou d'esters de cholestérol, contenus dans des lipoprotéines (Edmond 2001) telles que les chylomicrons ou les LDL, compte tenu de la capacité de ces derniers à traverser les cellules endothéliales de la BHE et à pénétrer au sein des astrocytes

et des neurones (Anderson et al. 1994, Dehouck et al. 1997). Cependant, des données obtenues sur le transport des AG au cerveau par les LDL, montrent que cette forme d'apport ne serait pas déterminante dans la couverture des besoins cérébraux en AGPI-LC.

II.3.2.2 - Forme d'apport alimentaire des AGPI

A la vue de ces données, de nombreuses études se sont également intéressées à la forme d'apport alimentaire des AGPI permettant une accumulation optimale des AGPI dans les membranes cérébrales, notamment entre la forme la plus courante dans l'alimentation : les TG ou la forme PL. Ainsi, (Wijendran et al. 2002) ont montré une incorporation dans les tissus cérébraux de babouins nouveaux nés du DHA et de l'ARA deux fois supérieure lorsque une seule dose d'AGPI était fournie sous forme de PL par comparaison avec de l'ARA et du DHA fournis sous forme de TG. De même, sur un modèle de souris présentant une cholestase hépatique ne permettant pas l'absorption des acides gras essentiels, il a été montré une augmentation de l'accrétion de DHA et d'ARA cérébral lorsqu'ils étaient fournis sous forme PL par comparaison à des souris déficientes (Werner A. et al. 2004). Cette différence d'accumulation du DHA dans les membranes cérébrales en fonction de la forme d'apport alimentaire (TG ou PL) a également été retrouvée dans l'étude de (Graf et al. 2010) qui ont montré qu'en dépit d'une accrétion inférieure à 1% de la dose ingérée, le DHA sous forme de PL permettait une accumulation 2 fois plus importante au niveau du cerveau de rats après un traitement de trois jours par gavage.

En revanche, un certain nombre d'études n'ont pas mis en évidence de différence d'accumulation des AGPI dans le cerveau en lien avec la forme d'apport alimentaire (TG ou PL). Ainsi, des compositions en AG similaires ont été retrouvées dans l'hippocampe de jeunes rats soumis à un régime alimentaire riche en DHA sous forme de TG ou de PL durant 3 mois après leur naissance (Aid et al. 2005). D'autres études ont rapporté des compositions en AG similaires dans le cerveau de souris soumises à un mois de régime apportant du DHA sous forme de PL ou sous forme de TG (Hiratsuka et al. 2009, Tanaka et al. 2003).

L'ensemble de ces données suggère que l'entrée et l'accumulation des AGPI dans les cellules cérébrales sont finement régulées, depuis l'absorption intestinale jusqu'au transport à travers la BHE, dépendant à la fois de la forme d'apport alimentaire et des réactions métaboliques qui en découlent. Cependant, les données concernant la forme d'apport

alimentaire en DHA permettant une accumulation optimale au niveau des membranes cérébrales sont parfois divergentes et encore débattues.

II.4 - Rôles des acides gras polyinsaturés dans le fonctionnement cérébral

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont rapporté l'implication des AGPI n-3 et notamment du DHA dans nombre de manifestations comportementales et neurophysiologiques (Denis et al. 2013, Su 2010).

II.4.1 - Importance du niveau d'apport en acides gras polyinsaturés:

Il est désormais bien admis que la capacité des AGPI à moduler le fonctionnement cérébral est étroitement liée à leur niveau d'apport alimentaire. Ainsi, la plupart des données sur le rôle des AGPI n-3 et plus particulièrement du DHA dans l'ensemble des processus neurochimiques identifiés à ce jour dans le cerveau, ont été obtenues par l'induction de déficiences en AGPI n-3 *via* l'administration d'un régime dépourvu en ALA et AGPI-LC n-3 sur une ou plusieurs générations. La déficience membranaire en DHA qui en résulte s'accompagne d'effets tant biochimiques que fonctionnels.

Ainsi, il a été mis en évidence, des diminutions drastiques de près de 70% des teneurs en DHA dans plusieurs structures cérébrales telles que l'hippocampe, le striatum et le cortex préfrontal à la 3^{ème} génération de rats ayant reçu un régime pauvre en ALA (6 mg pour 100g de nourriture) (Mathieu et al. 2008). Notons qu'une déficience en ALA mise en place sur une seule génération induit également une diminution du contenu cérébral en DHA mais avec une amplitude moins importante par comparaison avec une déficience multi-générationnelle. En effet, il a été mesuré une baisse de la teneur en DHA dans le cortex préfrontal de rats soumis à un régime déficient en ALA de 62, 34 et 10%, respectivement pendant les périodes périnatales, post sevrage et à l'âge adulte, indiquant ainsi que le développement est une période de vulnérabilité accrue à la déficience en AGPI n-3 (McNamara R. K. et al. 2009). D'autres études ont également démontré le doublement de la demi-vie du DHA dans le cerveau de rats adultes soumis à une déficience chronique en ALA (15 semaines) (DeMar et al. 2004) suggérant un phénomène d'adaptation et de

compensation de la déficience par le cerveau et pouvant en partie expliquer le résultat de l'étude précédente.

Il est à noter que dans les membranes cérébrales, la diminution de la teneur en DHA induite par un régime déficient en AGPI n-3, s'accompagne de l'incorporation compensatrice de son analogue métabolique de la série n-6 : le DPA n-6 (C22:5 n-6), dont la teneur élevée est un critère biochimique de déficit d'apport alimentaire en AGPI n-3 (Greiner et al. 2003, Moriguchi et al. 2004, Salem et al. 2001). En effet, la structure du DPA n-6 ne diffère de celle du DHA que par la présence d'une seule double liaison supplémentaire en position n-3 de la chaîne hydrocarbonée du DHA. Cependant, sur le plan fonctionnel, les données ont montré que le DPA n-6 ne pouvait pas remplacer le DHA, suggérant que le besoin du cerveau en DHA est hautement spécifique d'un point de vue structural (Lim S. Y. et al. 2005).

Il convient de signaler qu'en situation de déficience en AGPI n-3, la baisse du contenu en DHA n'affecte pas de façon homogène les différentes structures cérébrales. En effet, plusieurs études ont rapporté que le cortex frontal semble être l'une des structures les plus vulnérables, avec l'hippocampe, le cervelet, le striatum et l'hypothalamus (Carrié et al. 2000a, b, Levant et al. 2007, Xiao et al. 2005).

Précisons cependant qu'un certain nombre d'études ont rapporté que la diminution des teneurs en DHA dans les membranes cérébrales observée en situations de déficience pouvait être corrigée par une supplémentation alimentaire en AGPI n-3. Ainsi, bien que la restauration des contenus en DHA dans les tissus nerveux soit plus longue que pour d'autres tissus périphériques qui retrouvent une concentration normale en DHA après une à deux semaines de supplémentation, il a été mis en évidence chez des rats déficients de deuxième génération soumis à une supplémentation nutritionnelle en ALA et en DHA (respectivement 2,6 et 1,3 g/100 g de régime) à l'âge de 7 semaines, une récupération complète des contenus en DHA après 4 semaines dans la rétine et après 8 semaines dans le cerveau (Moriguchi et al. 2001). D'autres données obtenues précédemment avaient en effet mis en évidence un processus de récupération plus long (supérieur à 130 jours) pour les cellules cérébrales (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) par comparaison à d'autres types cellulaires (foie, rein, poumons ou rétine) (Bourre et al. 1989). A l'instar de la déplétion induite par un régime pauvre en AGPI n-3, les taux de récupération du DHA suite à une supplémentation nutritionnelle sont hétérogènes et dépendants de la structure cérébrale considérée. Ainsi, le

cortex préfrontal et l'hippocampe feraient partie des régions pour lesquelles les capacités de restauration du contenu en DHA sont les plus lentes (Moriguchi et al. 2001, Xiao et al. 2005). De même, la période de présevrage semble constituer une période critique au-delà de laquelle le processus de restauration du contenu cérébral en DHA resterait incomplet (Kodas et al. 2002, Moriguchi and Salem 2003).

II.4.2 - AGPI n-3 et modulation de la plasticité cérébrale

La plasticité cérébrale correspond à la capacité de formation, de remodelage et d'organisation des neurones en un réseau fonctionnel, que possède une région cérébrale afin de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales ou faisant suite à une lésion tissulaire. Au cours de ces dernières décennies, de nombreux travaux se sont intéressés aux rôles exercés par les AGPI n-3 sur le processus de plasticité cérébrale.

De nombreuses études ont en effet mis en évidence l'implication de l'EPA et du DHA dans la régulation de nombreux mécanismes pouvant influencer ce processus. Ainsi, il a été montré chez des rats âgés soumis à un régime supplémenté en EPA et en DHA durant 12 semaines, une stimulation de la production de nouveaux neurones dans le gyrus denté de l'hippocampe (Dyall S. C. et al. 2010). De plus, chez des souris transgéniques fat-1, synthétisant des AGPI n-3 à partir d'AGPI n-6 et conduisant à une abondance d'AGPI n-3 dans tous les tissus, il a été mis en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique (He Chengwei et al. 2009). Outre la stimulation de la neurogenèse, un certain nombre d'études menées sur des modèles *in vitro* de culture primaires de neurones hippocampiques ou de neuroblastomes de rats, ont également montré que les AGPI-LC n-3 stimulent la croissance des neurites et la synaptogenèse (Calderon and Kim 2004, Cao et al. 2009, Robson et al. 2010, Shrivastava et al. 2005), participant ainsi au processus de différenciation en neurones (Kawakita et al. 2006, Shrivastava et al. 2005). L'influence des AGPI-LC n-3 sur l'expression des neurotrophines, qui sont des facteurs favorisant la neurogenèse et en particulier la survie des neurones a aussi fait l'objet de plusieurs études (Lee and Son 2009). Ainsi, il a été montré que les AGPI-LC n-3 induisent l'augmentation du niveau de BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Venna et al. 2009, Wu A. et al. 2004). De façon intéressante, il a été mis en évidence qu'un traitement par l'ALA induisait une augmentation de la neurogenèse hippocampique, en particulier de la prolifération, de la

survie et de la différenciation cellulaire, associée à une augmentation de l'expression de BDNF chez des souris adultes (Blondeau et al. 2009).

D'autres auteurs se sont intéressés au rôle des AGPI-LC n-3 dans la mise en place de la potentialisation à long terme (PLT) qui se traduit par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels d'action post-synaptiques, suite à l'activation des récepteurs synaptiques au glutamate AMPA et NMDA induite par une stimulation répétée à haute fréquence. Il a ainsi été montré que les AGPI-LC n-3, en régulant l'expression des récepteurs au glutamate, seraient impliqués dans les processus de PLT dans l'hippocampe (Cao et al. 2009, Connor Steven A. et al. 2012, Kawashima et al. 2010, Kelly et al. 2011). D'autres auteurs ont montré l'implication des AGPI-LC n-3 dans la modulation de la transmission synaptique en régulant l'expression des récepteurs de la voie dopaminergique (Kuperstein et al. 2005) et la libération de sérotonine (Kodas et al. 2004).

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré que les AGPI n-3 induisaient une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique telles que GAP-43 (growth associated protein 43 ou neuromoduline) impliquée dans la croissance et la régénération axonale (Wu Haitao et al. 2009), et PSD95 (post synaptic density protein 95), protéine spécifique de l'élément post synaptique (He Chengwei et al. 2009, Sakamoto et al. 2007).

La plasticité cérébrale sous-tend la régulation de nombreuses fonctions cognitives et plus particulièrement l'apprentissage et la mémoire. De fait, l'ensemble des mécanismes présentés dans ce dernier paragraphe, jouant un rôle dans la modulation de la plasticité cérébrale et influencés par les AGPI-LC n-3, sont étroitement liés à la mise en place des processus mnésiques (Denis et al. 2013).

II.4.3 - AGPI n-3 et modulation des capacités mnésiques

De nombreuses études ont démontré l'implication des AGPI n-3 dans la modulation des fonctions cognitives et mnésiques. En effet, un certain nombre de résultats obtenus sur des modèles de déficience en AGPI n-3 chez l'animal ont montré des déficits cognitifs, notamment dans des tâches de mémoire spatiale de référence ou de mémoire relationnelle (Fedorova and Salem 2006). Ainsi, chez un modèle de déficience multi-générationnelle, il a été montré qu'une déficience en AGPI n-3 sur 2 ou 3 générations était associée à une diminution des performances mnésiques évaluées dans une tâche de référence dans le

labyrinthe aquatique de Morris (Moriguchi et al. 2000). De plus, les animaux déficients de 3^{ème} génération qui présentaient des teneurs cérébrales plus faibles en AGPI n-3 que des animaux déficients de 2^{ème} génération (87% de baisse à la 3^{ème} génération contre 83% à la 2^{ème}) avaient également un niveau de performances plus faible. Plus tard, ces mêmes auteurs ont démontré une corrélation positive entre le contenu cérébral en DHA et les performances de mémoire spatiale de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris (Moriguchi and Salem 2003). Dans le même test comportemental, Lim et al. (2005) ont mis en évidence qu'une supplémentation en DPA n-6 liée à une baisse du contenu cérébral en DHA chez la souris était associée à des troubles d'apprentissage et de rappel.

D'autres études réalisées sur des animaux non déficients ont également mis en évidence un lien entre la consommation d'AGPI n-3 et les performances de mémoire. Il a été montré que de jeunes rats (2 mois) nés de mères recevant de l'huile de poisson par gavage durant la période de gestation puis supplémentés par gavage durant 80 jours après le sevrage, présentaient de meilleures performances de mémoire de travail évaluées en piscine de Morris ; ces performances étant associées à une augmentation de la teneur en DHA hippocampique (Chung et al. 2008). Par ailleurs, il a été montré que des rats non déficients soumis à un régime supplémenté avec différentes doses d'AGPI n-3 à partir du sevrage et durant 10 semaines, présentaient des performances de mémoire spatiale de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris dépendantes du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 fournis par le régime. Ainsi, les animaux consommant le régime contenant le plus faible ratio AGPI n-6/AGPI n-3 avaient des meilleures performances que les animaux consommant un régime contenant un ratio AGPI n-6/AGPI n-3 élevé (Hajjar et al. 2012). Précisons que les résultats obtenus dans ces études de supplémentation sont dépendants de la durée du régime et de la dose d'AGPI n-3 utilisée. En effet, Lim et Suzuki (2000) ont montré qu'un régime alimentaire apportant du DHA sous forme d'ester éthylique (2 g de DHA/100 g de nourriture), permet d'améliorer les performances mnésiques de souris après 1 mois de traitement et ce, durant 3 mois, quant à l'augmentation du contenu en DHA cérébral, elle n'apparaît qu'à partir de deux semaines de traitement (Tanabe et al. 2004).

Une étude réalisée chez l'Homme adulte a également mis en évidence une association entre la consommation de DHA et les performances cognitives évaluées par des tests de raisonnement non verbal, de flexibilité mentale et de mémoire de travail (Muldoon

et al. 2010). Dans une étude récente, des hommes ayant reçu 1,16 g de DHA par jour durant 6 mois présentaient un temps de réaction plus court et des femmes ayant reçu le même traitement présentaient de meilleures performances de mémoire épisodique par comparaison avec le groupe traité avec le placebo (Stonehouse et al. 2013).

L'ensemble de ces données démontre que les AGPI n-3 et plus particulièrement le DHA modulent les performances d'apprentissage et de mémoire. Cependant, selon le statut en DHA, les capacités d'apprentissage et de mémoire ne sont pas toujours influencées de la même manière.

D'autres nutriments essentiels jouent également un rôle important dans le fonctionnement cérébral et notamment dans les fonctions cognitives et mnésiques. C'est le cas de la vitamine A et plus particulièrement de l'acide rétinoïque, son métabolite actif. L'action génique de ce nutriment, dépend de sa fixation à des récepteurs nucléaires, incluant le RXR, qui est aussi un récepteur nucléaire aux acides gras. Ceci implique donc des interactions entre la voie de signalisation des AGPI n-3 et celle des rétinoïdes. Le mode d'action de ce nutriment ainsi que les interactions entre la vitamine A et des AGPI n-3 feront l'objet de la suite de cette introduction bibliographique.

III - Données générales sur la vitamine A

III.1 - Présentation des rétinoïdes

La vitamine A ou rétinol (en référence à son action au niveau de la rétine) compte de nombreux dérivés métaboliques, composés naturels ou synthétiques, rassemblés sous le terme de « rétinoïdes », dont certains sont illustrés dans la *figure 11*. Dans la cellule, le métabolisme oxydatif permet la transformation du rétinol en rétinal, lequel est finalement converti de manière irréversible en acide tout-*trans* rétinoïque (AR). Notons que la fonction alcool (-OH) du rétinol peut également être estérifiée par un acide gras, le plus souvent l'acide palmitique, pour former des esters de rétinol, ou rétinal esters qui constituent la forme de stockage de la vitamine A dans l'organisme. Ainsi les principaux métabolites actifs de la vitamine A sont le 11-*cis*-rétinal, molécule essentielle pour la vision, et l'AR, connu comme étant un puissant régulateur de l'expression génique (Al Tanoury et al. 2013). Outre leurs rôles essentiels dans la physiologie de la cellule normale, les rétinoïdes possèdent des propriétés thérapeutiques. A titre d'exemple, l'acide 13-*cis* rétinoïque (AR 13-*cis*) est utilisé en dermatologie dans le traitement de l'acné, sous le nom d'Accutane (Bershad 2001).

Les molécules de la famille des rétinoïdes possèdent des similitudes structurelles et fonctionnelles. Ainsi, leur caractère lipophile conféré par leur structure isoprénique nécessite l'action de molécules de liaisons spécifiques, permettant le transport, le stockage et leur métabolisation en molécules biologiquement actives. La structure particulière de chaque rétinoïde, liée à la fonction (alcool, aldéhyde ou acide) portée par la chaîne latérale et à la configuration des doubles liaisons (*cis* ou *trans*) qu'elle comporte, leur fournit une certaine spécificité d'activité.

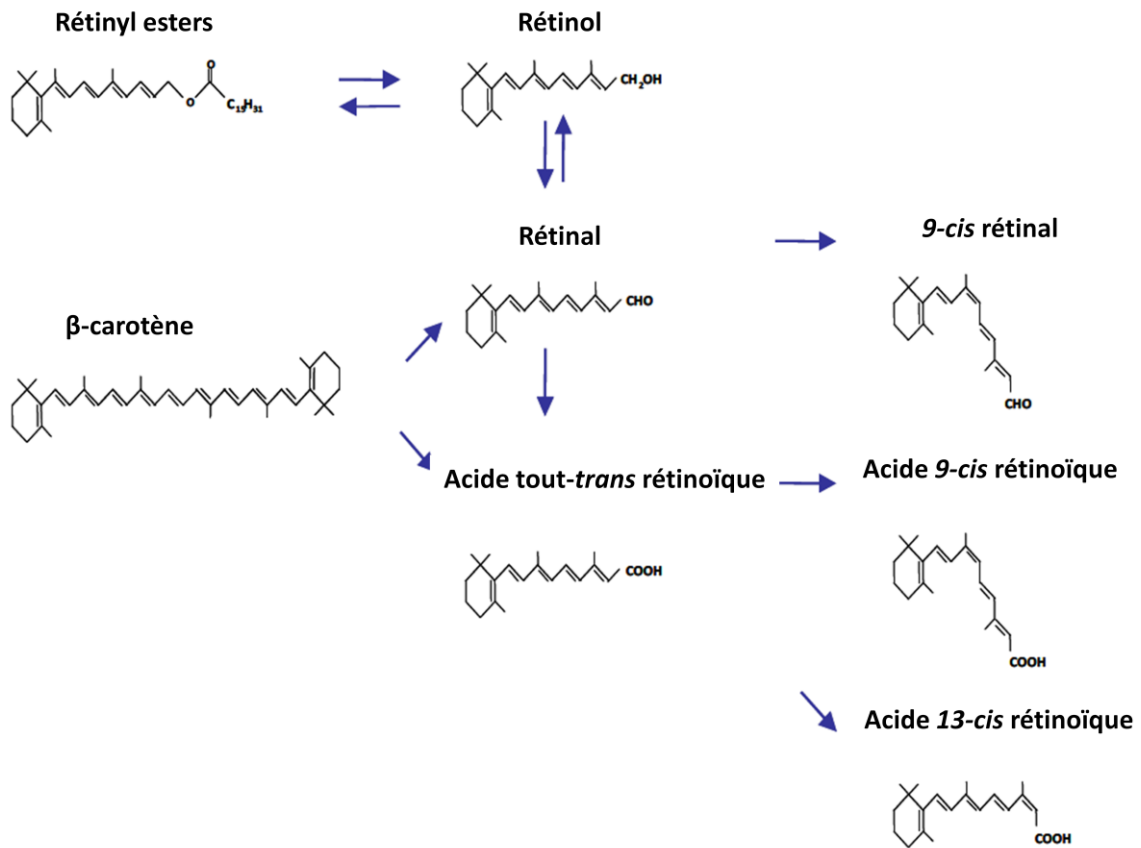


Figure 11 : Formules chimiques et voies de synthèse de quelques rétinoïdes

III.2 - Métabolisme général de la vitamine A

La vitamine A absorbée au niveau de l'intestin grêle, peut suivre deux circuits d'utilisation en fonction des besoins physiologiques. En effet, elle peut soit être captée par les cellules hépatiques pour être stockée, dans le cas d'un statut satisfaisant en vitamine A, soit directement utilisée dans les tissus cibles dans le cas d'un statut déficient (Ross A. Catharine et al. 2009). Le métabolisme de la vitamine A se décompose en trois étapes : l'absorption intestinale (à dose physiologique, 80 à 90% de la vitamine A et 50 à 60% des caroténoïdes de la ration alimentaire sont absorbés), le métabolisme hépatique (mise en réserve de 90% de la vitamine A de l'organisme dans les cellules stellaires) ainsi que la mobilisation de la vitamine A et son transport jusqu'aux tissus cibles tels que le cerveau (Ross A. C. et al. 2001, Theodosiou et al. 2010). L'ensemble de ces étapes est détaillé dans la *figure 12*.

La conversion des caroténoïdes pro-vitaminiques A en rétinol a lieu essentiellement dans la muqueuse intestinale. Les caroténoïdes sont tout d'abord convertis en deux molécules de rétinaldéhydes par l'action d'une monooxygénase (BCMO1, β,β -carotène 15,15'-monooxygenase) au sein des enterocytes, qui sont ensuite converties en rétinol. Du fait de ses propriétés hydrophobes le rétinol cytosolique est lié à une protéine de liaison nommée: cellular binding protein II (ou CRBP-II), exprimée principalement dans la muqueuse intestinale. Le rétinol nouvellement formé ainsi que celui apporté par l'alimentation sont ensuite estérifiés en rétinyl esters par l'action de différentes enzymes : la LRAT, ou lecithine retinol acyl transferase et l'ARAT : acyl-CoA retinol acyl-transferase. Ces rétinyl esters sont alors transportés, *via* les chylomicrons, vers le foie qui assure leur mise en réserve. En fonction des besoins de l'organisme, les rétinyls esters seront hydrolysés en rétinol libre qui sera sécrété dans le plasma, véhiculé par un complexe protéique composé de la retinol binding protein (RBP) et de la transthyrétine (Quattrone et al. 2001) jusqu'au tissu cible (Perusek and Maeda 2013) (*Figure 12*). Signalons que le rétinol constitue le rétinoïde le plus abondant dans le sang (95% du rétinol est lié aux protéines vectrices permettant leur transport). Le flux de rétinol libéré par le foie est très finement régulé de manière à maintenir une concentration constante de rétinol dans le plasma située entre 1 et 2 μM (Blomhoff 1994). Au-delà des besoins immédiats, la vitamine A alimentaire permet de

constituer des réserves hépatiques qui seront utilisées par la suite au cours des périodes d'apport insuffisants (Theodosiou et al. 2010).

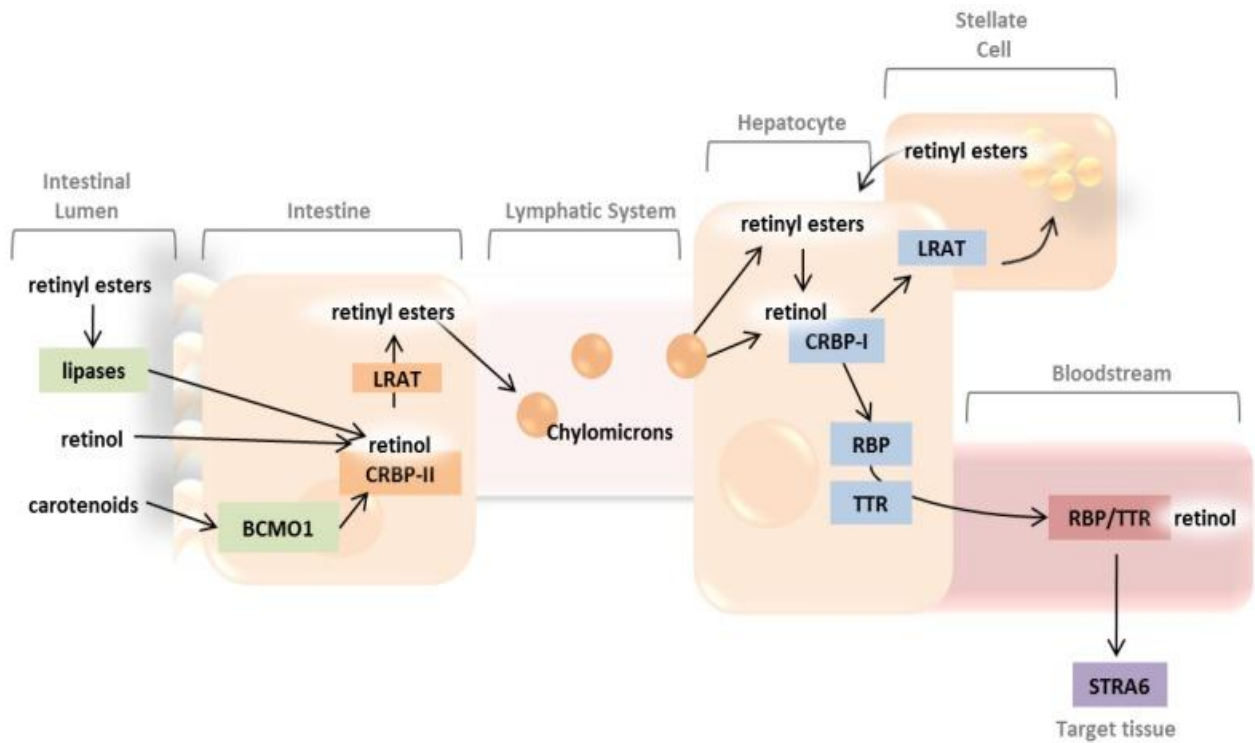


Figure 12 : Métabolisme général de la vitamine A chez les vertébrés

Source: Perusek and Maeda 2013

ARAT: acyl-CoA retinol acyl-transferase; BCMO1 : β,β -carotene 15,15'-monooxygenase; CRBP: cellular retinol binding protein; LRAT: lecithine retinol acyl transferase; RBP : retinol binding protein; STRA6: stimulated by retinoic acid receptor gene 6; TTR: transthyretin.

L'entrée du rétinol dans la cellule se fait par l'intermédiaire du récepteur transmembranaire STRA6 reconnaissant le complexe RBP/TTR (Kawaguchi et al. 2007) ou par diffusion passive (*Figure 13*). A l'intérieur, le rétinol peut subir un métabolisme non oxydatif produisant des rétinyl esters, rétinyl-phosphate, 3-déhydrorétinol, ainsi qu'un métabolisme oxydatif produisant du rétinol (aussi appelé rétinaldéhyde) puis de l'acide rétinoïque (AR), métabolite actif de la vitamine A. L'oxydation du rétinol en AR est un processus enzymatique qui se déroule en deux étapes, et dont le rétinol est le métabolite intermédiaire. La première oxydation est réversible tandis que la deuxième est irréversible. La formation du rétinol est catalysée par des enzymes appelées rétinol déshydrogénases (Gottesman et al. 2001, Joshi et al. 2006, Pares et al. 2008). Ces RDH peuvent être soit cytosoliques, et appartiennent dans ce cas à la famille des alcool déshydrogénases (ADH), soit microsomales et sont alors des déshydrogénases/réductases à chaîne courtes (SDR) (Pares et al. 2008). Le rétinol ainsi formé est alors converti de manière irréversible en AR par l'action d'aldéhydes déshydrogénases (ALDH) cytosoliques (Duester 2008). A ce niveau, l'AR peut entrer dans différentes voies d'action telles que l'activation de la transcription de gènes ou induire des effets non génomiques (*Cf V*). Il peut également être dégradé par l'action d'enzymes du catabolisme tel que le cytochrome CYP26, permettant de dégrader l'AR tout-*trans* spécifiquement (Shearer et al. 2012).

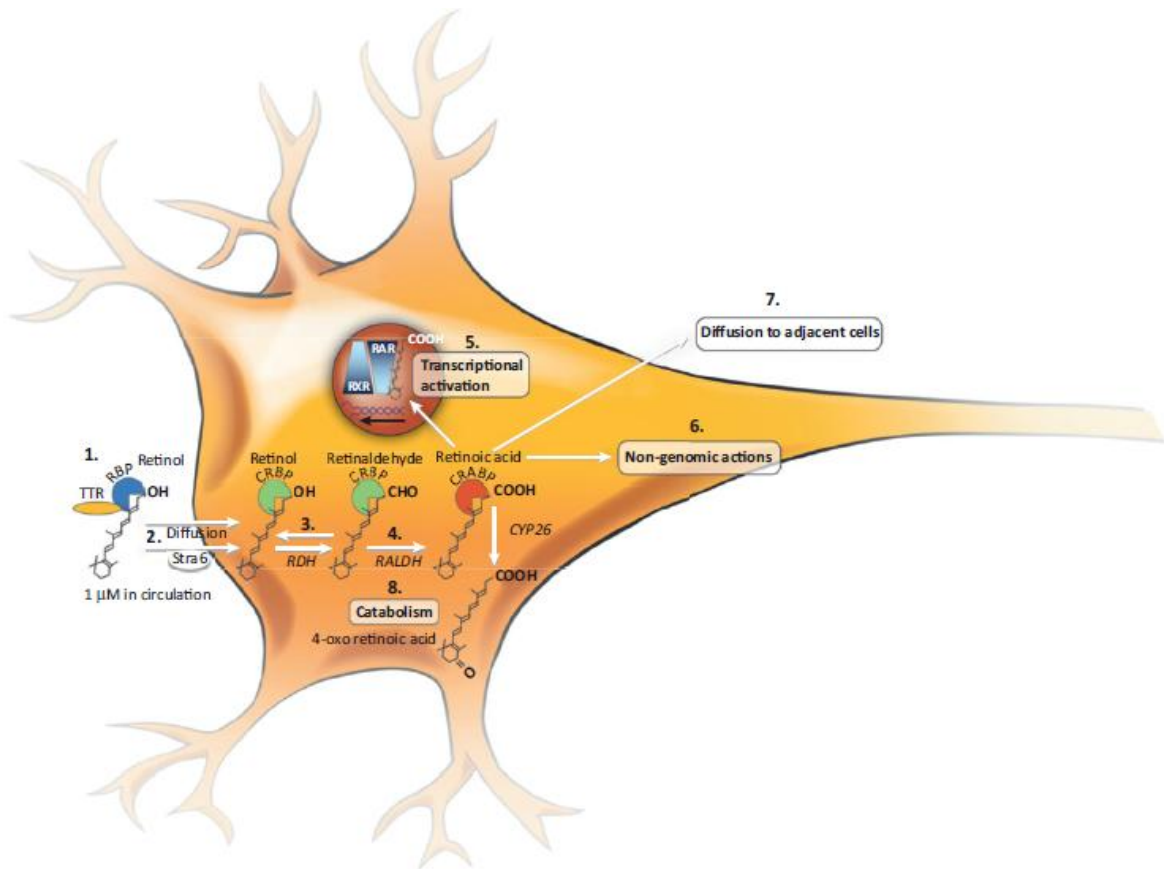


Figure 13 : Métabolisme intracellulaire de l'acide rétinoïque

Source : Shearer et al. 2012

Le rétinol circulant est pris en charge par le complexe retinol binding protein (RBP) – transthyrétine, puis transféré dans la cellule par le récepteur trans-membranaire STRA6. A l'intérieur, le rétinol est transformé de manière réversible en rétinol (ou rétinolaldéhyde) par des alcool/rétinol deshydrogenases (ADH ou RDH), le rétinol est ensuite métabolisé, de manière irréversible, en acide rétinoïque (AR) par des rétinolaldéhyde deshydrogenases (RALDH). L'AR ainsi formé est pris en charge par la cellular retinoic acid binding protein (CRABP) et peut alors agir dans le noyau comme ligand des récepteurs nucléaires RAR (retinoic acid receptor) et RXR (retinoid X receptor) pour réguler la transcription de gènes cibles.

III.3 - Données de consommation en vitamine A

III.3.1 - Sources alimentaires de la vitamine A

La vitamine A est apportée à l'organisme par l'alimentation sous forme d'esters de rétinol présents essentiellement dans des produits d'origine animale, dont les principaux fournisseurs sont les abats et la charcuterie qui contribuent respectivement à 29 et 20% des apports chez l'adulte, soit en moyenne 202 et 143 µg/jour (données issues de l'Etude INCA 2 2006 – 2007). Elle peut également provenir de sources végétales sous forme de caroténoïdes, pigments végétaux précurseurs des rétinoïdes. Les caroténoïdes, dont le β-carotène possède la plus importante activité vitaminique A, pourront alors être convertis en rétinoïdes au niveau de l'intestin (D'Ambrosio et al. 2011). Les principales sources d'apport en β-carotène sont les légumes qui contribuent à 60% des apports soit en moyenne 2011 µg/jour et les fruits qui représentent 6% des apports, soit en moyenne 206 µg/jour (données issues de l'Etude INCA 2 2006 – 2007). Les contenus en rétinol et β-carotène des aliments riches en vitamine A sont présentés dans le tableau 6.

III.3.2 - Apports nutritionnels conseillés et données de consommation en vitamine A

L'Homme étant incapable de synthétiser la vitamine A, il doit se la procurer par l'alimentation, soit sous forme de rétinol ou de rétinyl esters (produits d'origine animale), soit sous forme de caroténoïdes (produits végétaux). Cependant les besoins en vitamine A sont difficiles à établir, en particulier à cause de la difficulté à évaluer le pouvoir provitaminique A des caroténoïdes contenus dans les aliments. En effet, de nombreux facteurs nutritionnels, physiologiques ou environnementaux semblent modifier l'absorption intestinale du β-carotène et sa conversion en vitamine A dans l'organisme. A titre d'exemple, la cuisson des carottes semble améliorer la biodisponibilité du β-carotène contenu dans cet aliment. De plus, l'absorption intestinale des caroténoïdes nécessite un taux minimal de lipides dans la ration alimentaire, et semble être affecté par la longueur de la chaîne hydrocarbonée des acides gras (Huo et al. 2007, van Het Hof et al. 2000). Tous ces facteurs rendent donc délicate l'estimation des apports nutritionnels conseillés.

Tableau 6 : Teneurs en rétinol et β -carotène d'aliments riches en vitamine A

Aliment	Rétinol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	β -carotène ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Vitamine A totale (ER/100g)
Foie	10 800 – 23 500	1 500	10 000 – 21 500
Carotte	0	9 000 – 10 000	1 350 – 1 500
Poisson gras	800 – 1 000	0	720 – 900
Beurre	700	500	720
Épinard, blette	0	4 500	680
Fromages, crème	200 – 380	50 – 220	180 – 360
Fruits (melon, mangue, abricots)	0	1 500 – 3 000	230 – 460
Œuf entier	200	40	200
Brocolis, poireaux	0	400	60
Lait entier	50	13	48
Fruits (pomme, raisin, kiwi)	0	50 – 70	9 - 12

Source : Martin 2001

ER : Equivalent rétinol. 1 μg ER correspond à 6 μg de β -carotène ou 1 μg de rétinol.

Tableau 7 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine A pour certaines catégories de la population française

Catégorie	Vitamine A (ER par jour)
Nourrisson	350
Adolescents de 16 à 19 ans et hommes adultes	800
Adolescentes de 16 à 19 ans et femmes adultes	600
Homme âgé de plus de 75 ans	700
Femme âgée de plus de 75 ans	600

Source: Martin 2001

ER : Equivalent rétinol. 1 µg ER correspond à 6µg de β-carotène ou 1 µg de rétinol

Les ANC en vitamine A sont exprimés en équivalent rétinol (ER, 1 µg ER = 1 µg de rétinol = 6 µg de β-carotène) et sont proposés pour couvrir les besoins nutritionnels « normaux » pour la population. Ils varient en fonction de l'âge et de l'état physiologique. Pour la population française, les ANC sont estimés entre 350 µg ER chez le nourrisson et 950 µg ER chez la femme allaitante. Chez l'Homme adulte, les ANC en vitamine A sont de 800 µg ER par jour, chez la femme adulte, ils sont de 600 µg comme le montre le tableau 7. Classiquement, il est conseillé qu'environ 60% de l'apport soit sous forme de caroténoïdes. La dernière étude individuelle nationale sur les consommations alimentaires (étude INCA 2, 2006-2007) a montré que les apports moyens en rétinol dans la population française sont de 702 µg/jour chez les adultes de 18 ans et plus, soit proches des ANC. Par ailleurs, ces apports s'avèrent plus élevés dans la population masculine aussi bien chez les adultes que chez les enfants. En ce qui concerne les apports moyens en β-carotène, ils sont de 3335 µg/jour chez l'adulte, valeur également proche des ANC. Il semble que la carence en vitamine A n'existe pas dans les pays industrialisés, contrairement aux problèmes de santé publique majeurs qu'elle pose dans les pays en développement. La carence en vitamine A se traduit notamment par des atteintes de la sphère oculaire et une cécité irréversible. Elle reste rare dans les pays industrialisés mais il peut toutefois apparaître des états précairentiels ou subcairentiels, dans des groupes vulnérables (enfants et personnes âgées), qui sont souvent

sans expression clinique révélatrice et donc difficiles à diagnostiquer. A l’opposé, l’hypervitaminose A peut également avoir de graves conséquences telles qu’une augmentation de la pression intracrânienne, des nausées, des troubles hépatiques ou des malformations fœtales. Ainsi, une limite d’apport maximal tolérable a été fixée à 3000 µg ER /jour pour l’adulte en Europe en 2002.

III.4 - Rôles physiologiques des rétinoïdes

III.4.1 – Rôles généraux des rétinoïdes

La vitamine A, est indispensable à tous les âges de la vie. Les fonctions très variées des rétinoïdes sont assurées par trois métabolites actifs essentiels : le 11-*cis* rétinol, l’acide tout-*trans* rétinoïque et l’acide 9-*cis* rétinoïque. Parmi ces métabolites, le rôle primordial de l’acide 11-*cis* rétinol dans les fonctions visuelles est maintenant clairement établi. La vitamine A intervient également dans la régulation de l’expression de nombreux gènes et est ainsi impliquée dans de nombreuses fonctions de l’organisme telles que le développement de l’embryon, la croissance cellulaire, le renouvellement des tissus (peau et muqueuse intestinale), le système immunitaire ou encore la régulation des cycles du sommeil (Gudas 2012, Sei 2008). En plus des propriétés de la vitamine A, le β-carotène peut agir en tant qu’antioxydant. Les incidences physiologiques marquées d’une carence en vitamine A ou à l’inverse d’une intoxication par excès d’apports révèlent l’étendue de l’action des rétinoïdes. Les principaux signes cliniques observés lors d’un déséquilibre de l’apport en vitamine A sont résumés dans le tableau 8.

III.4.2 – Les rétinoïdes, modulateurs de l’expression génique

Les nombreuses fonctions physiologiques attribuées à la vitamine A sont liées au nombre important de gènes régulés par ses métabolites. En effet, à l’instar des acides gras polyinsaturés, le mode d’action nucléaire de la vitamine A s’apparente à une action hormonale. L’AR va agir directement dans le noyau, en se liant à des facteurs de transcription membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ainsi, l’acide tout-*trans* rétinoïque et son isomère l’acide 9-*cis* rétinoïque, sont des ligands spécifiques des récepteurs nucléaires RAR (retinoic acid receptors). L’acide 9-*cis* rétinoïque, dont la présence in vivo est discutée (Schaefer et al. 2006), lie les RXR (retinoid X receptor). L’activation des

récepteurs nucléaires pas l'AR, permet l'interaction de ces facteurs de transcription avec des éléments de réponses de l'ADN, permettant l'initiation ou la répression de la transcription de gènes cibles. Ce mécanisme d'action sera détaillé dans le paragraphe V.1.2 de cette introduction.

Tableau 8 : Symptômes observés en cas de déficience ou d'excès d'apport en vitamine A

	Déficience en vitamine A	Excès de vitamine A
Peau	Lésions cutanées	Desquamation cutanée et du cuir chevelu
Vision	Xérophtalmie Cécité nocturne	Troubles visuels
Alimentation	Anorexie	Anorexie, vomissements, douleurs abdominales
Croissance	Ralentissement	Troubles chez l'enfant
Reproduction	Troubles de la spermatogénèse	Risque de tératogénèse

IV - Le cerveau, organe cible de l'acide rétinoïque

Le rôle des rétinoïdes dans le développement du SNC est connu depuis longtemps. Ce n'est que plus récemment que leur rôle dans le cerveau adulte a été étudié (Maden 2002, Mey and McCaffery 2004, Tafti and Ghyselinck 2007) et que la présence de l'AR a été détectée (Kane et al. 2005).

IV.1 – Transport du rétinol vers le cerveau

Plusieurs études ont porté sur les mécanismes d'apport du rétinol au niveau du cerveau et de son passage à travers la BHE. Ainsi, Yamagata et al. (1993) ont mis en évidence chez le rat, le transport jusqu'au cerveau de rétinol préalablement injecté dans la cavité péritonéale. D'autres résultats obtenus dans des conditions d'apports suffisants en vitamine A chez le rat, ont montré que 90% de l'AR total du cerveau n'est pas synthétisé localement mais provient du pool circulant dans le plasma (Kurlandsky et al. 1995). Par la suite, il a été montré que l'isomère de l'AR dans sa forme tout-*trans* est celui qui est le plus transporté du sang au cerveau par comparaison avec les deux autres formes : l'AR 13-*cis* et l'AR 9-*cis* (Le Doze et al. 2000). Par ailleurs, la présence de l'AR au niveau cérébral a été montrée chez des rats carencés en vitamine A puis traités avec de l'AR, l'hippocampe et le cortex contenant les proportions les plus importantes (Werner E. A. and DeLuca 2002). Une autre étude menée sur des souris de 4 mois supplémentées en vitamine A au cours de la période périnatale (30 UI/g), a également montré une répartition hétérogène de l'AR tout-*trans* endogène dans les structures cérébrales, où les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans le bulbe olfactif, le thalamus et le striatum (Kane et al. 2005).

IV.2 - Métabolisme cérébral

Bien que les besoins en AR au niveau cérébral soient largement couverts par le pool circulant, le cerveau adulte possède toute la machinerie nécessaire à la synthèse de l'AR

ainsi qu'à son transport et son action nucléaire (Goodman et al. 2012, Lane and Bailey 2005, Shearer et al. 2012).

Plusieurs études ont en effet révélé la présence des protéines de transport telles que CRBP et CRABP (D'Ambrosio et al. 2011, Zetterstrom et al. 1994, Zetterstrom et al. 1999), des enzymes de conversion telles que ADH1, ADH4 (Martinez S. E. et al. 2001) et RALDH 1 et RALDH 2 (McCaffery and Drager 1994, Shearer et al. 2010) au sein de structures cérébrales particulières impliquées dans les processus mnésiques comme l'hippocampe et le striatum, ou encore dans l'hypothalamus.

Outre la mise en évidence de la présence des enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A, le cerveau adulte est capable de synthétiser efficacement l'AR *de novo* (Dev et al. 1993). En effet, la synthèse de l'AR a été mise en évidence dans le cerveau de souris adultes et plus particulièrement au sein du striatum, où cette synthèse serait plus importante que dans l'hippocampe (McCaffery and Drager 1994). Par ailleurs, d'autres équipes ont pu mettre en évidence la synthèse de l'AR par l'action de la RALDH2 au niveau des méninges adjacentes à l'hippocampe chez le rongeur (Sakai et al. 2004). Enfin, des données chez l'Homme ont pu mettre en évidence la présence de rétinol et de ses métabolites dans les tissus cérébraux matures, notamment dans l'hippocampe (Ali et al. 2012, Connor M. J. and Sidell 1997).

IV.3 - Rôle de l'acide rétinoïque dans le fonctionnement cérébral

Plusieurs études ont démontré l'implication des rétinoïdes dans la plasticité cérébrale et les processus mnésiques (Olson and Mello 2010).

IV.3.1 - Acide rétinoïque et modulation de la plasticité cérébrale

De nombreux travaux se sont intéressés au rôle clef de la vitamine A dans le développement du SNC. Ainsi, un certain nombre d'études *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'AR agit sur la différenciation neuronale, la croissance neuritique et la mise en place du tube neural au cours du développement (Kim et al. 2010, Rhinn and Dolle 2012, Simpson et al. 2001). D'autres études ont montré l'implication de l'AR dans les processus de neurogenèse

dans le cerveau adulte. Parmi les gènes cibles des rétinoïdes figurent des gènes codant pour des protéines intervenant dans les processus de neurogenèse telles que les neurotrophines NGF et BDNF, et leurs récepteurs respectifs TrkA et TrkB (Scheibe and Wagner 1992). Ainsi, des études menées sur des cellules progénitrices neurales en culture ont montré l'implication des rétinoïdes dans leur différenciation en neurones ou en astrocytes, via l'activation respective de RAR α et RAR β (Goncalves et al. 2005).

Par ailleurs, des travaux menés sur des modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la neurogenèse adulte. Ainsi, des travaux menés au laboratoire ont montré une altération de la neurogenèse hippocampique chez des rats carencés en vitamine A durant 14 semaines. De plus, l'injection journalière d'AR (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) durant les 4 dernières semaines de carence a permis de reverser les effets délétères de la carence en vitamine A (Bonnet et al. 2008).

Outre l'implication des rétinoïdes dans la formation de nouveaux neurones, des études ont rapporté leur implication dans la plasticité synaptique. Des travaux menés au laboratoire ont démontré la diminution de l'expression de RC3 (ou neurogranine), protéine impliquée dans la synaptogenèse, dans le cerveau de rats carencés en vitamine A (Enderlin et al. 2000, Husson et al. 2003). La baisse de l'expression de cette protéine a été mise en évidence plus spécifiquement au sein de l'hippocampe (Etchamendy et al. 2003) et du striatum (Husson et al. 2004) d'animaux carencés en vitamine A. Cependant, un traitement pharmacologique à l'AR ne permet pas de restaurer le niveau d'expression de RC3. Par ailleurs, une diminution de l'expression protéique de GAP-43 a également été mise en évidence chez des rats carencés en vitamine A (Husson et al. 2004).

D'autres travaux ont démontré l'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la mise en place de la PLT ainsi que de la dépression à long terme (Chiang et al. 1998). Par ailleurs, chez des souris carencées en vitamine A durant 12 semaines, il a été observé une altération de la PLT dans l'hippocampe, celle-ci pouvant être reversée par une alimentation supplémentée en vitamine A (Misner et al. 2001).

IV.3.2 - Acide rétinoïque et modulation des performances mnésiques

L'action des rétinoïdes sur différents mécanismes de la plasticité cérébrale permet ainsi de moduler la mise en place des processus mnésiques.

Un certain nombre de travaux menés sur des modèles animaux de carence en vitamine A ont démontré que cette carence est associée à des troubles mnésiques. Ainsi, un régime alimentaire déficient en vitamine A durant 39 semaines, induit une altération irréversible de la mémoire relationnelle associée à une hypoexpression des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes et à une diminution de l'expression des ARNm de RC3 chez la souris (Etchamendy et al. 2003). Une autre étude menée chez le rat a montré que le déficit de mémoire spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris induit par la carence en vitamine A, a pu être restauré par une administration pharmacologique d'AR (Bonnet et al. 2008). D'autres études ont conforté l'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les processus cognitifs. En effet, il a été montré qu'une carence en vitamine A induisait des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans un labyrinthe radial, qui pouvaient être reversés par une supplémentation nutritionnelle en vitamine A (Cocco et al. 2002). Cependant, il semblerait que l'isomère 13-*cis* de l'AR, n'ait pas d'effet bénéfique sur la mémoire hippocampo-dépendante comme c'est le cas pour l'AR tout-*trans*. Au contraire, des effets délétères de cette molécule administrée à forte dose chez la souris ont été observés sur ce type de mémoire (Crandall et al. 2004). D'autres auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet sur la mémoire lié à l'administration de 13-*cis* AR chez le rat (Ferguson and Berry 2007). Chez l'Homme, une étude récente a testé les effets de cette molécule, utilisée comme traitement contre l'acné, sur la mémoire visuospatiale. Cette étude n'a pas mis en évidence d'effet délétère, mais au contraire a montré une diminution du temps de réaction dans une tâche de reconnaissance visuelle ainsi qu'une corrélation du score obtenu dans une autre tâche testant la mémoire visuelle avec la dose de 13-*cis* AR reçue (Ormerod et al. 2012).

V - Mode d'action cellulaire des AGPI n-3 et des rétinoïdes

Parmi les mécanismes d'action précédemment évoqués des AGPI-LC n-3 et de l'AR au niveau du SNC, nous avons porté notre attention sur l'implication de ces nutriments dans la régulation de la transcription du génome *via* l'activation de facteurs de transcription, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le mode d'action génomique des acides gras et de la vitamine A, a en effet fait l'objet d'un grand nombre de recherche depuis plusieurs années et présente de nombreuses similitudes. Un autre mode d'action des AGPI n-3 et des rétinoïdes a également été décrit par ailleurs, induisant la modulation des cascades de signalisation cellulaire *via* une action non génomique des récepteurs nucléaires.

V.1 - La superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des protéines transrégulatrices capables de se fixer principalement sous forme de dimères, au niveau de sites spécifiques de l'ADN, appelés éléments de réponse et situés en amont du gène cible (occasionnellement dans les introns) (Evans 2005). Il existe une forte homologie de structure entre les membres de la famille des récepteurs nucléaires, qui comprend notamment les récepteurs de différents ligand hydrophobes tels que les hormones stéroïdiennes, les hormones thyroïdiennes, les dérivés hydroxylés de la vitamine D, l'acide rétinoïque ou encore les acides gras et les eicosanoïdes (Huang et al. 2010). Certains récepteurs de la superfamille n'ont à ce jour pas de ligand identifié, c'est la raison pour laquelle ils sont regroupés sous le terme de récepteurs orphelins (Willson and Moore 2002). Généralement, les récepteurs nucléaires de la superfamille sont classés en fonction de leur mode de fonctionnement : en homodimère ou en hétérodimère avec RXR (Kishimoto et al. 2006). Plusieurs classes ont ainsi été définies comme le montre la *figure 14*.

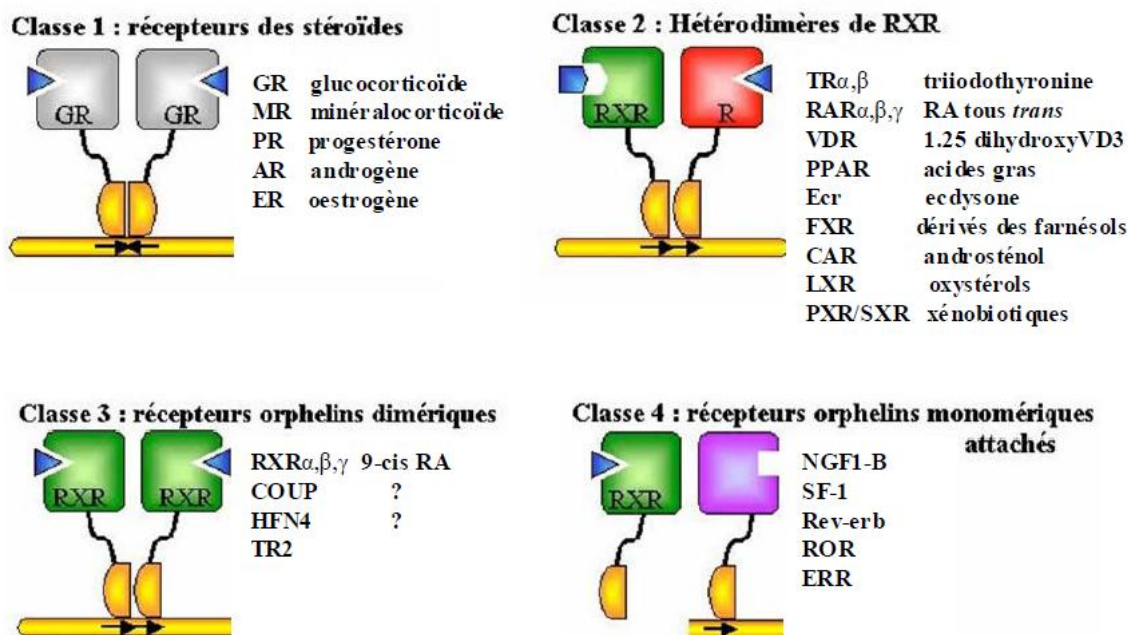


Figure 14: Organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires

Adapté de Olefsky et al. 2001

AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur des oestrogènes ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans* ; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ; TR : récepteur de la triiodothyronine ; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération péroxysomale ; Ecr : récepteur de l'ecdysone ; FXR : récepteur des acides biliaires ; CAR : récepteur de l'androstane ; LXR : récepteur de l'oxystérol ; PXR/SXR : récepteur des xénobiotiques ; VDR : récepteur de la vitamine D3 ; ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'oestrogène ; HFN4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte ; TR2 : récepteur testiculaire.

V.1.1 - Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de structure protéique, constituée de quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (*figure 15*).

Le domaine A/B : Ce domaine est impliqué dans transactivation de manière indépendante du ligand (AF-1). Il est faiblement conservé et correspond à l'extrémité N-terminale (-NH₂) de la protéine codée (Nagpal et al. 1992).

Le domaine C : Ce domaine de liaison à l'ADN, de 66 à 68 acides aminés, montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Deux motifs en doigt de zinc jouent un rôle complémentaire dans la liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles. Ce domaine participe également à la dimérisation des récepteurs (Huang et al. 2010, Khorasanizadeh and Rastinejad 2001, Rastinejad 2001).

Le domaine D : Ce domaine est une région charnière entre les domaines C et E permettant la réalisation de différentes configurations fonctionnelles. Elle pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs (Germain et al. 2006b).

Le domaine E : C'est le domaine de liaison au ligand (ou LBD, Ligand binding domain). Situé à l'extrémité carboxyle, il possède une structure complexe et longue en acides aminés, permettant la fixation des ligands et l'interaction avec les complexes de co-activateurs (Greschik et al. 2002). Dans certains cas, le LBD peut aussi constituer une surface de dimérisation (Bourguet et al. 2000, Moras and Gronemeyer 1998). Enfin, dans la plupart des LBD se trouve la fonction AF-2 qui joue un rôle dans la régulation de la transcription dépendante du ligand.

Le domaine F : Il n'est présent que sur certains récepteurs (RAR, ERs ou TRs) dans la partie C-terminale. Il est de taille variable et sa fonction est encore inconnue (Omalley 1990).

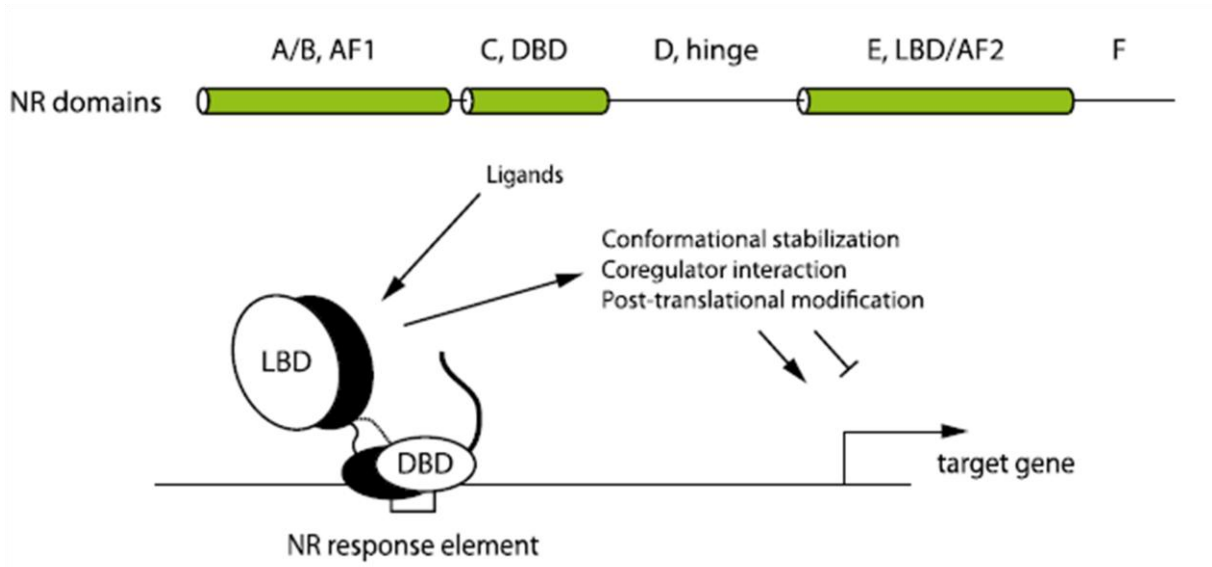


Figure 15: Structure en domaines des récepteurs nucléaires

Adapté de Burris et al. 2013

NR: nuclear receptor ; DBD : DNA binding domain ; LBD : Ligand binding domain

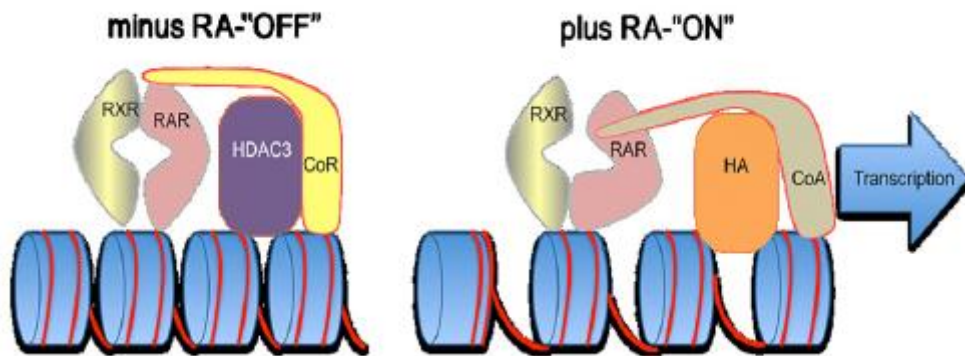


Figure 16: Modèle du mécanisme d'activation de la transcription par l'hétérodimère RAR/RXR

Source : Linney et al. 2011

Modèle du « switch » épigénétique : A gauche : position « OFF » : en l'absence de ligand l'hétérodimère RAR/RXR est fixé à l'élément de réponse RARE (RA Response Element) et recrute des corépresseurs (CoR), liés à un complexe histone déacétylases (HDAC3) induisant la condensation de l'ADN qui le rend inaccessible pour sa transcription. A droite : position « ON » : La liaison de l'AR au RAR induit une régulation allostérique permettant la libération des corépresseurs et le recrutement de co-activateurs, liés à un complexe histone acétyltransférase (HA), facilitant l'accès à la chromatine pour la transcription.

V.1.2 - Mode d'action génomique des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires liés à leur ligand fonctionnent de manière similaire (Bastien et Rochette-Egly, 2004)(Bastien and Rochette-Egly 2004). Ces protéines se fixent généralement à l'ADN sous forme de dimère (homo- ou hétérodimères), au niveau de séquences spécifiques nommées: éléments de réponses aux hormones (HRE, hormone response element) située en amont du gène cible. Dans la majorité des cas, les dimères de récepteurs sont fixés à l'ADN en présence ou non du ligand (*figure 15*) comme c'est le cas pour les récepteurs nucléaires à l'AR ou aux AG, RAR, RXR ou PPAR. Cependant, dans le cas de certains récepteurs aux hormones, c'est la fixation du ligand au récepteur qui permet sa dimérisation et la liaison à l'élément de réponse. Plusieurs types de HRE ont été définis en fonction du type de récepteur responsable de l'activation de la transcription. A titre d'exemple, l'élément de réponse aux PPAR est le peroxisome proliferator-activated response element (PPRE), celui des RAR est le retinoic acid response element (RARE). La construction et le fonctionnement de ces éléments de réponse restent relativement conservés entre les différents types de récepteurs. Ainsi, ces éléments de réponse comprennent deux demi-sites, pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétée (DR), mais parfois plus complexe, séparée par 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus. Notons que plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire avec une affinité plus ou moins forte, favorisant ou non la transcription (Morris et al. 2005).

Signalons que l'action génomique des récepteurs nucléaires dépend non seulement de la fixation du ligand mais également d'un remodelage de la chromatine permettant la transcription. Ces modifications épigénétiques dépendent elles-mêmes de la libération de corépresseurs sous-tendue par la fixation du ligand, suivie par le recrutement de co-activateurs permettant le recrutement et/ou l'activation de la machinerie transcriptionnelle (Kato Shigeaki and Fujiki 2011, Linney et al. 2011) (*Figure 16*). Notons, qu'un grand nombre de molécules peuvent jouer le rôle de co-activateurs. A l'heure actuelle, plus d'une centaine ont été recensés (Green Christopher D. and Han 2011).

V.2 - Les récepteurs nucléaires des acides gras

Outre leur rôle structural, les AG peuvent réguler de nombreuses fonctions physiologiques notamment par leur action sur les récepteurs nucléaires, comprenant entre autres, les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) et les RXR (retinoid X receptor). D'autres récepteurs nucléaires aux acides gras ont largement été décrits dans la littérature tels que LXR (liver X receptor), HNF4 (epatic nuclear factor-4) et SREBP (Sterol Regulatory element binding protein-1c) (Bordoni et al. 2006), cependant ce travail de thèse s'est particulièrement centré sur les PPAR et les RXR, intervenant également dans la voie de signalisation des rétinoïdes et jouant un rôle important dans le fonctionnement du cerveau adulte.

V.2.1 - Les PPAR

Chez les vertébrés, 3 isotypes de PPAR ont été décrits, nommés α (ou Nr1c1), δ (encore appelé β ou Nr1c2) et γ (ou Nr1c3). Chaque isotype de PPAR étant issu d'un gène différent, il en existe plusieurs variants (ou isoformes), issus de l'épissage alternatif (Bordoni et al. 2006). L'ensemble de ces récepteurs est organisé en domaines (A/B, C, D et E/F) comme décrit précédemment (*figure 15*).

Le domaine N-terminal A/B, qui contient une fonction de transactivation indépendante de la présence du ligand, est phosphorylé par la voie de signalisation des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) sur les isoformes de PPAR α et PPAR γ . Le domaine C, ou de liaison à l'ADN, est le plus conservé parmi tous ceux des récepteurs nucléaires et sert donc de référence pour la superfamille. Les structures en doigts de zinc forment une structure globulaire permettant la reconnaissance de la séquence d'ADN hexanucléotidique : AGGTCA. Ainsi, l'hétérodimère PPAR/RXR reconnaît un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de cette séquence et séparées par un seul nucléotide (DR1). Ce motif est appelé PPRE (van Bilsen et al. 2002).

Les différents isotypes de PPAR sont capables d'interagir spécifiquement avec de nombreux ligands, parmi lesquels se trouvent des composants naturels majeurs tels que les acides gras. Ces ligands peuvent être d'origine naturelle ou synthétique, distinguant ainsi deux groupes d'appartenance (Ehrmann et al. 2002).

Il a été démontré dans les années 1990 que les trois types de PPAR peuvent lier les AG, avec une affinité préférentielle pour les AGPI-LC (Georgiadi and Kersten 2012). D'autres études ont en effet pu démontrer une interaction physique entre les acides gras et les PPAR (Malapaka et al. 2012, Murakami et al. 1999, Xu et al. 1999), établissant la capacité des acides gras à agir comme des hormones. Outre les acides gras, les PPAR sont également capables de lier leurs dérivés oxygénés tels que les eicosanoïdes comprenant les prostaglandines et les prostacyclines, démontrant l'implication de ces récepteurs dans la réponse inflammatoire. D'autres dérivés des AG appartenant à la famille des endocannabinoïdes ont également été décrits comme ligands des PPAR (Georgiadi and Kersten 2012).

Il existe un certain nombre de ligands synthétiques des PPAR, jouant un rôle notamment dans le métabolisme lipidique (Ehrmann et al. 2002, Sanderson et al. 2008). Ainsi, les fibrates et clofibrates sont des agents hypolipémiants, activant les PPAR α . D'autres, ligands de PPAR γ , sont utilisés comme antidiabétiques. Enfin, des antihyperglycémiques et des antihyperlipémiants se sont avérés de bons ligands de PPAR γ et PPAR δ (Chawla et al. 2001, van Bilsen et al. 2002). Ces données révèlent le rôle primordial de ces récepteurs dans la régulation des statuts glycémiques et lipidiques.

Les PPAR traduisent des stimuli nutritionnels, pharmacologiques et métaboliques en modifiant l'expression des gènes, et exercent ainsi des fonctions majeures dans l'organisme. Aujourd'hui ces récepteurs nucléaires sont considérés comme des « senseurs » lipidiques (Chawla et al. 2001, He J. et al. 2010, Kota et al. 2005).

V.2.2 - Distribution tissulaire des PPAR

Chaque type de récepteur possède un patron de distribution tissulaire qui lui est propre (Kota et al. 2005, van Bilsen et al. 2002). Ainsi, PPAR α est présent dans de nombreux tissus, prédominant dans le tissu adipeux brun, le muscle cardiaque, le cœur, le foie, les reins ou la muqueuse intestinale de rat et de l'Homme. Chez l'Homme, il est également exprimé dans les muscles squelettiques et le pancréas. PPAR δ est présent dans de nombreux types cellulaires chez l'Homme et le rat. Il a été retrouvé à ce jour dans tous les tissus étudiés avec des niveaux d'expression relativement élevés dans le tissu adipeux, la peau et le cerveau. PPAR γ quant à lui est exprimé majoritairement dans les adipocytes et les macrophages,

retrouvé dans le tissu adipeux blanc et brun et le côlon chez le rat (Bookout et al. 2006, Escher et al. 2001).

V.2.3 - Localisation des PPAR dans le SNC

Le SNC étant riche en AG, les PPAR sont également exprimés dans celui-ci. Ainsi, des données obtenues chez le rat âgé de 11 jours ont montré que l'expression des ARNm de PPAR δ était la plus importante dans diverses régions cérébrales comme le cervelet ou le cortex par rapport aux deux autres isotypes ; PPAR γ étant le plus difficile à détecter dans les régions étudiées (Cullingford et al. 1998). Il semble en effet que PPAR δ soit exprimé de façon ubiquitaire dans le SNC mais que son expression varie d'une structure cérébrale à l'autre. Ainsi, chez le rat, des niveaux d'expression relativement élevés dans le gyrus denté de l'hippocampe, le cortex, le cervelet et le thalamus ont été rapportés (Braissant et al. 1996, Heneka and Landreth 2007, Kremarik-Bouillaud et al. 2000, Moreno et al. 2004, Xing et al. 1995). Chez la souris et le rat, la présence des ARNm ainsi que des protéines de PPAR δ ont été détectées majoritairement dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et l'hypothalamus. Un plus faible niveau d'expression a été mesuré dans le corps calleux et le putamen. Par ailleurs, il semblerait que cette expression soit restreinte aux neurones et aux oligodendrocytes (Woods et al. 2003). La distribution tissulaire dans le SNC et les types cellulaires exprimant PPAR δ est reporté dans le tableau 9. PPAR α a également été retrouvé dans les corps cellulaires neuronaux de la moelle épinière ainsi qu'au sein des astrocytes de la substance blanche (Benani et al. 2003). En ce qui concerne PPAR γ , il a été détecté par des techniques d'immunomarquage chez la souris dans les neurones des noyaux arqué, latéral, ventromédial et paraventriculaire de l'hypothalamus ainsi que dans l'aire tegmentale ventrale (Sarruf et al. 2009).

Tableau 9 : Localisation de PPAR δ dans le système nerveux central, détecté chez le rat et la souris

	Localization	Species	Method	Refs.
Brain region/ Tissue	Widespread in brain and spinal cord	Rat	Biotinyl-tyramide immunocytochemistry	(Moreno et al. 2004)
	Thalamus, hippocampus, cortex	Rat	<i>In situ</i> hybridization with riboprobes	(Xing et al. 1995)
	Cerebellum	Rat	Western blot and immunocytochemistry	(Kremarik-Bouillaud et al. 2000)
Cell types	Spinal cord	Rat	RT-PCR and Western blot	(Benani et al. 2003)
	Cortex/cerebellum neurons and astrocytes	Rat	RNase protection assay	(Cullingford et al. 1998)
	Oligodendrocytes and neurons from entorhinal cortex, hypothalamus and hippocampus	Mouse	<i>In situ</i> hybridization and immunolocalization	(Woods et al. 2003; Higashiyama et al. 2007; Girroir et al. 2008)
	Oligodendrocytes	Mouse	RT-PCR	(Granneman et al. 1998)
	Primary astrocytes	Human	RT-PCR and sequencing	(Chattopadhyay et al. 2000)

RT-PCR, reverse-transcription-polymerase chain reaction.

Source : Aleshin et al. 2013

V.2.4 - Rôles des PPAR dans le cerveau mature

De nombreux effets induits par l'activation des PPAR dans le cerveau mature ont été décrits, notamment pour PPAR γ et PPAR δ . Ainsi, l'activation de PPAR γ , de part son expression dans l'hypothalamus, serait impliquée dans la régulation de la balance énergétique (Ryan et al. 2011). Il a également été rapporté une implication de cet isotype dans la régulation de réponse inflammatoire au niveau du SNC, intervenant de ce fait dans la prévention de maladies neurodégénératives de type Alzheimer et la neuroprotection (Sundararajan et al. 2006). Par ailleurs, il a été montré que des agonistes de PPAR γ ont un effet positif sur la mise en place des processus mnésiques tels que la PLT au niveau de la synapse hippocampique (Costello et al. 2005). En outre, une étude récente a montré que des rats soumis à un régime enrichi en AGPI n-3 présentaient une augmentation de l'expression de PPAR γ et de PPAR α au niveau de l'hippocampe, associée à une amélioration des performances de mémoire spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris (Hajjar et al. 2012). Concernant PPAR δ , un certain nombre d'études ont également rapporté les effets neuroprotecteurs de ce récepteur (Aleshin Stepan et al. 2013). Bien qu'il existe plusieurs isotypes de PPAR, les ligands naturels de ce récepteur ont une spécificité de liaison à un isotype particulier relativement faible et peuvent généralement induire l'activation de plusieurs isotypes. Ainsi, il a été rapporté que les trois isotypes de PPAR pourraient agir en interaction dans la régulation du stress oxydatif et la neuroprotection des cellules cérébrales (Aleshin S. and Reiser 2013).

Les PPAR ne sont pas les seuls récepteurs nucléaires aux AG présents dans le cerveau, leur action génomique dépend également du RXR, qui est le partenaire commun d'hétérodimérisation avec les récepteurs de la vitamine A.

V.2.5 - Les RXR

Le RXR (Retinoid X receptor) est un récepteur clef de la superfamille des récepteurs nucléaires. En effet, c'est le partenaire commun d'hétérodimérisation de nombreux récepteurs de cette famille (*Cf figure 14*), dont le PPAR (Ziouzenkova and Plutzky 2008). Comme pour PPAR, il en existe trois isotypes, nommés α , β et γ . Initialement, il a été montré *in vitro* qu'il pouvait lier l'acide 9-*cis* rétinoïque, un des métabolites actifs de la vitamine A (Heyman et al. 1992, Levin et al. 1992). Il a par ailleurs été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* que certains acides gras pouvaient être des ligands directs du RXR. Parmi ces ligands figurent, le DHA, l'ARA, l'acide oléique, le LA, l'ALA, le DPA n-6 et l'acide docosatétraénoïque (22:4 n-6) (Calderon and Kim 2007, de Urquiza et al. 2000, Lengqvist et al. 2004). Parmi ces AG, les AGPI-LC tels que le DHA, l'ARA ou le DPA n-6 ont une meilleure affinité avec les RXR, capables de l'activer à de plus faibles concentrations (de Urquiza et al. 2000, Lengqvist et al. 2004). Ainsi, des études récentes ont montré l'implication de l'isotype RXR γ dans la modulation de la mémoire de travail et du comportement de résignation induite par l'administration de DHA (Wietrzych-Schindler Marta et al. 2011b).

Le fonctionnement de ce récepteur sera décrit plus en détail dans la partie V.3.

V.3 – Les récepteurs nucléaires des rétinoïdes

V.3.1 - Les RAR et les RXR

Il existe deux types de récepteurs de l'AR (Bastien and Rochette-Egly 2004). Le premier type correspond aux RAR (retinoic acid receptor), pouvant lier l'acide tout-*trans* rétinoïque et l'acide 9-*cis* rétinoïque. Le deuxième type de récepteur correspond aux RXR (retinoid X receptor) découverts par (Mangelsdorf et al. 1990), pouvant également lier l'AR tout-*trans* et l'AR 9-*cis*, avec une plus forte affinité pour l'AR 9-*cis* que pour l'AR tout-*trans* (Chambon 1996, Levin et al. 1992). La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50 kDa, et comme la plupart des récepteurs aux hormones, ils sont structurés en 6 régions (*Cf figure 15*). Chacun de ces récepteurs comprend trois isotypes nommés RAR α (ou NR1B1),

RAR β (ou NR1B2), RAR γ (ou NR1B3) et RXR α (ou NR2B1), RXR β (ou NR2B2), RXR γ (ou NR2B3), issus de la transcription de trois gènes distincts (Duong and Rochette-Egly 2011). Les séquences d'acides aminés des domaines B, C, D et E de ces trois formes, possèdent de fortes homologues alors que les domaines A et F diffèrent selon la forme. Le domaine C de liaison à l'ADN est en revanche très conservé entre les différentes classes de RAR et de RXR. L'activité transcriptionnelle de ces deux récepteurs dépend de leur association en homodimères RXR/RXR ou en hétérodimères RAR/RXR et de la fixation de ces derniers à des éléments de réponses (RARE ou RXRE), localisés dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. RARE est un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la séquence hexanucléotidique (AGGTCA) séparée par 5 nucléotides (DR5) ou dans certains cas seulement 1 ou 2 (DR1 ou DR2). RXRE est quant à lui, un élément de réponse de type DR1.

Il est important de signaler à ce niveau que le RXR est donc le partenaire commun d'hétérodimérisation de RAR mais également de PPAR (Cf V.2), impliquant une interaction voire une compétition entre les voies de signalisation des rétinoïdes et des AG, Ces interactions seront détaillées dans la partie VI.

V.3.2 – Régulation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR

Il a été mis en évidence que les gènes codant pour certaines isoformes des RAR telles que RAR α 2, RAR β 2 et RAR γ 2 possèdent un élément de réponse à l'AR dans leurs séquences promotrices. Ainsi, l'expression génomique des ces récepteurs nucléaires de l'AR est finement autorégulée dans les tissus par la concentration en AR (Balmer and Blomhoff 2002). Les mécanismes de la régulation des RXR sont moins bien connus. Des études ont cependant montré une régulation des RXR par l'AR ou son isomère l'acide 9-*cis* rétinoïque dans certains modèles cellulaires (Wan et al. 1994, Duprez et al. 1996). En ce qui concerne les isotypes de RAR, ce mode de régulation a également été mis en évidence sur des modèles animaux de carence en vitamine A pour le RAR β . Ainsi, il a été montré que des rats carencés en vitamine A présentaient une diminution de l'expression des ARNm de RAR β , restaurée par l'administration d'AR ; l'expression des deux autres isotypes ne variant pas (Kato S. et al. 1992). Par ailleurs, une étude récente a montré une régulation plus complexe de l'expression protéique de ces récepteurs dans différents tissus cérébraux de rats carencés en vitamine A. Ainsi, il semble que l'expression de RAR α et RAR β soit inhibée dans l'hippocampe en situation de carence en vitamine A alors que celle de RAR α est augmentée

dans le striatum. Concernant l'expression des RXR, celle de RXR γ est inhibée dans l'hippocampe et le striatum alors que celle de RXR β est augmentée. De plus, les auteurs ont mis en évidence des différences entre les patrons d'expression de ces récepteurs liées au sexe des animaux (Arfaoui et al. 2013).

V.3.3 - Distribution tissulaire des récepteurs nucléaires de l'AR

La distribution des différents isotypes des récepteurs nucléaires de l'AR dans les tissus est spécifique (Germain et al. 2006a, b). Ainsi, les transcrits de RAR α sont présents dans l'ensemble des tissus alors que ceux de la forme β sont majoritairement présents dans le cerveau, le foie, les reins et les poumons. Les RAR γ , eux sont restreints à la peau et aux poumons (Dolle et al. 1990). Concernant les RXR, RXR α est majoritairement présent dans le foie et dans des proportions moindres dans les reins, les poumons, la rate et les muscles. RXR β est en revanche exprimé de façon ubiquitaire, même si son expression est plus faible dans le foie, l'intestin et les testicules. Enfin, l'expression de RXR γ est plus spécifique, ce récepteur étant exprimé au niveau des muscles et du cerveau (Germain et al. 2006b, Szanto et al. 2004).

En ce qui concerne la distribution cérébrale de ces récepteurs, l'expression de RAR α est la plus élevée dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex. RAR β est fortement exprimé dans le striatum et le cervelet. RXR γ est quant à lui particulièrement exprimé dans le striatum et le système limbique (Arfaoui et al. 2013, Krezel et al. 1999, Zetterstrom et al. 1999), ces données sont récapitulées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Distribution cérébrale des récepteurs aux rétinoïdes RAR et RXR et de leurs protéines de liaison CRBP et CRABP

Protéine	Localisation dans le cerveau adulte
CRBP-I	Hippocampe, gyrus denté, couche cinq des neurones corticaux, paroi des vaisseaux sanguins cérébraux, cellules ependymaires, tanocytes, glie, neurones de la couche glomérulaire du bulbe olfactif, noyaux médian de l'amygdale, et noyaux hypothalamiques (Zetterstrom et al. 1994, 1999)
CRABP-I	Striatum, couche glomérulaire et granulaire interne du bulbe olfactif, nerf olfactif, amas de cellules proches de l'hypothalamus (Zetterstrom et al. 1994, 1999)
RARα	Bulbe olfactif, particulièrement la couche glomérulaire, tenia tecta, indusium griseum, cortex cingulaire, cortex frontal et pariétal, champs hippocampiques CA1, CA2 et CA3, gyrus denté, amygdale basolatérale et noyau latéral de l'amygdale, thalamus, lobules cerebelleux pons, hypophyse, plexus choroïde, lames IV-X de la moelle épinière, noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, noyau caudé/putamen, corpus callosum, septum (Krezel et al. 1999, Maden. 2012, Ransom et al. 2013, Arfaoui et al. 2013)
RARβ	Noyau caudé/putamen et noyau accumbens, champs hippocampiques CA1 et CA3, gyrus denté, noyaux arché et dorso-médian de l'hypothalamus, tractus solitaire, aire postrema et rostroventrolatérale du noyau réticulé de la medulla, hypophyse, cortex pariétal, bulbe olfactif, corpus callosum, septum (Krezel et al., 1999, Arfaoui et al., 2013)
RARγ	Faibles niveaux détectés mais présent dans la plupart des régions d'encéphale et rhombencéphalique, plus particulièrement dans l'hippocampe (Krezel et al. 1999)
RXRα	Faibles niveaux détectés, présent notamment dans l'hippocampe (Krezel et al. 1999, Maden et al. 2012)
RXRβ	Distribution ubiquitaire mais très faible niveau d'expression détecté, présent notamment dans le bulbe olfactif l'hippocampe, l'amygdale et le cervelet (Krezel et al. 1999, Maden et al. 2012, Arfaoui et al. 2013)
RXRγ	Hippocampe, noyau caudé/ putamen et noyau accumbens, hypothalamus, hypophyse, cortex limbique (Krezel et al. 1999, Maden et al. 2012, Arfaoui et al. 2013)

Adapté de Lane and Bailey 2005

V.3.4 - Gènes cibles de l'acide rétinoïque dans le cerveau mature

Un certain nombre de gènes pouvant être régulés par l'AR ont été recensés à partir de modèles de cellules pluripotentes, dont la différenciation en neurones peut être induite par l'administration d'AR (*tableau 11*). Ainsi, des gènes codant pour les récepteurs au glutamate tels que les récepteurs NMDA, impliqués dans la mise en place de la PLT, ou d'autres neurotransmetteurs tels que les récepteurs à la dopamine ou la sérotonine ont été identifiés comme cibles de l'AR. D'autres gènes impliqués dans la signalisation cellulaire, codant pour des canaux ioniques ou des récepteurs couplés aux protéines G sont également régulés par l'AR.

Par ailleurs, d'autres gènes pouvant être régulés par l'AR ont été identifiés dans le cerveau mature, tels que RC3 ou GAP-43, impliqués dans la modulation de la plasticité synaptique, démontrant ainsi le rôle essentiel de ce nutriment dans le fonctionnement cérébral (*tableau 11*).

Tableau 11 : Liste de gènes cibles de l'acide rétinoïque

Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay	References
Transporters				
Norepinephrine transporter	↑	PC12, SCG	mRNA, function	Matsuoka et al. (1997)
Vesicular ACh transporter	↑	PC12, SN56, NG108	mRNA	Berse and Blusztajn (1995, 1997) and Dolezal et al. (2001)
Vesicular GABA transporter	↑	P19	mRNA	Ebihara et al. (2003)
Metabolic enzymes				
Choline acetyltransferase ^P	↑	PC12, SN56 NG108-15, SCG	mRNA, protein, activity	Berse and Blusztajn (1995), Berse and Blusztajn (1997) and Personett et al. (2000) Dolezal et al. (2001), Kobayashi et al. (1994) and Pedersen et al. (1995)
Tyrosine hydroxylase	↓	SCG	mRNA, activity	Kobayashi et al. (1994), Berrard et al. (1993) and Cervini et al. (1994)
Dopamine β-hydroxylase	↓	SCG	Activity	Berrard et al. (1993) and Cervini et al. (1994)
Glutamic acid decarboxylase	↑	P19, NE-7C2	mRNA	Bain et al. (1993) and Varju et al. (2002)
ACh esterase	↑	P19	mRNA	Coleman and Taylor (1996)
G-protein coupled receptors				
Mu opioid receptor	↓/↑	SH-SY5Y	mRNA	Jenab and Inturrisi (2002)
Delta opioid receptor	↑	NG108-15	mRNA	Beczowska et al. (1996)
Kappa opioid receptor	↓	P19	mRNA	Bi et al. (2001) and Hu et al. (2002)
5-HT _{1A} receptor	↑	SN-48	mRNA	Charest et al. (1993)
Dopamine D2 receptor ^V	↑	Striatum	mRNA, protein	Samad et al. (1997) and Valdenaire et al. (1998)
Dopamine D2, D1, D5 receptors	↑	NT2	mRNA, function	Sodja et al. (2002)
Ionotropic receptors				
Nicotinic AChR α3,α4,β2	↑	P19	mRNA, protein	Cauley et al. (1996)
NMDA receptor (NR1)	↑	NG108-15	mRNA	Beczowska et al. (1996)
Kainate receptor (GluR6)	↑	P19	mRNA	Bain et al. (1996)
GABA _A receptor γ2	↑	P19	mRNA, function	Reynolds et al. (1996)
Ion transport proteins				
K ⁺ channel (Kir 2.1)	↑	SH-SY5Y, SK-N-BE	mRNA, function	Smith-Maxwell et al. (1991), Arcangeli et al. (1998) and Tonini et al. (1999)
Na ⁺ /H ⁺ exchanger	↑	P19	mRNA, activity	Dyck and Fliegel (1995)
L-type Ca ²⁺ channel	↑	NG108-15, NT2	mRNA, function	Kamp et al. (1995) and Gao et al. (1998)
N-type Ca ²⁺ channel	↑	NT2	mRNA, function	Gao et al. (1998)
Cytoskeletal proteins				
Neurofilament (-L,-M,-H) proteins	↑	P19	mRNA, protein	Chiu et al. (1995) and Paterno et al. (1997)
Dystrophin-associated proteins	↑	P19	mRNA	Ceccarini et al. (2002)
Tenascin	↑	SH-SY5Y	Protein	Linnala et al. (1997)
Integrin α/β	↑	SH-SY5Y	Protein	Linnala et al. (1997)
Intracellular signalling molecules				
Phospholipase A2, C, D	↑	LA-N-1	Activity	Farooqui et al. (2004)
Arachidonic acid	↑	SK-N-BE	Activity	Petroni et al. (1996a, 1996b)
Neuronal nitric oxide synthase	↑	SN56	mRNA, protein, activity	Personett et al. (2000)
Tissue transglutaminase	↑	SCG, SK-N-BE, SH-SY5Y	Activity, mRNA	Ando et al. (1996), Melino et al. (1997) and Tucholski and Johnson (2003)
Neuromodulin (GAP 43)	↑	Striatum		Husson et al. (2004)
Neurogranin (RC3) ^V	↑	SK-N-BE, striatum	mRNA	Husson et al. (2004) and Iniguez et al. (1994)

Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay	References
Neuron-specific enolase ^P	↑	N-115, PC12	mRNA	Matranga et al. (1993) and Sakimura et al. (1995)
Calbindin-D 28K	↑	PC12, D283	mRNA, protein	Vyas et al. (1994) and Wang and Christakos (1995)
Synapsins I, II, III	↑	NT2	mRNA	Leypoldt et al. (2002)
Miscellaneous				
Gonadotropin-releasing hormone ^V	↓/↑	GT1-1, hypothalamus	mRNA	Cho et al. (2001a, 2001b, 1998)
Oxytocin ^V	↑	Neuro2A	mRNA	Richard and Zingg (1991)
Trk A/Trk B	↑	NB, P19	mRNA	Lucarelli et al. (1995) and Salvatore et al. (1995)
Nerve growth factor	↑	PC12	mRNA	Scheibe and Wagner (1992)
Neural cell adhesion molecule	↑	P19, LA-N-5	Protein	Husmann et al. (1989) and Cervello et al. (1997)
Presenilin 1	↑	SH-SY5Y	mRNA	Flood et al. (2004)
Presenilin 2	↑	P19	mRNA	Culvenor et al. (2000)
Apolipoprotein E	↓	NT2	mRNA	Harris et al. (2004)
Amyloid protein precursor (APP) ^P	↑	P19, SH-SY5Y, PC12, hippocampus	mRNA, protein	Hung et al. (1992), Fukuchi et al. (1992), König et al. (1990), Lahiri and Nall (1995) and Yang et al. (1998)
Microtubule-associated protein tau (MAPT) ^P	↑	P19	mRNA	Fukuchi et al. (1992) and Hecklen-Klein et al. (2000)

Source : Lane and Bailey 2005

V.4 - Action non génomique des récepteurs nucléaires des acides gras et de l'acide rétinoïque

Outre l'action dite « génomique » des récepteurs nucléaires, du fait de leur capacité à réguler directement la transcription d'un gène en se fixant à un élément de réponse sur l'ADN, plusieurs études ont également rapporté l'existence d'une voie dite « non génomique », induisant une réponse cellulaire rapide ne pouvant être expliquée par l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Canon et al. 2004). Cette action non génomique est impliquée dans la modulation d'autres voies de signalisation telle que celle des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et peut ainsi conduire à l'activation de facteurs de transcriptions tels que CREB (cAMP response element binding protein). CREB est un facteur de transcription permettant l'expression de gènes précoces tels que *c-fos* et dont l'action dans la modulation des processus mnésiques est largement décrite dans la littérature (Carlezon et al. 2005).

La *figure 17* schématise le mécanisme d'action de cette voie non génomique tel qu'il est décrit dans la littérature. Dans la cellule, les ligands des récepteurs nucléaires des acides gras et de l'acide rétinoïque peuvent se fixer à des sous-populations de récepteurs (RAR, RXR ou PPAR) localisés à proximité, voire dans les radeaux lipidiques de la membrane (Al Tanoury et al. 2013, Canon et al. 2004). En effet, bien que les récepteurs nucléaires soient prédominants à l'intérieur du noyau, une localisation cytoplasmique a été mise en évidence, notamment pour les RAR (Sommer et al. 1999). Cette fixation va alors induire la phosphorylation de kinases appartenant à la famille des MAPK telles que ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinases). ERK phosphorylée va ensuite être transloquée au niveau du noyau, et permettre à son tour l'activation de facteurs de transcription tels que CREB. CREB va alors réguler la transcription de gènes possédant un élément de réponse spécifique CRE (CREB response element) situé dans le promoteur (Al Tanoury et al. 2013, Canon et al. 2004). Par ce mécanisme, les récepteurs nucléaires aux acides gras et à l'acide rétinoïque peuvent moduler l'expression de gènes indépendamment de la reconnaissance des éléments de réponses RARE, RXRE ou PPRE, impliquant un champ d'action beaucoup plus large. Ainsi, sur un modèle cellulaire, il a été montré récemment que des faibles doses d'EPA permettaient l'inhibition de la croissance tumorale, ceci étant associé à l'activation de

ERK (Nikolakopoulou et al. 2013). Une autre étude menée sur un modèle cellulaire de neuroblastomes humains, a montré qu'un traitement au DHA induisait l'activation de ERK1/2 et été associé à une augmentation de la neuritogenèse (Wu Haitao et al. 2009), impliquant une possible modulation de la plasticité synaptique dans des conditions physiologiques.

Par ailleurs, bien que la voie des MAPK dite « classique » faisant intervenir ERK soit la plus décrite, d'autres études ont rapporté des effets non génomiques des récepteurs nucléaires des acides gras et de l'acide rétinoïque sur la régulation d'autres kinases situées soit en amont de ERK, soit dans d'autres voies de signalisation. Pour exemple, des auteurs ont montré sur un modèle cellulaire d'hépatocarcinome, que la vitamine A pouvait induire l'activation de la kinase JAK2 (Janus kinase 2) induisant l'activation du facteur de transcription STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) (Berry et al. 2011). En conséquence de la phosphorylation de ERK1/2 induite par une action non génomique des récepteurs nucléaires des acides gras et de l'acide rétinoïque, il a également été rapporté que ERK1/2 pouvaient en retour induire la phosphorylation des récepteurs nucléaires (Zassadowski et al. 2012), impliquant une autre forme d'autorégulation de l'activité des récepteurs nucléaires.

Outre, les interactions nucléaires décrites précédemment, l'ensemble de ces données placent la voie des MAPK au point de convergence des voies de signalisation non génomiques de la vitamine A et des AGPI n-3 et suggèrent des interactions extranucléaires entre ces deux voies de signalisation.

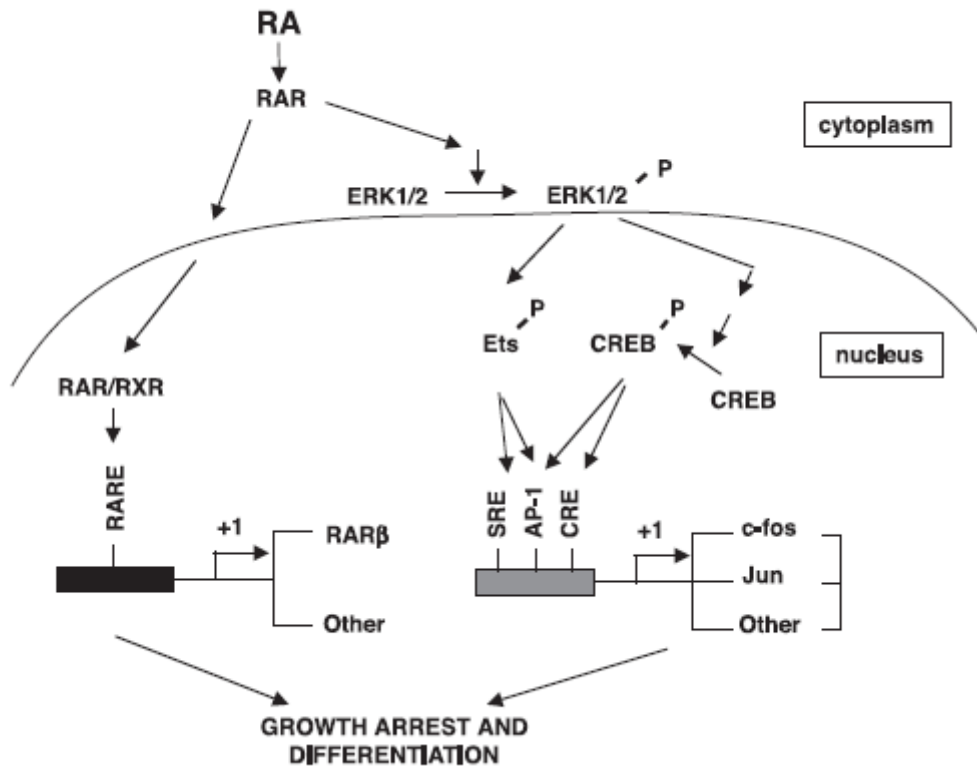


Figure 17 : Mécanisme d'action non génomique des récepteurs nucléaires, exemple du RAR

Source: Canon et al. 2004

AP-1: activator protein 1; Ets : E-twenty six ; CREB: cAMP response element binding protein; CRE: CREB response element; ERK: extracellular signal-regulated kinase; RA: retinoic acid; RAR: retinoic acid receptor; RARE: retinoic acid response element; RXR: retinoid X receptor; SRE: serum response element.

Dans la cellule, l'AR peut moduler directement la transcription de gènes possédant un élément de réponse RARE (voie génomique). L'AR peut également se fixer à une sous population de récepteurs cytoplasmiques et induire des effets non génomiques. La fixation de l'AR sur son récepteur va induire la phosphorylation de ERK1/2, puis de sa translocation au niveau du noyau et activer des facteurs de transcriptions tels que Ets ou CREB, activant la transcription de gènes précoces tels que *c-fos*.

VI - Interactions entre les voies de signalisation des acides gras polyinsaturés n-3 et de l'acide rétinoïque

A ce jour, un certain nombre de données démontrent l'existence de relations étroites entre les lipides et la vitamine A. Ainsi, plusieurs niveaux d'interaction ont été rapportés entre la voie de signalisation des lipides et celle des rétinoïdes.

VI.1 - Interactions métaboliques

Au niveau métabolique, il a en effet été mis en évidence des relations entre le statut lipidique et la teneur en rétinoïdes dans le plasma. Ainsi, il a été décrit chez des enfants hyperlipidémiques, une diminution du ratio β -carotène/lipides totaux dans le plasma associée à une augmentation de la concentration en rétinol plasmatique (Morinobu et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré chez des patients traités par des rétinoïdes, une augmentation du taux de tryglycérides (TG) dans le sang associée à une augmentation des LDL et une diminution des HDL (Staels 2001). De plus, il a également été montré chez la souris que l'administration de différents isomères d'acide linoléique conjugué, permettait d'activer le métabolisme de la vitamine A ; augmentant la rapidité de stockage de la vitamine A dans le foie ainsi que le relargage du rétinol dans le plasma (Giordano et al. 2011).

En plus de ces observations, un certain nombre d'investigations au niveau cellulaire ont montré que la régulation de la voie métabolique des AG est sous l'influence des rétinoïdes. Ainsi, chez des souris recevant une supplémentation nutritionnelle en vitamine A, il a été montré une augmentation de l'expression dans les cellules hépatiques des transcrits de la Δ -9 désaturase permettant la conversion des AGS en AGMI (Miller et al. 1997). D'autre part, dans le foie de rats carencés en vitamine A, il a été montré une augmentation de l'expression de la Δ -5 désaturase, impliquée dans la formation de l'ARA et de l'EPA (Zolfaghari and Ross 2003, Zolfaghari et al. 2001). Enfin, une étude récente a montré que l'administration d'un ligand de RXR dans l'eau de boisson de souris adultes durant 1 semaine

induisait une augmentation de l'expression des transcrits ainsi que les activités des enzymes Δ -9 désaturase et élongase 6, impliquées dans la synthèse des AGMI (Weiss et al. 2011).

Par ailleurs, les études de biologie cellulaire ont rapporté la capacité des acides gras tels que le LA ou l'ARA à inhiber la liaison de l'AR à la CRABP, induisant une possible diminution de la biodisponibilité de ce dernier dans la cellule (Sani et al. 1987). De plus, il a été montré que les FABP, qui appartiennent à la même famille de transporteurs que les CRABP, sont des protéines de liaison permettant le transport de molécules lipophiles telles que l'AR. Ainsi, il a été montré que dans la cellule l'AR peut être soit lié à une CRABP, soit à une FABP, induisant un adressage différentiel aux récepteurs nucléaires (respectivement, RAR ou PPAR), la régulation de leurs gènes cibles respectifs impliquant une action génomique différente (Schug et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré dans un modèle cellulaire de neuroblastome de souris que l'activité de la phospholipase A2 cytosolique, permettant la mobilisation intracellulaire de l'ARA, est régulée par l'acide rétinoïque (Farooqui et al. 2004b, Labrousse et al. 2012).

VI.2 - Interactions nucléaires

Plus récemment, le développement des approches moléculaires et l'étude du fonctionnement des récepteurs nucléaires au niveau cellulaire a permis de mettre en évidence un certain nombre d'interférences entre la voie de signalisation des AGPI et celle des rétinoïdes, notamment *via* leur action commune sur les récepteurs nucléaires.

En effet, le premier niveau d'interaction de ces deux voies se traduit par l'obligation d'hétérodimérisation commune des RAR et des PPAR avec le RXR (*Cf partie V*). Un second niveau d'interaction existe entre les récepteurs nucléaires des acides gras et des rétinoïdes et leurs ligands. En effet, il a été mis en évidence *in vitro* que le DHA pouvait se lier directement aux RXR et l'AR aux PPAR. Ces différents niveaux d'interactions suggèrent une complémentarité, voire une synergie d'action entre ces deux voies (*figure 18*).

En effet, il apparaît que le RXR, bien qu'ayant été initialement identifié comme le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque, est également capable de lier les AGPI-LC tels que l'ARA et le DHA comme nous l'avons évoqué dans la partie V.2.4. Par ailleurs, précisons que l'AR, en tant que molécule liposoluble fait partie des ligands naturels de PPAR δ (Schug et al. 2007, Shaw et al. 2003). De plus il a été montré chez le rat soumis à un régime hyperlipidique, que la baisse

d'expression des ARNm de PPAR δ , était associée à une hypo-expression des récepteurs nucléaires à l'AR : RAR β et RXR β/γ et accompagnée d'une baisse d'expression des gènes cibles GAP-43 et de RC3 au niveau du striatum (Buaud et al. 2010).

D'autres auteurs ont également montré une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR α et PPAR δ dans le tissu cardiaque de rats déficients en vitamine A. Cette surexpression pouvait être diminuée par l'administration d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A (Vega et al. 2009). Enfin, d'autres auteurs ont montré que l'AR pouvait induire l'expression de PPAR γ , *via* des effets non génomiques induisant l'activation de la voie JAK2 - STAT5 dans un modèle cellulaire d'hépatocarcinome (Berry et al. 2011).

L'ensemble de ces données montre ainsi que la voie de signalisation des AGPI n-3 et celle des rétinoïdes sont étroitement liées, tant au niveau métabolique qu'au niveau de leur mode d'action cellulaire. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'action conjointe des AGPI n-3 et de la vitamine A dans la régulation des processus mnésiques au cours du vieillissement, ce qui fera l'objet de la prochaine partie de cette introduction (*Cf VII*).

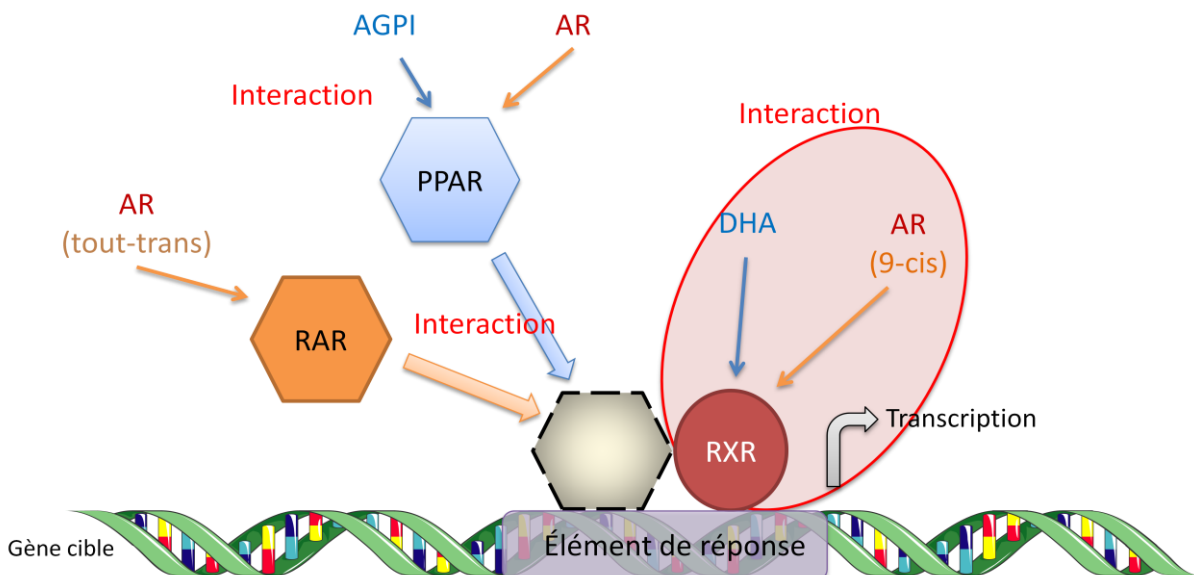


Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes interactions nucléaires entre la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des AGPI n-3

AR : acide rétinoïque; AGPI : acide gras polyinsaturé; DHA : acide docosahexaénoïque; PPAR : peroxydase proliférante activée par le récepteur; RAR : récepteur à l'acide rétinoïque; RXR : récepteur X à l'acide rétinoïque

VII - Le vieillissement cérébral

Il est aujourd'hui bien admis que le niveau des dépenses de santé dans les années à venir sera très largement déterminé par les conséquences du vieillissement cérébral. Selon l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), si les tendances actuelles du vieillissement démographique persistent, près d'un Français sur trois aura plus de 60 ans en 2050, contre cinq en 2005. Ainsi, l'étude PAQUID (QUID des Personnes âgées) estime que 17% des personnes âgées de plus de 75 ans et plus sont atteintes de démence, ce qui représenterait environ 870 000 cas actuellement en France avec une incidence de 220 000 nouveaux cas par ans (rapport de l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé, 2005). Dans ce contexte, la prise en charge de ces personnes devient une question de santé publique prioritaire car cette démence sénile entraîne progressivement une dépendance croissante. Ceci implique le développement de stratégies préventives afin de retarder les effets délétères du vieillissement, parmi lesquels l'alimentation fait partie des pistes de recherche actuelles.

VII.1 - Données générales sur le vieillissement cérébral

Définition :

Le vieillissement, ou sénescence est un processus normal et inéluctable touchant tous les êtres vivants une fois atteinte la maturité. Il est défini comme « la somme des modifications (altérations) anatomiques, histologiques et physiologiques, survenues au cours du temps, au sein de différents types cellulaires, dans différents organes et systèmes » (Forette 1996). Ce processus complexe se caractérise par l'altération du renouvellement cellulaire de tous les tissus y compris le cerveau, provoquant par la suite l'affaiblissement progressif des capacités physiques et psychiques de l'individu. Il est la résultante d'un processus multifactoriel comprenant des facteurs génétiques (vieillesse intrinsèque) et de nombreux facteurs environnementaux tels que l'alimentation, auxquels l'individu est soumis tout au long de sa vie.

Le vieillissement cognitif est un processus hétérogène entre les individus, conduisant à une altération hétérogène des fonctions cognitives entre les individus, pouvant conduire dans des cas extrêmes à des démences de type maladie d'Alzheimer. Dans l'optique de l'élaboration de stratégies de prévention par voie nutritionnelle, nous nous sommes focalisés au cours de ce travail de thèse essentiellement sur l'étude du vieillissement dit « normal » ou « non pathologique », le vieillissement « pathologique » incluant les démences, ne sera donc abordé que brièvement dans cette partie.

Chez les personnes âgées, les altérations neurobiologiques ont depuis longtemps été considérées comme un élément majeur du vieillissement. Le cerveau occupe donc une place essentielle dans les recherches actuelles sur le vieillissement et l'identification des altérations neurobiologiques responsables des dysfonctionnements mnésiques, constitue l'un des objectifs majeur de ces recherches. Le vieillissement cérébral peut être étudié à différents niveaux d'organisation. A un niveau systémique, le vieillissement se manifeste en particulier par une diminution des facultés d'adaptation et plus particulièrement une baisse des capacités mnésiques (Erickson and Barnes 2003), objet de ce travail. Précisons que les études menées au cours de ce travail ont porté sur plusieurs types de mémoire, comprenant la mémoire à long terme telle que la mémoire spatiale de référence, la mémoire de type contextuelle et la mémoire à court terme telle que la mémoire spatiale de travail, toutes trois altérées au cours du vieillissement normal.

VII.2 – Processus mnésiques et altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement

VII.2.1 - Implication de l'hippocampe et du cortex préfrontal dans les processus mnésiques

Tout d'abord, il paraît nécessaire de donner une définition du terme de « mémoire ». En neurosciences et en psychologie, elle est définie comme étant l'ensemble des processus neurologiques permettant d'acquérir, de stocker et de rappeler des expériences passées et des informations (Jaffard, 1994). La mémoire est classiquement organisée en phases

séquentielles, qui désignent un ensemble de processus nécessaires à l'acquisition de nouveaux souvenirs. Brièvement, ces phases comprennent :

- L'apprentissage (ou encodage), permettant l'acquisition des informations
- La consolidation mnésique, permettant le stockage de ces informations au cours du temps. Cette phase entraîne le passage d'une forme dite « labile » de la mémoire à une forme « stable ». Cela correspond à l'ensemble des modifications neuronales induites par l'apprentissage (Nakazawa et al. 2004).
- Le rappel mnésique, correspondant à la « récupération » du souvenir ou l'information passe de l'état inactif à l'état actif

Bien que ces trois phases soient communément admises dans leurs principes, les processus, les structures ainsi que les mécanismes permettant l'organisation de la mémoire sont encore largement débattus au sein de la communauté scientifique. Il est néanmoins reconnu que la mémoire n'est pas unitaire mais correspond à un ensemble de systèmes de mémoire permettant chacun le traitement d'un type particulier d'information. Ainsi, des études lésionnelles chez l'animal et plus récemment d'imagerie chez l'Homme ont permis l'élaboration de classifications des systèmes de mémoire selon plusieurs modèles Tulving (1995) et Squire (2004).

Ces différentes classifications ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel du lobe temporal médian et plus précisément de l'hippocampe dans la mémoire à long terme, ainsi que du cortex préfrontal dans la mémoire de travail (Henke 2010) (*figure 19*). Cependant, de nombreuses relations structurelles et fonctionnelles ont été décrites entre ces deux structures (Laroche et al. 2000), démontrant le rôle primordial de l'intégrité de l'hippocampe et plus précisément de la voie hippocampo-préfrontale dans la mémoire de travail (Izaki et al. 2008, Newman and Grace 1999).

VII.2.2 - Altérations de la mémoire au cours du vieillissement :

Au cours du vieillissement, on observe une altération précoce de la mémoire de travail, rapidement suivie par une altération des fonctions exécutives et de la mémoire épisodique, alors qu'à l'inverse, les connaissances (mémoire sémantique) semblent préservées (*Figure 20*).

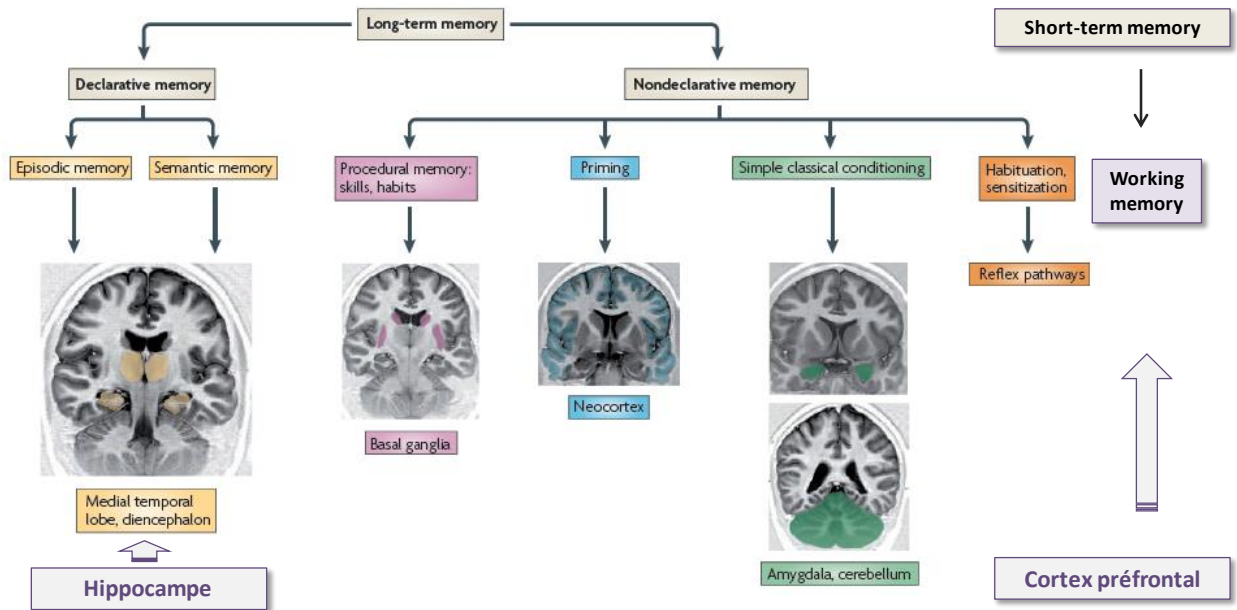


Figure 19 : Classification des systèmes de mémoire

Adapté de Henke 2010

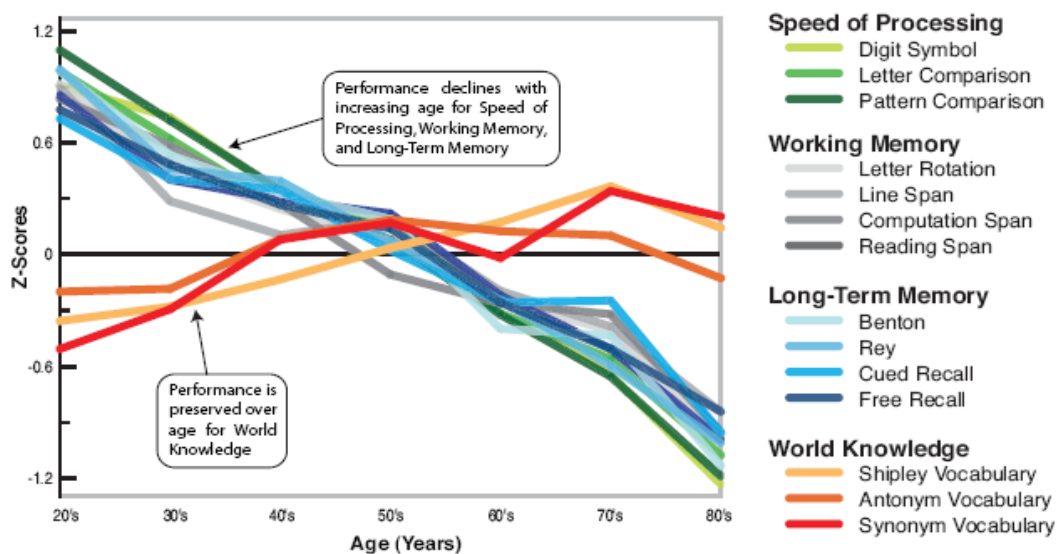


Figure 20 : Illustration du déclin cognitif lors du vieillissement normal chez l'Homme

Source: Park and Reuter-Lorenz 2009

La vitesse de traitement de l'information (« speed processing »), la mémoire de travail (« working memory ») et la mémoire à long terme (« long term memory ») déclinent avec l'âge, alors qu'à l'inverse la mémoire des connaissances de type sémantique (« word knowledge ») est préservée.

En effet, chez l'animal âgé, les principaux déficits mesurés portent sur des formes de mémoire dites « hippocampo-dépendantes », principalement la mémoire spatiale. Des données expérimentales montrent que les déficits mnésiques liés au vieillissement, sont similaires à ceux induits par des lésions hippocampiques, notamment des déficits d'apprentissage spatial (Murray et al. 1998, Stoelzel et al. 2002). Chez le rat, de nombreuses études ont mis en évidence des déficits liés à l'âge dans différentes tâches permettant d'évaluer la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes 2003), en particulier des tâches réalisées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Drapeau et al. 2003, Wang Y. et al. 2006). D'autres études menées chez la souris ont également mis en évidence des déficits de la mémoire de travail. Pour exemple, dans une tâche d'alternance spontanée, relevant de l'intégrité de la mémoire spatiale de travail, des souris âgées de 18-19 mois présentaient de moins bonnes performances que leurs congénères jeunes âgées de 4-5 mois (Vandesquille et al. 2011). Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence chez la souris dès 14 mois, des déficits de mémoire contextuelle dans une tâche de discrimination sérielle et contextuelle, par comparaison à des souris âgées de 5 mois (Beracochea et al. 2007, Tronche et al. 2010). Enfin, des études complémentaires montrent que les animaux âgés présentent de manière spécifique des déficits de mémoire relationnelle, équivalente à la mémoire déclarative chez l'Homme (Etchamendy et al. 2001, Magnusson et al. 2003, Touzani et al. 2003).

VII.2.3 - Altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement

VII.2.3.1 - Altérations morphologiques

D'un point de vue anatomique, on peut observer une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire ; ces modifications étant souvent hétérogènes entre les individus (Sullivan et al. 2001). Les altérations cérébrales majeures sont en partie dues à des changements morphologiques au niveau des neurones, tels qu'une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, une diminution de la longueur et du nombre d'épines dendritiques, une baisse de l'expression des récepteurs au glutamate NMDA et AMPA, intervenant dans la mise en place de la PLT (Dickstein et al. 2007). Ces modifications morphologiques se traduisent par des altérations de la plasticité cérébrale et s'accompagnent d'une perte des fonctions cognitives.

VII.2.3.2 - Altérations de la plasticité cérébrale

Neurogenèse :

Le cerveau des mammifères, dont l'Homme, continue de produire de nouveaux neurones à l'âge adulte (Eriksson et al. 1998). Cette neurogenèse repose sur l'existence de progéniteurs neuronaux situés dans des régions restreintes du cerveau, incluant la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Kempermann et al. 2004). Ainsi, de nouveaux neurones sont continuellement intégrés dans les circuits neuronaux hippocampiques où ils participeraient à l'encodage de nouvelles informations mnésiques (Tashiro et al. 2007). En effet, de nombreuses études indiquent l'existence d'un lien fonctionnel entre certains apprentissages dépendant de l'hippocampe et la neurogenèse hippocampique adulte (Trouche et al. 2009, Winocur et al. 2006). Cependant, la production de nouveaux neurones diminue fortement avec l'âge et pourrait participer au déclin mnésique qui accompagne le vieillissement normal, chez l'animal comme chez l'Homme (Drapeau et al. 2003).

Plasticité synaptique :

Les études menées chez l'Homme comme chez l'animal suggèrent que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une altération de la plasticité synaptique principalement dans le cortex préfrontal et la région hippocampique (Morrison and Baxter 2012). En effet, il a été montré que les changements structuraux intervenants au cours du vieillissement, et plus particulièrement la perte des épines dendritiques et la diminution du nombre de synapses, contribuent à l'apparition des déficits de PLT (Burke and Barnes 2006); ceux-ci étant corrélés avec des déficits mnésiques observés dans des tâches évaluant la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes 2003). Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté une forte perturbation de l'homéostasie calcique chez le sujet âgé (Foster 1999, Foster and Norris 1997). Ainsi, une augmentation de la conductance calcique a été mise en évidence dans les neurones du cerveau âgé (Campbell et al. 1996). Les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe de rats âgés présentent une augmentation de la densité des canaux calciques (Thibault and Landfield 1996) qui pourrait conduire à la perturbation de l'homéostasie calcique (Toescu et al. 2004) et contribuer à la mise en place des déficits de plasticité qui interviennent au cours du vieillissement (Rosenzweig and Barnes 2003).

Parmi les facteurs situés en aval du signal calcique, d'autres voies de signalisation telle que celle des MAP kinases sont également affectées par le vieillissement. A ce niveau, il est important de préciser que l'acquisition d'un fait nouveau engendre une cascade d'évènements moléculaires aboutissant à la synthèse de nouvelles protéines qui permettront alors des modifications cellulaires durables, s'inscrivant dans les processus de plasticité synaptique des réseaux neuronaux activés (Wang Y. et al. 2006). L'une des voies de signalisation les plus impliquées dans ces mécanismes de plasticité, est la voie des MAP kinases ERK et du facteur de transcription CREB. C'est en effet une voie ubiquitaire très conservée au cours de l'évolution et qui constitue un point de convergence de nombreuses autres voies pour le déclenchement de processus à long terme (Weeber and Sweatt 2002). L'activation de cette voie joue donc un rôle crucial dans la formation de la mémoire à long terme, notamment en initiant la transcription de gènes précoces tels que *c-fos* (Carlezon et al. 2005). Cependant, de nombreuses études ont montré que le vieillissement est accompagné d'une altération de cette voie. En effet, Simonyi et al. (2003) ont démontré une réduction de 20% de l'expression des transcrits de ERK1 dans la région CA3 hippocampique chez des rats âgés de 13 mois par comparaison à des rats âgés de 3 mois. D'autres études ont montré une réduction de l'activation de CREB dans l'hippocampe de souris âgées de 23 - 24 mois comparées à des souris adultes de 5-6 mois, corrélée avec de faibles performances de mémoire spatiale, mesurées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Porte et al. 2008).

Par ailleurs, certaines protéines synaptiques qui jouent un rôle majeur dans les processus d'apprentissage, ont particulièrement été étudiées chez l'animal âgé, telles que les récepteurs NMDA (Magnusson et al. 2007, Topic et al. 2007), la synaptophysine, la synaptotagmine, la neurogranine (RC3) ou encore la neuromoduline (GAP-43). Ainsi, plusieurs études ont rapporté une diminution de l'expression de RC3 et GAP-43 au cours du vieillissement (Boucheron et al. 2006, Casoli et al. 2001, Etchamendy et al. 2001, Feart et al. 2005a). En outre, il a été montré que la diminution d'expression de RC3, associée à des déficits de PLT et de mémoire spatiale observés au cours du vieillissement, était sous le contrôle des rétinoïdes (Etchamendy et al. 2001).

VII.3 - Rôle des AGPI n-3 au cours du vieillissement

VII.3.1 - Conséquences du vieillissement sur le contenu cérébral en AGPI n-3

Au cours du vieillissement plusieurs études ont montré des perturbations dans l'absorption intestinale des acides gras essentiels (Drozdowski and Thomson 2006, Hollander et al. 1984) suggérant des modifications de la biodisponibilité des AGPI n-3 pour les tissus cibles tels que le cerveau. En outre, une étude menée chez le rat a montré une diminution du contenu plasmatique en DHA non estérifié au cours du vieillissement (Gao et al. 2013). D'autre part, bien que les mécanismes d'entrée des AGPI n-3 restent discutés, plusieurs études ont montré des changements structuraux et fonctionnels de la barrière hémato-encéphalique (BHE) induisant des modifications de sa perméabilité au cours du vieillissement (Shah and Mooradian 1997). En effet, des études ont rapporté qu'au cours du vieillissement se produisaient une rigidification membranaire de la BHE associée à des modifications de la perméabilité et suggérant une perturbation de la biodisponibilité des AGPI n-3 pour le cerveau (Kuo et al. 2010, Yehuda et al. 2005).

Par ailleurs, il apparaît que les voies de synthèse des phospholipides sont altérées avec l'âge, freinant ainsi l'incorporation des AGPI-LC au sein des membranes cérébrales (Ilincheta de Boschero et al. 2000). De plus, plusieurs études ont montré que la conversion des précurseurs LA et ALA en dérivés à longue chaîne devient moins efficace avec l'âge, l'activité des désaturases étant diminuée dans le foie et le cerveau (Bourre and Piciotti 1992, Kumar et al. 1999). Ainsi, la baisse de l'activité de ces enzymes induit d'une part une diminution de la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 provenant du foie et d'autre part une diminution de la synthèse in situ, supposant un apport alimentaire suffisant pour maintenir le niveau des AGPI n-3 dans le cerveau âgé.

Considérant ces changements métaboliques, un certain nombre de données a en effet mis en évidence des modifications de la composition en lipides et notamment en AG contenus dans les phospholipides des membranes cérébrales au cours du vieillissement. Ainsi, plusieurs études menées sur le rongeur ont montré que le contenu en DHA dans le cerveau entier était diminué (Arranz et al. 2013, Labrousse et al. 2012) ou seulement dans certaines régions cérébrales telles que l'hippocampe (Favreliere et al. 2003), le cortex (Little

et al. 2007) ou l'hypothalamus (Yetimler et al. 2012). Par ailleurs, il a été montré que cette baisse du contenu en DHA n'était pas hétérogène dans le cerveau et dépendait de la structure cérébrale ainsi que de la classe de phospholipides.

Ainsi, chez l'Homme, il a été montré une baisse du contenu en phospholipides totaux de près de 20% au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe due à une diminution des teneurs en PE et PC, qui sont les phospholipides majoritaires au sein des membranes cérébrales (Guan et al. 1999). Ces données concordent avec la baisse progressive des contenus hippocampiques et corticaux de la PE et de la PS observée chez des rats âgés de 18 à 32 mois, par comparaison avec des rats de 2 à 3 mois (Babenko and Semenova 2010, Dyall S.C. et al. 2007, Favreliere et al. 2003, Favrelière et al. 2000). De ce fait, d'autres études ont montré une réduction du contenu en DHA dans la PE, la PS et la PC au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet associée à une augmentation des contenus en AGMI (Barcelo-Coblijn G. et al. 2003, Dyall S.C. et al. 2007, Favrelière et al. 2000, Latour et al. 2013, Little et al. 2007, Lopez et al. 1995).

Chez l'Homme, bien que certaines données n'ont pas montré de modifications du contenu en AG dans les membranes cérébrales chez le sujet âgé (Carver et al. 2001, Soderberg et al. 1991), d'autres ont mis en évidence une baisse du contenu en DHA au sein de la PE de structures spécifiques comme l'hippocampe et le cortex orbito-frontal chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (Cunnane et al. 2009).

VII.3.2 - Rôle des AGPI-LC n-3 dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement

De nombreuses études menées chez l'Homme comme chez l'animal ont suggéré que la baisse du contenu en AGPI n-3 et plus particulièrement en DHA dans les membranes cérébrales, été associée à la mise en place de déficits cognitifs et mnésiques au cours du vieillissement (Denis et al. 2013, Su 2010).

En effet chez l'Homme, de nombreuses études ont démontré l'existence d'une relation entre le statut alimentaire en AGPI n-3 et les performances cognitives. Ainsi, chez des sujets âgés de plus de 65 ans, des données épidémiologiques issues de l'étude des 3 cités suggèrent un lien entre la consommation d'un régime dit « méditerranéen » contenant un faible ratio LA/ALA, et un plus faible risque de développer une démence (Feart et al.

2013, Feart et al. 2009). De plus, plusieurs données suggèrent un rôle des AGPI n-3 dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Cunnane et al. 2009, Jicha and Markesbery 2010).

Chez l'animal, les données sont beaucoup plus nombreuses et dans l'ensemble, mettent en évidence un effet bénéfique d'une supplémentation en huile de poisson naturellement riche en EPA et en DHA sous forme de triglycérides. Ainsi, il a été montré récemment qu'une supplémentation nutritionnelle en huile de poisson (10% EPA et 7% DHA) durant deux mois permettait de réduire les déficits de mémoire de travail évaluée dans un labyrinthe en Y chez des souris âgées de 20 mois (par comparaison à des souris non supplémentées du même âge) (Labrousse et al. 2012). De plus une étude menée au laboratoire a montré un effet préventif d'une supplémentation en EPA et DHA données sous forme d'huile de poisson chez des rats à mi-vie. Ces résultats ont en effet montré qu'une supplémentation nutritionnelle en EPA et DHA (18% EPA et 12% DHA) donnée à des rats de 13 mois durant 5 mois permettait d'améliorer les performances de mémoire de travail (par comparaison à des rats non supplémentés du même âge), évaluée dans un paradigme de « delayed-matching-to-place » dans le labyrinthe aquatique de Morris (Alfos et al. en préparation).

D'autres études se sont intéressées à l'effet du DHA, de l'EPA ou du DPA n-3 donnés séparément. Ainsi, chez des rats âgés de 25 mois ne consommant pas d'AGPI-LC n-3, Gamoh et al. (2001) ont montré que l'administration d'une dose de DHA par gavage (300 mg/kg/jour) sous forme d'ester éthylique durant 10 semaines permettait d'améliorer les performances de mémoire spatiale de travail et de références évaluées dans un labyrinthe radial. Cette dernière étude a également montré que l'amélioration de ces performances était associée à une augmentation des contenus corticaux en DHA. De plus, il a été montré que des souris âgées de 14 mois (*versus* des souris de 3 mois) ayant reçu différentes doses de DHA durant 5 mois présentaient de meilleures performances dans la capacité à sortir d'un labyrinthe que les souris non supplémentées (Lim S.-Y. and Suzuki 2000). Enfin, Kelly et al. (2011) ont récemment testé l'effet de suppléments en EPA et en DPA n-3, montrant que des rats âgés de 20 à 22 mois supplémentés en EPA ou DPA n-3 durant 56 jours (200 mg/kg/jour) présentaient de meilleures performances de mémoire spatiale de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris que leurs congénères contrôles.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant les effets bénéfiques des AGPI-LC n-3 sur la mémoire au cours du vieillissement ont également fait l'objet de nombreuses investigations. Ainsi, dans l'étude de Kelly et al. (2011), les effets bénéfiques d'une supplémentation en EPA ou en DPA n-3 sur les performances mnésiques étaient associés à une augmentation de la PLT dans l'hippocampe. D'autres auteurs ont également mis en évidence qu'une supplémentation en EPA et DHA (110 et 160 mg/kg/jour) durant 12 semaines permet de réverser la baisse d'expression des sous-unités GLUR2 et NR2B (appartenant respectivement aux récepteurs AMPA et NMDA), dans le cortex, le striatum et l'hippocampe de rats âgés de 24 mois, comparés à des rats adultes âgés de 3 à 4 mois (Dyall et al. 2007). L'hypothèse d'une modulation de la PLT par les AGPI n-3, qui est sous-tendue par l'activité des récepteurs au glutamate, est également soutenue par des données obtenues dans des modèles de vieillissement pathologique. Ainsi, il a été montré sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris Tg2576 âgées de 17 mois), qu'une supplémentation en DHA durant une période de 5 mois (0,6 % du poids total de nourriture) protégeait contre la baisse de l'expression des sous-unités NR2A et NR2B du récepteur NMDA dont l'activité est impliquée dans la PLT. La supplémentation protégeait également des processus apoptotiques tels que l'activation des caspases et permettait de restaurer l'expression de protéines synaptiques telles que la drebrine ou la PSD-95 (postsynaptic protein density 95) (Calon et al. 2005, Calon et al. 2004).

Parmi les modes d'action des AGPI n-3 pouvant moduler la plasticité synaptique, notre laboratoire s'est intéressé au rôle des récepteurs nucléaires. Les données obtenues récemment ont en effet montré qu'une supplémentation en EPA/DHA durant 5 mois chez des rats à mi-vie permettait d'améliorer la mémoire spatiale de travail et était associée au maintien de l'expression de RXR γ et de RXR β mesurée dans l'hippocampe (Alfos et al. en préparation). De plus, une étude récente a montré que la consommation d'huile de poisson chez de jeunes rats durant une période de 10 semaines permettait d'améliorer les performances mnésiques dans le labyrinthe aquatique de Morris et était associée à une augmentation de l'expression des transcrits de PPAR β et de PPAR γ au niveau de l'hippocampe (Hajjar et al. 2012). Par ailleurs, Dyall et al. (2010) ont montré chez des rats âgés de 24-25 mois une diminution de l'expression protéique de RAR α , RXR α , RXR β et PPAR γ au niveau du cerveau antérieur et notamment au niveau de l'hippocampe et du cortex

préfrontal pour RAR α , RXR α et RXR β , par comparaison à des rats âgés de 4-5 mois. Cette baisse d'expression pouvait être prévenue par une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 (270 – 300 mg/kg/jour) administrée durant 12 semaines.

Une autre étude récente a par ailleurs montré que les bonnes performances mnésiques des souris âgées supplémentées en AGPI-LC n-3 étaient associées à la diminution de l'expression des cytokines inflammatoires et à un changement de morphologie des astrocytes dans l'hippocampe. Cet effet des AGPI-LC n-3 était également associé à une activation du gène précoce *c-fos*, suggérant des modifications de la plasticité synaptique (Labrousse et al. 2012).

D'autres auteurs ont également montré une amélioration de la neurogenèse hippocampique (différentiation neuronale), altérée au cours du vieillissement, chez des rats âgés de 19 à 26 mois ayant reçu une supplémentation en EPA/DHA ou en DHA seul (200 à 300mg/kg/jour) durant 3 semaines (Kawakita et al. 2006) ou 12 semaines (Dyall et al. 2010). Enfin, certaines études ont suggéré une implication des AGPI n-3 dans la protection contre le stress oxydant intervenant au cours du vieillissement. Ainsi, Avramovic et al. (2012) ont montré une diminution du statut oxydatif dans le cortex cérébral de rats âgés de 24 mois ayant reçu une dose journalière de 30 mg d'EPA et de 45 mg de DHA durant 6 semaines.

L'ensemble de ces données démontre donc l'implication de la voie de signalisation des AGPI n-3 dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement, principalement *via* la modulation des processus de plasticité synaptique dépendants de l'expression des récepteurs nucléaires des AGPI n-3 et des rétinoïdes. De même, un certain nombre de données mettent en avant le rôle essentiel de la vitamine A dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre.

VII.4 - Rôle de la vitamine A au cours du vieillissement

VII.4.1 - Conséquences du vieillissement sur le métabolisme de la vitamine A

Au cours du vieillissement, de nombreuses données ont montré une perturbation du métabolisme de la vitamine A. En effet, plusieurs études ont rapporté une augmentation des réserves hépatiques de rétinol chez les sujets âgés (Dawson et al. 2000, Sundboom and Olson 1984, van der Loo et al. 2004). Cette augmentation des réserves hépatiques traduirait

des perturbations métaboliques telles qu'une augmentation de l'absorption intestinale (Hollander and Dadufalza 1990). Par ailleurs, les capacités à mobiliser les réserves hépatiques de rétinol pour une utilisation efficace sont fortement perturbées chez le sujet âgé (Azais-Braesco et al. 1995). Ainsi, plusieurs études menées chez l'Homme et l'animal ont montré une variation de la concentration en rétinol plasmatique au cours du vieillissement. Cependant, les données ne sont pas cohérentes. En effet, certaines études ont montré une augmentation de la concentration en rétinol plasmatique (Borel et al. 1998, Herberg et al. 1994), d'autres auteurs ont montré une baisse (Haller et al. 1996, Touyarot et al. 2013, van der Loo et al. 2004), ou peu de variations (Comstock et al. 1988, Dawson et al. 2000, Feart et al. 2005b). De plus, il a également été montré une perturbation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du rétinol (Dawson et al. 2000, Yamamoto et al. 2000) et un ralentissement du transport de la vitamine A intestinale vers le foie (Borel et al. 1998). En ce qui concerne le métabolisme cérébral, il a également été montré chez des rats âgés une augmentation de l'expression de la CRABP1, permettant le transport intracellulaire du rétinol et suggérant une réduction du pool de rétinol libre dans la cellule pouvant agir sur les récepteurs nucléaires (Touyarot et al. 2013).

Cette altération de la biodisponibilité du rétinol pourrait entraîner une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les tissus cibles et notamment le cerveau. Ainsi, chez l'animal âgé, il a été mis en évidence une baisse de l'expression des ARNm de RAR et RXR au niveau du foie (Pallet et al. 1997) et du cerveau (Dyall S. C. et al. 2010, Enderlin et al. 1997a, Enderlin et al. 1997b, Etchamendy et al. 2001, Feart et al. 2005a), et plus particulièrement dans l'hippocampe (Etchamendy et al. 2001, Dyall et al. 2010). De plus, un traitement pharmacologique à l'AR a permis de rétablir les niveaux d'expression de ces récepteurs nucléaires à un niveau comparable à celui des animaux jeunes (Enderlin et al. 1997b, Etchamendy et al. 2001, Féart et al. 2005a) ; cet effet étant bloqué par l'administration d'un antagoniste des RAR (Etchamendy et al. 2001). Chez l'Homme, il a également été mis en évidence une hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque au niveau des cellules sanguines. En effet, il a été montré une diminution significative de l'expression de RAR γ dans les cellules mononuclées sanguines de sujet âgés de 69 à 90 ans comparés aux sujets contrôles âgés de 24 à 57 ans (Feart et al. 2005b). De plus, Brtko et al. (2007) ont montré une diminution significative de l'expression

des transcrits de RXR β dans les cellules mononuclées sanguines chez des sujets dont la moyenne d'âge était de 65 ans comparés à des sujets âgés de 26 ans en moyenne. Cette diminution d'expression n'était pas restaurée par l'administration d'une dose quotidienne d'AR 13-*cis* (0,5 mg/kg/jour) durant 4 semaines.

VII.4.2 - Rôle de la vitamine A dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement

Certains travaux menés au laboratoire ont démontré l'implication de la vitamine A (*via* les récepteurs de l'AR) dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement (Enderlin et al. 1997, Etchamendy et al. 2001). En effet, chez des animaux de 21-23 mois par comparaison à des animaux de 3-5 mois, il a été montré une hypoexpression des récepteurs RAR et RXR dans le cerveau au cours du vieillissement (Enderlin et al. 1997) conduisant à une réduction de l'expression de gènes cibles codant pour des protéines marqueurs de la plasticité synaptique telles que la neuromoduline (GAP-43) et la neurogranine (RC3), et participant ainsi à la mise en place des déficits mnésiques liés à l'âge (Etchamendy et al. 2001). De plus, les données ont montré qu'un traitement à l'AR chez ces animaux permet de supprimer de façon sélective les déficits cognitifs observés dans un test de mémoire relationnelle, associé à une augmentation de l'expression de RC3 au niveau de l'hippocampe (Etchamendy et al. 2001). Il a également été mis en évidence un maintien de la mémoire de travail chez des souris âgées de 21-23 mois ayant reçu une supplémentation nutritionnelle en vitamine A dès l'âge de 2 mois (Mingaud et al. 2008). Un traitement à l'AR permettant par ailleurs d'augmenter l'expression de GAP-43 chez ces mêmes animaux âgés n'ayant pas reçu de supplémentation nutritionnelle en vitamine A. Plus récemment un maintien des performances de la mémoire de référence a été mis en évidence chez des rats âgés de 18 mois ayant reçu une supplémentation de 4 mois en vitamine A (Touyarot et al. 2013).

L'étude des mécanismes de la plasticité cérébrale impliqués dans le maintien des performances mnésiques chez l'animal âgé a permis de mettre en évidence plusieurs niveaux d'action des rétinoïdes. En effet, Touyarot et al. (2013) ont récemment montré que le maintien des performances mnésiques évaluées dans le labyrinthe aquatique de Morris chez des rats âgés ayant reçu une supplémentation nutritionnelle en vitamine A était associé à un maintien du niveaux de progéniteurs neuronaux immatures dans l'hippocampe. Par

ailleurs, il a été montré que la baisse de la PLT observée dans la région CA1 de l'hippocampe chez des souris âgées pouvait être reversée par un traitement pharmacologique à l'AR (Etchamendy et al. 2001).

Enfin, dans un modèle murin de vieillissement accéléré, il a été montré qu'un agoniste des récepteurs RAR permettait d'augmenter l'expression des transcrits et de la protéine ADAM10, connue pour être impliquée dans la prévention de la formation du peptide A β amyloïde. Par ailleurs, les injections de cet agoniste des RAR ont permis de supprimer les déficits de mémoire de travail observés dans ce modèle de vieillissement (Kitaoka et al. 2013).

L'ensemble de ces données semblent indiquer que la vitamine A et plus particulièrement son métabolite actif l'AR, *via* son action sur les récepteurs nucléaires, jouerait un rôle crucial dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement. Signalons qu'actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant un lien potentiel entre la perturbation de la voie de signalisation des rétinoïdes et celle d'autres voies moléculaires telles que celle des MAPK pouvant également induire des changements de la plasticité synaptique.

Objectifs de la thèse

A ce jour, un ensemble de données cohérentes souligne le rôle primordial des AGPI-LC n-3 dans le fonctionnement du cerveau, notamment chez l'adulte et le sujet âgé. Le statut cérébral en AGPI-LC n-3 apparaît ainsi comme un facteur déterminant dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement. Dans le contexte du développement de stratégies de prévention par voie nutritionnelle du déclin cognitif lié à l'âge, il est essentiel d'une part de pouvoir appréhender l'évolution du contenu cérébral en AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement et, d'autre part, de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'action bénéfique des AGPI-LC n-3 sur les processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances mnésiques.

Parmi les différents mécanismes d'action des AGPI-LC n-3, notre travail s'est focalisé sur leur capacité à moduler l'expression des gènes *via* leur action sur des récepteurs nucléaires. En effet, les données bibliographiques présentées dans la première partie de ce manuscrit traitent des régulations génomiques ou non génomiques induites par les AGPI-LC n-3, aboutissant à la modulation de plusieurs voies de signalisation cellulaires. Par ailleurs, un certain nombre de données font état de multiples niveaux d'interaction entre la voie de signalisation des AGPI-LC n-3 et celle des rétinoïdes (composés dérivés de la vitamine A), notamment au niveau moléculaire en raison du rôle majeur joué par les récepteurs nucléaires RXR comme partenaire d'hétérodimérisation commun des PPAR et RAR, mais aussi en tant que ligand potentiel à la fois des rétinoïdes et des acides gras (AG). Ainsi, les données bibliographiques présentées dans la première partie de ce manuscrit rapportent des modes d'action similaires, voire complémentaires entre les AGPI-LC n-3 et les rétinoïdes.

Dans ce contexte, notre hypothèse générale de travail suggère que les effets bénéfiques des AGPI-LC n-3 sur les processus neurobiologiques sous-tendant les performances mnésiques au cours du vieillissement, pourraient être complémentaires de ceux déjà décrits pour la vitamine A et passeraient en partie par l'activation de la voie de signalisation de cette vitamine liposoluble.

Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons mis en place plusieurs types d'approches utilisant des modèles de suppléments nutritionnelles en AGPI-LC n-3 et/ou

en vitamine A, ainsi qu'un modèle pharmacologique destiné à définir de manière plus spécifique les effets bénéfiques du DHA.

Tout d'abord, il nous est apparu essentiel de pouvoir caractériser sur notre modèle de vieillissement le statut cérébral en acides gras des animaux, et notamment en AGPI-LC n-3, dans différentes structures cérébrales impliquées dans la mémoire. Par ailleurs, dans le cadre du développement d'une stratégie de prévention par voie nutritionnelle du vieillissement cognitif, nous avons cherché à définir des marqueurs sanguins du statut cérébral en AGPI n-3 au cours du vieillissement et lors d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3.

Pour cela, l'approche expérimentale mise en œuvre ici a consisté à étudier les effets d'une part du vieillissement et d'autre part, de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA chez le rat âgé, sur les contenus circulants et cérébraux en acides gras. Ce travail a été réalisé à la fois sur différentes structures cérébrales impliquées dans les performances mnésiques ainsi que sur différentes classes de phospholipides. Ainsi chez des rats adultes ou âgés soumis à un régime équilibré en précurseurs des AGPI n-6 et n-3, respectivement l'acide linoléique (LA) et l'acide α -linoléique (ALA), mais dépourvu de dérivés à longue chaîne ou chez des rats âgés supplémentés en EPA/DHA sous forme d'huile de poisson, les profils en AG du plasma, des érythrocytes, de l'hippocampe, du cortex préfrontal et du striatum ont été établis dans la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine. Les données obtenues apportent une vision nouvelle sur l'évolution du profil en AG dans le sang mais aussi dans les structures cérébrales au cours du vieillissement d'une part et en réponse à une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 d'autre part. De plus, ce travail présente des données originales sur la recherche de biomarqueurs sanguins permettant d'évaluer le statut cérébral en AGPI n-3. Les résultats acquis sont présentés dans le chapitre 1 et font l'objet d'une publication soumise à *British Journal of Nutrition*.

Chapitre 1 : Effets du vieillissement et d'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA sur les contenus sanguins et cérébraux en AGPI-LC n-3 : Recherche de biomarqueurs sanguins du statut cérébral en DHA.

Publication 1: Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 LC-PUFA supplemented aged rats.

La deuxième partie de ce travail de thèse a consisté à évaluer les effets de suppléments nutritionnelles en AGPI-LC n-3 et en vitamine A seules ou combinées sur les performances de mémoire spatiale de travail et de mémoire de référence de rats âgés. Les niveaux d'expression des récepteurs nucléaires des AGPI n-3 et des rétinoïdes ainsi que ceux de plusieurs gènes impliqués dans les effets non génomiques de ces nutriments ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel (qPCR) dans l'hippocampe, structure impliquée dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Les niveaux protéiques de certains de ces gènes ont également été mesurés par Western blot. Les résultats obtenus apportent de nouvelles données sur les synergies d'action des AGPI-LC n-3 et de la vitamine A dans la prévention des altérations mnésiques liées à l'âge et leurs mécanismes d'action spécifiques. Ces résultats sont exposés dans le chapitre 2.

Chapitre 2: Effets de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A sur la mémoire spatiale au cours du vieillissement et implication des voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes.

Publication 2: N-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin A have synergetic effects on spatial memory in aged rats. En préparation.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'action spécifique du DHA sur les processus de mémoire dépendants de l'hippocampe au cours du vieillissement. Afin de nous affranchir des étapes permettant la mobilisation intracellulaire du DHA, nous avons choisi une approche pharmacologique mettant en œuvre du DHA sous forme libre, directement utilisable par les tissus. Ainsi, des animaux âgés ont reçu des injections quotidiennes de DHA par voie intrapéritonéale et leurs performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelle ont été évaluées. Les

conséquences de ce traitement sur l'expression des récepteurs nucléaires des acides gras dans l'hippocampe ont été évaluées par qPCR.

Cette étude à été menée en collaboration avec l'équipe de D. Béracochéa à l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA).

Chapitre 3 : L'administration de DHA non estérifié améliore les performances mnésiques de souris âgées : Implication du RXR γ .

Chapitre 1 : Effets du vieillissement et d'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA sur les contenus sanguins et cérébraux en AGPI-LC n-3 : Recherche de biomarqueurs sanguins du statut cérébral en DHA

Introduction :

Le cerveau est après le tissu adipeux, l'organe le plus riche en lipides et notamment en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), constituants près de 35 % des acides gras totaux contenus dans les phospholipides des membranes cérébrales. Parmi ces AGPI-LC, ceux de la série n-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), apparaissent désormais comme jouant un rôle majeur dans le maintien des fonctions cognitives, notamment la mémoire, au cours du vieillissement (Su et al. 2010).

Un certain nombre de données de la littérature, suggère que la capacité des AGPI-LC n-3 à moduler les fonctions cérébrales dépend avant tout de leur niveau d'accrétion au sein des membranes cérébrales. L'apport des acides gras (AG) dans le cerveau est couvert par le pool circulant dans le sang, lui-même dépendant du niveau de la consommation alimentaire. Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que les niveaux d'AGPI-LC n-3 contenus dans les membranes cérébrales, sont dépendants de la région cérébrale ainsi que de la classe de phospholipides. En effet, le DHA est particulièrement abondant dans les membranes du cortex préfrontal et de l'hippocampe, deux régions jouant un rôle majeur dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Plus précisément, il est estérifié principalement dans la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, qui sont les deux classes de phospholipides majoritaires présentes dans les membranes cérébrales (Dyall et al. 2007).

Au cours du vieillissement, les données de la littérature font état de nombreux changements de composition en AG dans les phospholipides membranaires notamment une baisse des contenus en AGPI n-3 (Barcelo-Coblijn et al. 2003). Cependant, du fait des régimes expérimentaux, de l'âge des animaux, mais également de la région cérébrale ou de la classe de phospholipides auxquels ces travaux se sont intéressés, les résultats obtenus sont

souvent divergents. Par ailleurs, de nombreuses études menées sur l'animal âgé ont montré qu'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3 permettait de prévenir les modifications de la composition en AG dans les membranes cérébrales, participant ainsi au maintien des performances cognitives au cours du vieillissement (Labrousse et al. 2012). Cependant, à l'instar des modifications de la composition en AG dans les membranes au cours du vieillissement, les effets d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3 sur les contenus cérébraux en DHA sont dépendants de la région et de la classe de phospholipides étudiées (Xiao et al. 2005).

Dans le cadre de l'élaboration d'une alimentation préventive pour retarder les effets délétères du vieillissement sur les processus mnésiques, il nous est apparu essentiel de pouvoir caractériser l'évolution du statut cérébral en AGPI-LC n-3, notamment au niveau de structures impliquées dans les processus mnésiques. Le but de cette étude était donc d'étudier les relations entre les compositions en AGPI-LC n-3 circulants et les compositions en AGPI-LC n-3 dans les phospholipides membranaires du cerveau au cours du vieillissement et dans le cas de supplémentation nutritionnelles en EPA/DHA afin de déterminer des marqueurs sanguins du statut cérébral en AGPI-LC n-3 chez des animaux âgés.

Méthodologie :

Des rats mâles Wistar âgés de 13 mois ont été soumis à un régime alimentaire à base d'huile de poisson, enrichi en EPA et en DHA (250 mg d'EPA et 250 mg de DHA par jour) durant une période 5 mois. Parallèlement, des rats contrôles âgés de 3 semaines ou des rats âgés de 13 mois on reçu un régime à base d'huile de colza, d'arachide et de tournesol, équilibré en précurseurs AGPI n-3 mais dépourvu d'AGPI-LC n-3 durant la même période. Nous avons étudié les effets du vieillissement, ainsi que de la supplémentation en EPA/DHA sur la composition en AGPI-LC n-3 du pool circulant ainsi que de plusieurs structures cérébrales impliquées dans les processus mnésiques. Pour cela, nous avons analysé la composition en AG au niveau du plasma et du sang ainsi que dans l'hippocampe, le cortex préfrontal et le striatum, dans la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC). Des analyses de corrélations ont ensuite été effectuées afin d'étudier les relations existantes entre les compositions en AGPI n-3 de ces différentes fractions.

Principaux résultats :

Brièvement nos résultats montrent d'une part que le vieillissement est associé à des modifications de la composition lipidique dans le sang et dans le cerveau, notamment en AGPI-LC n-3. Cependant, ces modifications sont hétérogènes selon le compartiment étudié, dépendant à la fois de la fraction sanguine ou de la structure cérébrale, ainsi que de la classe de phospholipide étudiée. En effet, chez les animaux âgés contrôles, nos résultats montrent une augmentation globale du contenu en DHA dans le plasma, alors que ce contenu reste stable au sein de la PE et de la PC des membranes érythrocytaires par comparaison aux animaux adultes contrôles. Dans le cerveau des animaux âgés, le niveau de DHA ne varie pas dans le cortex préfrontal, alors qu'il est diminué dans le striatum par comparaison aux rats adultes. Dans l'hippocampe des rats âgés, le niveau de DHA contenu dans la PC est diminué mais ne varie pas significativement dans la PE, par comparaison aux rats adultes contrôles.

Par ailleurs, nos résultats montrent une nette augmentation des contenus en AGPI-LC n-3 circulants dans le plasma ainsi que dans les membranes érythrocytaires et hippocampiques. Dans le cortex préfrontal et le striatum, le niveau de DHA n'est augmenté significativement que dans la PE.

Ainsi, chez des rats âgés supplémentés en EPA/DHA, nous montrons une corrélation positive entre le niveau de DHA contenus dans la PE des membranes érythrocytaires et ceux de la PE du cortex préfrontal et de l'hippocampe.

Conclusion :

Les résultats de cette étude suggèrent que le vieillissement est associé à une diminution de la biodisponibilité des AGPI n-3, conduisant à une augmentation des niveaux d'AGPI-LC n-3 dans le sang qui ne reflète donc pas la baisse des contenus cérébraux en AGPI-LC n-3. Par ailleurs, une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA, permet d'augmenter à la fois les contenus sanguins, et au sein de la PE des 3 structures cérébrales étudiées. Ainsi, nous montrons que le niveau de DHA contenu dans la PE des érythrocytes est un indicateur des niveaux de DHA estérifié dans la PE de l'hippocampe et du cortex préfrontal chez des animaux âgés supplémentés en EPA/DHA.

Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 LC-PUFA supplemented aged rats

Létondor A.^{1,2,3}, Buaud B.³, Vaysse C.³, Djoukitch S.³, Montesinos E.³, Herrouin C.³, Servat B.^{1,2,3}, Layé S.^{1,2}, Pallet V.^{1,2}, Alfos S.^{1,2*}

¹ Univ. Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

² INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

³ ITERG, Institut des corps gras, 33600 Pessac, France.

*Corresponding author:

S. Alfos, Tel: +33 5 57 57 95 23, email: serge.alfos@enscbp.fr

This work was supported by Région Aquitaine, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt– ACTIA, Association Nationale de la Recherche et de la Technologie – ANRT, Société Lesieur and ONIDOL

SUMMARY:

Aging is associated with changes in brain n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) levels, and mainly DHA playing a critical role in maintaining brain functions. However, limited data reported the effects of aging and of an n-3 LC-PUFA supplementation on both blood and brain fatty acid compositions. In this study, we assessed the relationship between the fatty acid contents in blood and those in hippocampus, striatum and cerebral cortex during aging and after an n-3 LC-PUFA supplementation in rats. With aging, the decreased brain DHA content observed was region- and phospholipid class-specific. Moreover, we highlighted a positive relationship between DHA levels in erythrocyte phosphatidylethanolamine and those in hippocampus and prefrontal cortex in EPA/DHA supplemented aged rats. Within the framework of a preventive dietary supplementation to delay brain aging, these results suggest the possibility to use erythrocyte phosphatidylethanolamine DHA content as a reliable biomarker of DHA status in specific brain regions.

LIST OF ABBREVIATION USED:

MUFA: Monounsaturated fatty acid; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; SFA: Saturated fatty acid; n-3 LC-PUFA: n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid

INTRODUCTION:

Lipids are the main components of the brain in which they represent 50% of its dry weight. In brain membranes, the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) represent 35% of total fatty acids. Among them, n-3 long-chain PUFAs (n-3 LC-PUFAs) such as docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) play a critical role in the maintenance of cognitive functions such as learning and memory during normal and pathological aging [1-3]. Several studies suggested that the ability of n-3 LC-PUFAs to modulate brain functions is closely dependant of their content in cerebral membranes, which is related to dietary intake [4-5]. Indeed a low de novo synthesis of n-3 LC-PUFAs occurs in the brain from its precursor α -linolenic acid (ALA, 18:3 n-3) and several data suggested that the major n-3 LC-PUFA needs in the brain are covered by the circulating pool of fatty acids, itself depending on the dietary intake [6-7]. The abundance of n-3 LC-PUFAs is brain region-specific [8], and dependent on the phospholipid classes in brain membranes [9]. DHA is preferentially enriched in the prefrontal cortex and in the hippocampus [8-9], which are brain regions involved in memory processes and particularly vulnerable to aging [10-12]. DHA is also present in other brain regions such as the striatum but in a lesser proportion [8-9]. In rat brain, DHA proportion is mainly esterified to the phosphatidylethanolamine (PE) and the phosphatidylcholine (PC) which are the major cerebral membrane phospholipid fractions (respectively 36 to 40% and 42 to 44% of total phospholipids). DHA represents 15 to 20% of total fatty acids in PE and 3 to 5% of total fatty acids in PC [9, 13].

Aging is associated with multiple impairments, including changes in the lipid composition of brain membranes and mainly changes in the DHA content. However, depending on the animals' age and diet, and also on the brain regions and phospholipid classes studied, data of brain lipid composition differ from one study to another. Thus, most studies have shown lesser DHA contents in the whole brain of aged rodents [14-16], or in certain brain regions such as the hippocampus [17] or the cerebral cortex [18]. On the contrary, some studies have measured higher DHA contents in specific regions such as the hippocampus [19] or the midbrain, striatum, medulla or cerebellum of aged rat [8], while another study has not highlighted any age-related modification [20]. As regards the variation of the brain

phospholipid contents during aging, it was observed a preferential decrease in PE, and it was consequently measured a decrease in total DHA contents [17, 21]. More precisely, a selective decrease in DHA contents of PE and PC in the hippocampus and in the frontal cortex has already been observed both in aged animals and in elderly [9, 22-23]. Furthermore, numerous studies carried out in aged rodents have shown that an n-3 LC-PUFA-enriched diet can prevent changes in brain fatty acid composition, thus participating in the maintenance of cognitive functions during aging [9, 15, 17-18]. However, as for the age-related decrease in brain DHA, the effects of n-3 LC-PUFA supplementations on brain DHA contents are region- and phospholipid class-specific [8-9].

From the perspective of a strategy of preventive nutrition to delay brain aging, it is crucial to well understand the evolution of the brain DHA content during aging. Literature suggests that a decreased DHA content may favor the vulnerability to functional alterations occurring during aging. Therefore, it is necessary to identify blood biomarkers of the n-3 LC-PUFA status in the brain membranes in order to help prevent age-related cognitive decline processes. Although the mechanisms by which fatty acids enter the brain are still discussed, a number of studies have reported several correlations between the circulating fatty acid pool and the n-3 LC-PUFA brain content in response to a dietary fatty acid intake in adult rats [24-25] and humans [26]. These results suggest that it could be possible to identify reliable and readily available blood biomarkers of the brain DHA status. However, the relationship between the pool of circulating fatty acids and the n-3 LC-PUFA brain status could vary according to the brain region and the phospholipid class, and could be modified with aging. To our knowledge there are missing data concerning the effects of aging and of an n-3 LC-PUFA supplementation on both brain and blood fatty acid compositions. Thus, a blood biomarker of the brain n-3 PUFA status, taking into account age, specific brain regions and specific phospholipid classes remains to determine.

In this context, the aim of the present study was to determine the relationship between the blood fatty acid composition with this of several brain regions during aging in rat. To address this issue, our study was carried out on one hand in adult and aged rats fed a diet free from n-3 LC-PUFAs, and on the other hand in aged rats fed an EPA/DHA enriched diet. We then analyzed the fatty acid contents both in the blood (in plasma total lipids, and in PE and PC fractions of erythrocyte membranes) and in PE and PC fractions of three brain regions underlying memory processes: the hippocampus, the striatum and the prefrontal cortex.

MATERIAL AND METHODS

Animals:

The study was conducted according to the INRA Quality Reference System and to the directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Protocols were approved by the French Ministry for Higher Education and Research and the Animal Care and Use Committee of Bordeaux University.

3-week-old (adult) and 13-month-old (aged) male Wistar rats purchased from Janvier (France) were maintained under standard housing conditions in a temperature- ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity-controlled room (40%) with a 12 hour light/dark cycle. All animals were fed and given water *ad libitum*. After 1 week of acclimatization to the housing conditions with a standard chow, aged rats were randomly divided into 2 groups (n=9-10 per group): the first group received a control diet (aged control group), and the second group received an EPA/DHA enriched diet (aged EPA/DHA group). The 3-week-old rats (n=10) received exclusively the control diet (adult control group). All the diets were given for 21 weeks.

Diets:

The control diet was free from any LC-PUFA and consisted of a mix of peanut, colza and sunflower oils (60/25/15, by weight) added to a standard laboratory chow (UPAE-INRA Jouy-en-Josas, France). The EPA/DHA supplemented diet was a mix of fish oils (EPAX® 4510 TG and 1050 TG; Polaris, France) and colza and sunflower oils (25/25/20/30, by weight) added to a standard laboratory chow. The composition of diets is detailed in Table 1. The diets were prepared every two days and stored at 4°C until their use. They were given daily between 5:00 and 7:00 p.m.

At the end of the 21-week period of feeding, the adult rats (6-month-old) and the aged rats (18-month-old) were euthanized and then decapitated. Blood was collected from the sectioned jugular vein and rapidly centrifuged to obtain plasma and red blood cells (RBC), which were stored at -80°C until analysis. The brain was quickly removed and the whole hippocampus, striatum and prefrontal cortex were dissected out bilaterally and rapidly frozen and stored at -80°C until lipid analysis.

Lipid analysis:

Plasma total lipids:

Total esterified fatty acids from plasma were methylated according to the method of Lepage and Roy [27]. Briefly, 2 ml of methanol-isoctane (4:1, v/v) and 300 µl of acetyl chloride were added to 200 µl of plasma for 1 h at 100°C. To stop the reaction, 5 ml of 6% Na₂CO₃ (w/v) were added to the mixture. After centrifugation, the upper phase containing fatty acid methyl esters (FAME) was removed, evaporated to dryness under a stream of nitrogen, redissolved in hexane and then stored at -20°C until further analysis.

Red blood cell membrane phospholipids:

Isolation of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine:

Phospholipids of RBC membranes were extracted according to the method of Peuchant [28] with 20 volumes of isopropanol per g of erythrocytes. Extraction was made under agitation at room temperature for 10 minutes. The extract was filtered with isopropanol; solvent was evaporated under vacuum, at room temperature with a rotary evaporator. The dry extract was taken again with chloroform/methanol (2/1, by vol.), and filtered. Solvent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Lipids were taken up in an appropriate volume of chloroform/methanol (2/1, by vol.). The phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) from RBC were isolated from other phospholipid classes by thin layer chromatography (TLC) using plates pre-coated with 0.35 mm silica gel 60 H (Merck, Fontenay-sous-Bois, France). The solvent system used for separation was a mixture of chloroform/methanol/acetic acid/distilled water (50/37.5/3.5/2, by vol.). After migration and revelation with 2,7 dichlorofluorescein (0.2% in ethanol, w/v), the silica gel areas corresponding to PE and PC were visualized under UV light (254 nm), removed from the TLC plate and transferred in a glass tube for preparation of the FAME.

Brain membrane phospholipids:

Isolation of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine:

Total lipids from hippocampus, striatum and frontal cortex were extracted using a method adapted from Folch and collaborators [29] by 20 volumes of chloroform/methanol (2/1, v/v) per g of tissue. The extraction was carried out under agitation at room temperature. After 1 hour, 0.2 volume of KCl (0.8% in water, w/v) per volume of extraction mixture was added and samples were centrifuged to separate chloroform and hydroalcoholic phases. The

hydroalcoholic phase was removed and the chloroform phase containing fatty acids was filtered with chloroform-methanol (2/1, v/v); then solvent was evaporated under vacuum, at room temperature with a rotary evaporator. The extracts were redissolved in chloroform and filtered to obtain a chloroform solution. The solvent was evaporated under nitrogen and dry extracts were finally dissolved again in chloroform-methanol (2/1, v/v).

PE and PC contained in the Folch extracts obtained from brain regions were isolated from others lipid classes by TLC as described above for RBC PE and PC.

Preparation of FAME:

Total fatty acids of PE and PC isolated from RBC and from the three brain regions were methylated and analyzed as previously described [30]. Briefly, total fatty acid chains of PE and PC were transmethylated according to the method of Morrison and Smith [31]. 1 ml of boron trifluoride-methanol solution (14%, w/v, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) was added to the silica gel containing the phospholipid fraction in a glass tube maintained at 100°C for 20 minutes. Then, after addition of 1 ml of NaOH (5M), FAME were extracted three times with 2 ml of isooctane. Organic phases were concentrated, washed with 1 ml of water and stored at -20°C until gas chromatography (GC) analysis.

Analysis of FAME:

The analysis of FAME was performed with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a split injector. A fused silica capillary column (BPX 70, 60m x 0.25mm internal diameter, 0.25mm film; Phenomenex, Germany) was used with H₂ as the carrier gas (inlet pressure: 1 bar). The split ratio was 1:70. The column temperature was programmed to increase from 150 to 200°C at 1.5°C/min for 25 min, then from 200 to 225°C at 20°C/min and held at 225°C until completion of the analysis (20 min). The injection port and detector were maintained at 250 and 280°C, respectively. The GC peaks were integrated using a Chromjet SP4400 integration system (Spectra Physics, Irvine, CA, USA). Individual FAME were identified by comparing their retention times with those of authentic standards eluted in the same conditions (Sigma Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France). Results are expressed as a percentage of total fatty acids.

Statistical analysis:

Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using StatView 5.0 software. Data were analyzed by one way ANOVA followed by a Student's t-test with a Bonferroni correction for multiple group comparison. Two pairwise comparisons were performed between adult and aged rats (effect of age) and between aged and EPA/DHA supplemented-aged rats (effect of supplementation) using Bonferroni adjusted significance chance levels of $p \leq 0.025$. Pearson's correlation was used to identify significant relationship between the PE and PC fatty acid composition from RBC, and the PE and PC fatty acid composition from hippocampus, striatum and prefrontal cortex.

RESULTS:**Effect of age and diet on the plasma fatty acid composition:**

Table 2 shows the plasma fatty acid composition of adult and aged rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Effect of age: Plasma of aged control rats exhibited a significant lower level of the total monounsaturated fatty acid (MUFA) content than in adults. Indeed, the palmitoleic acid (16:1 n-7), the oleic acid (18:1 n-9) and the *trans*-vaccenic acid (18:1 n-7) contents were lower in the plasma of aged control rats (respectively: -20%, $p < 0.01$; -23%, $p < 0.001$; -20%, $p < 0.001$) than in adults. The total n-6 and n-3 PUFA contents were higher in the plasma of aged rats, due to higher levels of arachidonic (AA, 20:4 n-6), eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3), n-3 docosapentaenoic (n-3 DPA, 22:5 n-3) and docosahexaenoic acids (DHA, 22:6 n-3) (respectively: +41%, $p < 0.001$; +26%, $p < 0.01$; +74%, $p < 0.001$ and +23%, $p < 0.01$).

Effect of diet: Aged EPA/DHA rats exhibited a higher content of saturated fatty acids (SFA) than aged control rats, partly due to a higher level of palmitic acid (16:0, +11%, $p < 0.01$). In contrast, the total MUFA proportion was lower in the aged EPA/DHA group compared to the aged control group. This effect was a result of lower levels of oleic and *trans*-vaccenic acids (respectively: -47%, $p < 0.001$ and -31%, $p < 0.001$) in aged EPA/DHA rats than in aged control rats. Furthermore, the EPA/DHA diet have led to higher levels of n-3 PUFAs such as EPA, DPA and DHA compared to aged control rats (initial values respectively multiplied by 36, $p < 0.001$; by 5, $p < 0.001$ and by 4, $p < 0.001$). This high level of n-3 PUFAs was associated with lower levels of n-6 PUFAs such as AA and n-6 DPA (respectively: -44%, $p < 0.001$ and -47%, $p < 0.001$).

Effect of age and diet on the erythrocyte PE fatty acid composition:

The fatty acid composition of RBC PE of adult and aged rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet is presented in Table 3.

Effect of age: As regards the RBC PE fatty acid composition, only n-3 and n-6 DPA contents were modified with age, the n-6 DPA proportion being lower (-24%, $p < 0.01$) and the n-3 DPA content being higher (+43%, $p < 0.001$) in aged control rats compared to adult control rats.

Effect of diet: The MUFA content was lower in aged EPA/DHA rats compared to aged control rats (-29%, $p < 0.001$) resulting partly from a lower oleic acid content (-21%, $p < 0.025$). As regards the PUFA content, EPA, n-3 DPA and DHA levels were higher in EPA/DHA aged rats than in aged control rats (respectively increased by 38, $p < 0.001$; by 2.5, $p < 0.001$; and by 3, $p < 0.001$). At the same time, a drastic reduction in the total n-6 PUFA content was observed, resulting from lower levels of AA and n-6 DPA (respectively: -25%, $p < 0.001$ and -81%, $p < 0.001$) in aged EPA/DHA rats than in aged control rats. Finally, the linoleic acid (LA, 18:2 n-6) content was higher in aged EPA/DHA rats than in aged control rats (+29%, $p < 0.025$).

Effect of age and diet on the erythrocyte PC fatty acid composition:

The fatty acid composition of RBC PC of adult and aged rats fed the control diet or the EPA/DHA enriched diet is presented in Table 4.

Effect of age: The MUFA content is lower in aged control rats than in adult control rats (-15%, $p < 0.01$), as a result of a low level of palmitoleic, oleic and *trans*-vaccenic acids (respectively: -25%, $p < 0.01$; -12%, $p < 0.025$ and -14%, $p < 0.025$). Additionally, it should be noted that in aged control rats, the levels of stearic acid (18:0) and n-3 DPA were higher (respectively +21%, $p < 0.01$ and +58%, $p < 0.001$) than in adult control rats.

Effect of diet: The palmitic acid content was slightly higher (+8%, $p < 0.01$) in aged EPA/DHA rats than in aged control rats. The enriched EPA/DHA diet led to a drastic elevation of the total n-3 PUFA level (increased by 3, $p < 0.001$) in aged EPA/DHA rats, due to higher levels of EPA, n-3 DPA and DHA (respectively increased by: 32, $p < 0.001$; 2, $p < 0.001$ and 1.5, $p < 0.01$). By contrast, the total n-6 PUFA level was reduced (-23%, $p < 0.001$), due to smaller AA and n-6 DPA contents (-56%, $p < 0.001$; -79%, $p < 0.001$) in aged

EPA/DHA rats than in aged control rats. The LA content was higher in aged EPA/DHA rats than in aged control rats (+23%, $p < 0.01$).

The fatty acid compositions of the hippocampus, striatum and prefrontal cortex were measured in the two main phospholipids PE and PC.

Effect of age and diet on the hippocampal fatty acid composition:

The fatty acid compositions of hippocampal PE and PC are presented respectively in Tables 5 and 6.

Effect of age: The total MUFA content was higher in hippocampal PE and PC of aged control rats than in adults, particularly due to high levels of palmitoleic acid in PE (+30%, $p < 0.001$) and oleic acid in PE and PC (respectively: +9%, $p < 0.025$ and +7%, $p < 0.01$). In hippocampal PC, aging was associated with a lower DHA level (-18%, $p < 0.025$) compared to the adult rats.

Effect of diet: Oleic acid in PE and palmitoleic acid in PC were slightly higher in aged EPA/DHA rats compared to aged controls rats (respectively: +12%, $p < 0.001$ and +14% $p < 0.025$), while *trans*-vaccenic acid was lower in PC (-9%, $p < 0.001$). Regarding n-3 and n-6 total PUFAs, their respective levels in both PE and PC were higher (PE: +27%, $p < 0.01$; PC: +29%, $p < 0.01$) and lower (PE: -23%, $p < 0.001$; PC: -14%, $p < 0.025$) in aged EPA/DHA rats compared to aged control rats. Indeed, in PE and PC, EPA, n-3 DPA and DHA proportions were higher (PE: respectively increased by 8, $p < 0.001$; 5, $p < 0.001$; 1.2, $p < 0.001$; PC: respectively increased by 13, $p < 0.001$; 2, $p < 0.001$; 1.2, $p < 0.025$), whereas the AA and the n-6 DPA levels were lower in PE (respectively, -16%, $p < 0.001$; -73%, $p < 0.001$), and in PC only for AA (-19%, $p < 0.01$). The LA content was higher both in PE and PC in aged EPA/DHA rats (PE: +59%, $p < 0.001$, +32%, $p < 0.01$) than in aged control rats.

Effect of age and diet on the striatal fatty acid composition:

Tables 7 and 8 show the respective fatty acid compositions of striatal PE and PC.

Effect of age: Age was associated with a slight decrease in the SFA level in striatal PE (-9%, $p < 0.001$). On the contrary, aged rats exhibited a higher level of total MUFAs in both striatal PE and PC (respectively: +15%, $p < 0.001$ and +10%, $p < 0.001$). This could be explained by higher levels of *trans*-vaccenic acid in PE (+19%, $p < 0.001$) and of oleic acid in PE and PC (respectively: +8%, $p < 0.01$ and +10%, $p < 0.01$). The total PUFA content was also affected

by aging in PE and PC (respectively: -7%, $p < 0.025$; -20%, $p < 0.025$), due to a lower n-3 PUFA level in aged rats than in adult control rats, associated more particularly with a decrease in the DHA level in both phospholipids (PE: -13%, $p < 0.025$ and PC: -29%, $p < 0.01$).

Effect of diet: Aged EPA/DHA rats exhibited higher levels of oleic acid in PE and PC (respectively: +12%, $p < 0.001$ and +2%, $p < 0.001$), palmitoleic acid in PC (+22%, $p < 0.01$) and a lower level of *trans*-vaccenic acid in PC (-8%, $p < 0.001$) compared to aged control rats. In PE, the total n-3 PUFA level was higher due to an increase in n-3 DPA and DHA proportions (respectively increased by 4, $p < 0.001$ and +20%, $p < 0.01$) in aged EPA/DHA rats than in aged control rats. On the other hand, the total n-6 PUFA level was lower in aged EPA/DHA rats than in aged control rats, due to a decrease in AA (-22%, $p < 0.001$) and n-6 DPA (-67%, $p < 0.001$). In PC, the increased level of DHA in EPA/DHA aged rats was not statistically significant; however there was significantly a higher level of n-3 DPA (increased by 2, $p < 0.001$) and a lower level of n-6 DPA (-75%, $p < 0.001$) than in aged control rats.

Effect of age and diet on the cortical fatty acid composition:

The cortical PE and PC fatty acid compositions are presented respectively in Tables 9 and 10.

Effect of age: No statistically significant effect of age was observed on the fatty acid composition of cortical PE and PC.

Effect of diet: In cortical PE of aged EPA/DHA rats, the total n-3 PUFA content was higher (+23%, $p < 0.001$) than in aged control rats due to higher EPA, n-3 DPA and DHA levels (respectively increased by 8, $p < 0.001$; 4, $p < 0.001$ and 1.3 $p < 0.001$). This increase was associated with an equivalent reduction in the total n-6 PUFA content (-27%, $p < 0.001$), represented by AA and n-6 DPA (respectively: -21%, $p < 0.001$; -75%, $p < 0.001$). As regard the cortical PC of aged EPA/DHA rats, n-3 PUFA levels were higher than in aged control rats due to an increase in EPA (increased by 5, $p < 0.001$) and n-3 DPA (increased by 4, $p < 0.001$). By contrast, aged EPA/DHA exhibited a lower n-6 DPA proportion (-71%, $p < 0.001$), and a lower *trans*-vaccenic acid level (-10%, $p < 0.01$) compared to aged control rats.

Relationship between the RBC fatty acid composition and the fatty acid compositions of PE and PC from brain regions:

To investigate the putative relationships between the circulating fatty acid pool and the brain fatty acid composition, we took into account the fatty acid composition of PE and PC from

RBC. Indeed, the fatty acid profile of erythrocyte membranes is recognized to reflect diet intakes over a longer period, due to their longer half-life, as compared with plasma. As presented in Figure 1, significant positive associations between the DHA content in RBC PE and this in hippocampal and cortical PE were observed (Figure 1A, $p < 0.01$, $r = 0.610$; Figure 1C, $p < 0.001$, $r = 0.667$). The same analysis was performed between the DHA levels in RBC PC and those in the three brain regions without showing any significant relationship (data not shown).

DISCUSSION:

Numerous studies suggest that the brain DHA status, particularly in brain regions underlying memory performances, is closely linked to the vulnerability of functional alterations occurring during aging. Since collection of brain regions involved in memory processes are sometimes not easy in animals and even quite impossible in humans, it is crucial to define blood biomarkers of the brain DHA status. While a significant body of work has focused on the relationship between the fatty acid compositions in plasma or in erythrocytes and this in the brain in response to a dietary n-3 PUFA supplementation, limited research has been conducted on the effect of aging on fatty acid composition both in brain and blood in rodents. Thus, our study was aimed to investigate 1) the effects of aging and of an n-3 LC-PUFA supplementation on blood fatty acid levels and those in the hippocampus, the striatum and the prefrontal cortex, 2) the relationship between the fatty acid levels, and mainly DHA, in the blood and those in these different brain regions in aged rats supplemented or not with n-3 LC-PUFAs. The main results of this study are that aging affected differently the fatty acid composition in the plasma, the erythrocytes and the three brain regions studied. The supplementation with n-3 LC-PUFAs in aged rats induced an increase in n-3 PUFA contents in the plasma, the erythrocytes and the brain. However, only a positive correlation was found between the DHA content in the PE of RBC membranes and the DHA contents in the PE of the hippocampus and the prefrontal cortex.

Effect of age:

Fatty acid profile in blood:

It now seems clear that in rats on an adequate ALA containing diet, the liver is capable of synthesizing sufficient DHA from circulating ALA to maintain a normal brain DHA level in the absence of dietary EPA or DHA [32]. Since the circulating fatty acid pool is a source of PUFAs for the brain [33-34], we assessed the plasma and RBC fatty acid compositions of adult (6-month-old), aged (18-month-old) and n-3 LC-PUFA supplemented aged rats. Our results showed a higher total PUFA level in the plasma of aged rats compared to that of adult rats, mainly due to an increase in the n-6 PUFA level and more particularly in AA level. Limited research data are available in animals regarding the effects of aging on plasma fatty acid composition. However, Ruggiero et al. have previously described a decrease in PUFAs and an increase in MUFAs in the plasma of 28-month-old compared to 4-month-old Fischer rats [35]. Engler et al. have also observed an increase in total PUFAs, specifically n-6 PUFAs,

in the plasma of 15-month-old compared to 4-month-old Fischer 344 rats [36]. More recently, Gao et al. have not observed significant change in plasmatic esterified n-3 PUFA concentrations whereas unesterified n-3 PUFA concentrations decreased significantly in the plasma of rats aged from 10 to 30 months [37]. These authors also demonstrated a slowdown in turnover rate of esterified DHA, leading to an increase in DHA half-life. In our study we have not separate esterified and non-esterified fatty acids, however our results, contrary to those of Gao et al., showed an increase in n-3 PUFAs particularly EPA, n-3 DPA and DHA in the plasma of aged rats. Similar increases in n-3 PUFA levels were already observed in the plasma of elderly [38-39]. More recently, Otsuka et al. have demonstrated in a large Japanese population that the increase in plasma EPA and DHA and the decrease in AA observed during aging was independent of fatty acid intake and reflected more specifically an age-related lipid metabolism alteration [40]. Indeed, data suggest that the n-3 LC-PUFA metabolism is subtly altered during healthy aging in humans. Therefore, a comparison of ^{13}C -DHA metabolism into plasma lipids in young adults (26 years) and healthy elderly (77 years) revealed that ^{13}C -DHA was significantly higher 4 hours after ingestion in plasma triglycerides and free fatty acids in the elderly than in young subjects [41].

To our knowledge, our study is the first one measuring fatty acid contents in the PE and the PC fractions of erythrocytes in rats during aging. As for the plasma, n-3 DPA contents were increased both in the PE and the PC fractions of the RBC membranes in aged rats compared to adult rats. In humans, an age-associated increase in RBC EPA+DHA level has been observed even after adjustment for n-3 PUFA intake in different populations [42-43]. Moreover, the total MUFA content in the PC fraction of the RBC was also reduced in aged rats, as observed in the plasma, indicating an increased vulnerability to aging for this phospholipid class. It should be noted that PC is the major phospholipid class and represents 32% (versus 21% for PE) of the total lipids in the RBC membranes [44]. These results suggest an alteration in the metabolism of circulating fatty acids during aging. Knowing that the circulating fatty acid pool is the major source of PUFAs for the brain, such an alteration in the blood fatty acid composition may have important consequences for the bioavailability of n-3 PUFAs to the brain.

Fatty acid profile in brain membranes:

In our study, the total PUFA content was decreased in the striatum of 18-month-old rats compared to that of 6-month-old rats. More precisely, we observed a decrease in n-3 PUFAs,

and mainly in DHA contents, both in striatal PE and PC, and only in hippocampal PC, whereas the n-6 PUFA contents remain stable during aging in both the phospholipid classes in the three studied brain regions. It should be noted that there was a trend in a decreased DHA content in the hippocampal PE which was however not statistically significant. These results are in agreement with the previous study of Dyllal et al. who measured a decrease in DHA in the hippocampal and striatal PE and PC but not in cortical PC in 24-month-old compared to 3-month-old rats [9]. The constancy of the DHA contents in hippocampal PE and in cortical PE and PC, suggests a compensatory mechanism which might serve to ensure a good availability of unsaturated fatty acids in these phospholipid classes as already suggested by Ilencheta de Boscherio et al. [45]. Indeed, these authors have demonstrated that aging affected differentially phospholipid species in brain regions of aged rats through changes in the base-exchange enzyme activities. Moreover, although striatum contained lesser DHA, it is also the brain area which exhibited the most significant decrease in both PE and PC during aging. Despite these compositional changes, it should be noted that the total n-6 PUFAs/total n-3 PUFAs ratio remained stable in the PE and PC of the three studied regions, enhancing the hypothesis of a compensatory mechanism maintaining the unsaturated rate and thus, integrity of brain membranes.

Our results showed that the decrease in PUFAs in the hippocampus and the striatum was accompanied by a significant increase in total MUFAs such as oleic acid, in the three studied brain regions both in PE and PC. This age-related increase in MUFA contents has been previously observed in the PE from cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of aged rats [21, 46-47]. Moreover, the total SFA content decreased in the striatal PE of aged rats, suggesting a potential increase in the delta-9 desaturase activity. An increase in the stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase) mRNA expression and activity has been described in the orbitofrontal cortex of humans aged from 29 to 59 years [48]. Otherwise, aging is associated with an increase in membrane rigidity and changes in its permeability which could lead to modifications of the selective transport of fatty acids across the blood brain barrier, and thus contribute to alter fatty acid bioavailability to the brain and modify fatty acid composition [49-51].

In our study, the fatty acid profiles of both PE and PC in cortical membranes were not modified in aged control animals. However, by using older rats than those in our study (22-month-old versus 18-month-old), some authors have previously observed a decrease in DHA content in cortical PE [18, 22]. These results suggest that in rat, the prefrontal cortex is a brain

region less sensitive to the effect of aging than hippocampus and striatum. A possible explanation for these results was provided by the differential phospholipid composition between cortical membranes, mainly composed by PE, and hippocampal and striatal membranes, containing mainly PC [9]. As in the RBC membranes, it seems that cerebral PE could be better protected from age-related compositional changes than PC and contributes to maintain the brain DHA contents during aging, particularly since PE contains more DHA than PC [23].

Relationship between the circulating fatty acid pool and the brain fatty acid composition in aged rats:

As previously described in elderly and in aged rodents, n-3 PUFA contents were higher in the fatty acid circulating pool [36, 38-39] whereas they were globally reduced in brain membranes of aged rats [9, 15, 18]. The accumulation of PUFAs in the blood of aged rats could be the result of a decreased utilization of PUFAs by target tissues such as the brain or an increase in the synthesis rate of PUFAs by the liver. However Gao et al. have recently shown that the hepatic capacity to synthesize DHA and other n-3 PUFAs from circulating ALA is maintained with age in the rat [37]. Since we observed a decrease in DHA contents in some brain regions, it could be suggested that the increase in blood PUFAs reflected a decreased PUFA bioavailability to the brain, potentially by a decrease in their transport through the blood-brain barrier. One of the major results of our study is the inverse relationship between the n-3 PUFA content in RBC membranes and those in the brain during aging. Therefore n-3 PUFA level in blood does not seem to be a valuable biomarker of brain DHA status during aging. Such a conclusion has already been drawn in human studies showing no correlation between plasma and brain DHA contents in elderly [52-53].

Effect of EPA/DHA supplementation:

According to previous studies which reported a beneficial effect of a five-month intake of an EPA/DHA enriched diet on memory performances in adult non-human primates and aged mice [54-55], we supplemented adult rats with a n-3 LC-PUFAs enriched diet over a five-month period.

Fatty acid profile in blood:

Our results showed that the supplementation with EPA/DHA led to a significant accumulation of n-3 PUFAs in plasma and erythrocyte membranes, with an important rising of EPA, n-3

DPA and DHA due to the dietary intake. This was accompanied by a subsequent reduction of n-6 PUFAs (AA and n-6 DPA), as a result of an inhibition of the delta-6 and delta-5 desaturase activities involved in both n-6 and n-3 biosynthetic pathways [56-57].

In the same time, supplemented aged rats exhibited a lesser level of oleic acid. This latter result can be assigned to a lower intake of oleic acid since the EPA/DHA supplemented diet contained a lesser amount of MUFAs than the control diet.

However, aged supplemented rats displayed also a higher level of SFA in plasma and PC of RBC compared to the aged control rats. This change cannot be due to the level of SFA intake which is lower in EPA/DHA supplemented rats than for control rats. Such compositional changes were already observed in 3-month-old mice supplemented with DHA from 2 weeks to 3 months of age compared to control animals receiving palm oil. The supplementation induced an increase in palmitic acid and a reduction in oleic acid levels in the plasma [58]. These results are consistent with a reduced activity of delta-9 desaturase, leading to the accumulation of SFAs, as previously described in liver microsomes of adult rats fed with a fish oil supplemented diet [57].

Fatty acid profile in brain membranes:

Globally, supplemented aged rats displayed a n-3 LC-PUFA content in the brain, such as EPA, n-3 DPA and DHA, close to or even higher than that measured in adult control rats, except in striatal and cortical PC in which the increases were not statistically significant.

The increase in n-3 LC-PUFA levels measured in supplemented aged rats was in balance with the lower amount of n-6 LC-PUFAs, leading to a decrease of nearly half of the total n-6 PUFAs/total n-3 PUFAs ratio in each brain region. These observations are coherent with data already reported in young and old mice receiving a n-3 PUFA enriched diet [15, 59-60]. However, the LA level rose in the hippocampus and the striatum in response to the supplementation even if the control and supplemented groups received an equivalent LA amount. This could be the result of an inhibition of delta-6 and delta-5 desaturase activities by n-3 LC-PUFA intake, as previously discussed for the plasma [56-57]. Otherwise, it is interesting to note that the MUFA content in aged supplemented rats was not restored to the level of adult control rats and remained as high as in aged control rats. Moreover, we did not observe any effect of the supplementation on the SFA level. Thus, EPA/DHA supplementation in aged rats allowed to preserve a high PUFA content in the brain membranes but failed to maintain other fatty acid levels such as MUFAs and SFAs.

Relationship between the circulating fatty acid pool and the brain fatty acid composition in EPA/DHA supplemented aged rats:

Some studies have reported correlations between the blood fatty acid pool and the brain n-3 LC-PUFA contents in response to various dietary fatty acid manipulations in adult rats [24-25] and humans [26]. Furthermore, some studies have reported that a high blood DHA level is associated with a protective effect against neurological disorders in humans [61]. These results suggest that it could be possible to identify reliable and readily available blood biomarkers of the brain DHA status, according to the n-3 PUFA dietary intakes. However, the relationship between the pool of circulating fatty acids and the n-3 LC-PUFA brain status could vary according to the brain region and the phospholipid class, and could be modified with aging. To our knowledge, our study is the first one investigating the relationship between blood and brain DHA levels, according to the age of animals, specific brain regions and phospholipid classes together.

In the present study, we performed multiple correlation analysis between DHA levels in RBC PE and PC and the DHA contents in brain PE and PC. We chose the RBC phospholipid fatty acid composition rather than the plasma fatty acid contents since the low turnover of RBC reflects the fatty acid composition of the diet consumed for a long period [62]. Our choice was also supported by a previous study performed in baboon neonates showing that brain DHA level assessment using erythrocyte biomarkers was more relevant than using plasma content as a biomarker [63].

In EPA/DHA supplemented aged rats, our results showed that RBC membrane fatty acid composition reflected not only dietary n-3 PUFA intake but also accumulation in brain membranes. Indeed, our results showed a significant positive correlation between the DHA contents in the PE of RBC membranes and those in the PE of the hippocampus and the prefrontal cortex. This association is consistent with previous results obtained in adult rats, showing a positive correlation between erythrocyte DHA levels and whole brain DHA levels under a wide range of n-3 PUFA enriched diets [24-25]. However, this positive association was not significant for the striatum, neither in PE nor in PC, highlighting the specificity of brain region in this association. In the same way, there was no correlation between the fatty acid compositions in RBC PC and those in PC of the three studied brain regions. Thus, it should be noted that potential associations between circulating fatty acid pool and whole brain fatty acid contents should be considered with prudence, taking into account the brain region

and the phospholipid class. The more robust correlation was observed in the PE of the prefrontal cortex, where the DHA level of adult control rats was the highest compared to the other fractions, and due to a better incorporation rate in supplemented aged rats. Otherwise, our results demonstrated that DHA level measured in the RBC PE is also indicative of the hippocampal DHA status.

To conclude, this study suggests that aging is associated with altered fatty acid bioavailability leading to an increase in blood n-3 LC-PUFA contents, which is therefore not indicative to the decrease in n-3 LC-PUFA contents observed in the brain. However, we have highlighted that the DHA content in the RBC PE was indicative of the DHA levels in the hippocampus and the prefrontal cortex PE in aged supplemented rats. Our findings are particularly important within the framework of preventive n-3 PUFA supplementation in elderly, current line of research to slowdown age-related memory impairment.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors wish to thank R.Hamiani for animal care and L. Fonseca for technical assistance.

REFERENCES:

1. Denis, I., et al., *Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms*. Ageing Res Rev, 2013. 12(2): p. 579-594.
2. Su, H.M., *Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance*. J Nutr Biochem, 2010. 21(5): p. 364-73.
3. Cunnane, S.C., et al., *Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease*. Prog Lipid Res, 2009. 48(5): p. 239-56.
4. Guesnet, P. and J.M. Alessandri, *Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations*. Biochimie, 2011. 93(1): p. 7-12.
5. Horrocks, L.A. and A.A. Farooqui, *Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. 70(4): p. 361-72.
6. Gao, F., et al., *Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats*. J Lipid Res, 2009. 50(12): p. 2463-70.
7. Rapoport, S.I., *Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. 88(1): p. 79-85.
8. Xiao, Y., Y. Huang, and Z.Y. Chen, *Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain*. Br J Nutr, 2005. 94(4): p. 544-50.
9. Dyall, S.C., et al., *Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain*. Neurobiol Aging, 2007. 28: p. 424-439.
10. Lister, J.P. and C.A. Barnes, *Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging*. Arch Neurol, 2009. 66(7): p. 829-33.
11. Morrison, J.H. and M.G. Baxter, *The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline*. Nat Rev Neurosci, 2012. 13(4): p. 240-50.
12. Mizumori, S.J. and Y.S. Jo, *Homeostatic regulation of memory systems and adaptive decisions*. Hippocampus, 2013.
13. Sastry, P.S., *Lipids of nervous tissue: composition and metabolism*. Prog Lipid Res, 1985. 24(2): p. 69-176.
14. Barcelo-Coblijn, G., et al., *Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(20): p. 11321-6.
15. Labrousse, V.F., et al., *Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e36861.
16. Arranz, L., et al., *Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage*. Age (Dordr), 2013. 35(3): p. 621-35.
17. Favreliere, S., et al., *DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus*. Neurobiol Aging, 2003. 24(2): p. 233-43.
18. Little, S.J., et al., *Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. 77(3-4): p. 155-62.
19. Andre, A., et al., *Effects of aging and dietary n-3 fatty acids on rat brain phospholipids: focus on plasmalogens*. Lipids, 2005. 40(8): p. 799-806.
20. Ulmann, L., et al., *Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2001. 64(3): p. 189-95.
21. Favrelière, S., et al., *Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus*. Neurobiology of Aging, 2000. 21: p. 653-660.
22. Latour, A., et al., *Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1*. Aging Cell, 2013. 12(1): p. 76-84.
23. Soderberg, M., et al., *Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease*. Lipids, 1991. 26(6): p. 421-5.

24. Tu, W.C., et al., *Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. 88(1): p. 53-60.
25. Stark, K.D., *The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues*. Lipids, 2008. 43(1): p. 45-53.
26. Kuratko, C.N. and N. Salem, Jr., *Biomarkers of DHA status*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. 81(2-3): p. 111-8.
27. Lepage, G. and C.C. Roy, *Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction*. J Lipid Res, 1988. 29(2): p. 227-35.
28. Peuchant, E., et al., *One-step extraction of human erythrocyte lipids allowing rapid determination of fatty acid composition*. Anal Biochem, 1989. 181(2): p. 341-4.
29. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. 226(1): p. 497-509.
30. Buaud, B., et al., *A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain*. Br J Nutr, 2010. 103(12): p. 1720-9.
31. Morrison, W.R. and L.M. Smith, *Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol*. J Lipid Res, 1964. 5: p. 600-8.
32. Rapoport, S.I. and M. Igarashi, *Can the rat liver maintain normal brain DHA metabolism in the absence of dietary DHA?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. 81(2-3): p. 119-23.
33. Spector, A.A., *Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain*. J Mol Neurosci, 2001. 16(2-3): p. 159-65; discussion 215-21.
34. Rapoport, S.I., *In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling*. J Mol Neurosci, 2001. 16(2-3): p. 243-261.
35. Ruggiero, F.M., et al., *Effect of aging and acetyl-L-carnitine on the lipid composition of rat plasma and erythrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. 170(2): p. 621-6.
36. Engler, M.M., M.B. Engler, and H. Nguyen, *Age-related changes in plasma and tissue fatty acid composition in Fischer 344 rats*. Biochem Mol Biol Int, 1998. 46(6): p. 1117-26.
37. Gao, F., et al., *Aging decreases rate of docosahexaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified alpha-linolenic acid by rat liver*. Age (Dordr), 2013. 35(3): p. 597-608.
38. de Groot, R.H., et al., *Age dependence of plasma phospholipid fatty acid levels: potential role of linoleic acid in the age-associated increase in docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid concentrations*. Br J Nutr, 2009. 102(7): p. 1058-64.
39. Fortier, M., et al., *Higher plasma n-3 fatty acid status in the moderately healthy elderly in southern Quebec: higher fish intake or aging-related change in n-3 fatty acid metabolism?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. 82(4-6): p. 277-80.
40. Otsuka, R., et al., *Higher serum EPA or DHA, and lower ARA compositions with age independent fatty acid intake in Japanese aged 40 to 79*. Lipids, 2013. 48(7): p. 719-27.
41. Plourde, M., et al., *Plasma incorporation, apparent retroconversion and beta-oxidation of 13C-docosahexaenoic acid in the elderly*. Nutr Metab (Lond), 2011. 8: p. 5.
42. Sands, S.A., et al., *The impact of age, body mass index, and fish intake on the EPA and DHA content of human erythrocytes*. Lipids, 2005. 40(4): p. 343-7.
43. Itomura, M., et al., *Factors influencing EPA+DHA levels in red blood cells in Japan*. In Vivo, 2008. 22(1): p. 131-5.
44. Christie, W.W., *Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection*. J Lipid Res, 1985. 26(4): p. 507-12.
45. Illicheta de Boschero, M.G., et al., *Alternative pathways for phospholipid synthesis in different brain areas during aging*. Experimental Gerontology, 2000. 35: p. 653-668.
46. Giusto, N.M., et al., *Age-Associated Changes in Central Nervous System Glycerolipid Composition and Metabolism*. Neurochemical Research, 2002. 27(11): p. 1513-1523.

47. Lopez, G.H., et al., *Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995. 112(2): p. 331-43.
48. McNamara, R.K., et al., *The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearyl-CoA desaturase activity*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008. 78(4-5): p. 293-304.
49. Kuo, Y.T., et al., *The combined effects on neuronal activation and blood-brain barrier permeability of time and n-3 polyunsaturated fatty acids in mice, as measured in vivo using MEMRI*. *Neuroimage*, 2010. 50(4): p. 1384-91.
50. Yehuda, S., S. Rabinovitz, and D.I. Mostofsky, *Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging*. *Neurobiol Aging*, 2005. 26 Suppl 1: p. 98-102.
51. Polozova, A. and N. Salem, Jr., *Role of liver and plasma lipoproteins in selective transport of n-3 fatty acids to tissues: a comparative study of 14C-DHA and 3H-oleic acid tracers*. *J Mol Neurosci*, 2007. 33(1): p. 56-66.
52. Rapoport, S.I., E. Ramadan, and M. Basselin, *Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011. 96(1-4): p. 109-13.
53. Cunnane, S.C., et al., *Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2012. 29(3): p. 691-7.
54. Vinot, N., et al., *Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate*. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e20491.
55. Lim, S.Y. and H. Suzuki, *Effect of dietary docosahexaenoic acid and phosphatidylcholine on maze behavior and fatty acid composition of plasma and brain lipids in mice*. *Int J Vitam Nutr Res*, 2000. 70(5): p. 251-9.
56. Guillou, H., et al., *The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice*. *Prog Lipid Res*, 2010. 49(2): p. 186-99.
57. Christiansen, E.N., et al., *Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1082(1): p. 57-62.
58. Lim, S.-Y. and H. Suzuki, *Changes in Maze Behavior of Mice Occur after Sufficient Accumulation of Docosahexaenoic Acid in Brain*. *J. Nutr.*, 2001. 131: p. 319-324.
59. Wainwright, P.E., et al., *Effects of prenatal ethanol and long-chain n-3 fatty acid supplementation on development in mice. 2. Fatty acid composition of brain membrane phospholipids*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1990. 14(3): p. 413-20.
60. Wainwright, P.E., et al., *Arachidonic Acid Offsets the Effects on Mouse Brain and Behavior of a Diet with a Low (n-6):(n-3) Ratio and Very High Levels of Docosahexaenoic Acid*. *J Nutr*, 1997. 127: p. 184-193.
61. Tan, Z.S., et al., *Red blood cell omega-3 fatty acid levels and markers of accelerated brain aging*. *Neurology*, 2012. 78(9): p. 658-64.
62. Lemaitre-Delaunay, D., et al., *Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine*. *J Lipid Res*, 1999. 40(10): p. 1867-74.
63. Sarkadi-Nagy, E., et al., *Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates*. *J Lipid Res*, 2004. 45(1): p. 71-80.

Table 1: Composition of experimental diets

	Control	EPA/DHA
Ingredients (% of total provided energy)		
Lipids	11.2	
SFA	1.6	1.0
MUFA	6.9	3.4
PUFA	2.7	6.8
Proteins	18.0	
Carbohydrates	69.8	
Energy (kJ/g of diet)	16.7	
Fatty acid composition (g/100g of diet)		
16:0	0.4	0.2
18:0	0.2	0.2
18:1n-9	3.0	1.6
18:2n-6	1.1	1.2
20:4n-6	0.0	0.1
22:5n-6	0.0	0.0
18:3n-3	0.1	0.1
20:5n-3	0.0	0.7
22:5n-3	0.0	0.1
22:6n-3	0.0	0.7
Total SFA	0.6	0.4
Total MUFA	3.0	1.6
Total PUFA	1.2	2.9
Total n-6 PUFA	1.1	1.3
Total n-3 PUFA	0.1	1.6
18:2n-6/18:3n-3	11	12

16:0: palmitic acid; 18:0: stearic acid; 18:1 (n-9): oleic acid; 18:2 (n-6): linoleic acid; 18:3 (n-3): α -linolenic acid; 20:4 (n-6): arachidonic acid; 20:5 (n-3): eicosapentaenoic acid; 22:5 (n-3) or (n-6): docosapentaenoic acid; 22:6 (n-3): docosahexaenoic acid ; SFA : saturated fatty acid ; MUFA : monounsaturated fatty acid ; PUFA : polyunsaturated fatty acid.

Table 2: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of plasmatic total lipids of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	21.10 ± 0.62	21.51 ± 0.32	23.85 ± 0.28	**
16:1 (n-7)	6.22 ± 0.30	4.95 ± 0.19 ##	3.87 ± 0.40	**
18:0	7.08 ± 0.58	8.55 ± 0.22	9.19 ± 0.61	
18:1(n-9)	27.97 ± 0.91	21.62 ± 0.71 ###	11.46 ± 1.08	***
18:1(n-7)	6.29 ± 0.26	5.01 ± 0.12 ###	3.45 ± 0.19	***
18:2(n-6)	10.75 ± 0.46	12.67 ± 0.29 ##	14.43 ± 0.69	*
18:3(n-3)	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.50 ± 0.04	**
20:4(n-6)	10.93 ± 0.69	15.43 ± 0.57 ###	8.66 ± 1.32	***
20:5(n-3)	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.01 ##	8.66 ± 0.03	***
22:5(n-6)	0.42 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.05	**
22:5(n-3)	0.19 ± 0.02	0.33 ± 0.02 ###	1.74 ± 0.02	***
22:6(n-3)	1.67 ± 0.07	2.06 ± 0.09 ##	8.29 ± 0.15	***
Total SFA	30.73 ± 1.14	32.80 ± 0.36	35.49 ± 0.69	**
Total MUFA	42.86 ± 1.28	34.01 ± 0.74 ###	20.98 ± 1.51	***
Total PUFA	25.96 ± 0.73	32.83 ± 0.63 ###	43.29 ± 0.95	***
Total n-6 PUFA	23.17 ± 0.68	29.62 ± 0.57 ###	24.07 ± 0.88	***
Total n-3 PUFA	2.39 ± 0.07	3.00 ± 0.10 ###	19.18 ± 0.10	***
n-6 PUFA / n-3 PUFA	9.69 ± 0.26	9.87 ± 0.26	1.25 ± 0.08	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; *: $p < 0.025$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

16:0: palmitic acid; 16:1 (n-7): palmitoleic acid; 18:0: stearic acid; 18:1 (n-7): *trans*-vaccenic acid; 18:1 (n-9): oleic acid; 18:2 (n-6): linoleic acid; 18:3 (n-3): α -linolenic acid; 20:4 (n-6): arachidonic acid; 20:5 (n-3): eicosapentaenoic acid; 22:5 (n-3) or (n-6): docosapentaenoic acid; 22:6 (n-3): docosahexaenoic acid.

Table 3: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of red blood cells phosphatidylethanolamine (PE) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	9.5 ± 0.97	8.34 ± 0.51	7.62 ± 0.74	
16:1 (n-7)	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.28 ± 0.06	
18:0	5.23 ± 1.27	4.41 ± 0.54	4.88 ± 0.46	
18:1(n-9)	11.57 ± 0.74	10.73 ± 0.61	8.53 ± 0.65	*
18:1(n-7)	3.81 ± 0.14	4.32 ± 0.62	3.08 ± 0.23	
18:2(n-6)	2.41 ± 0.12	2.51 ± 0.15	3.25 ± 0.24	*
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	37.92 ± 1.65	37.17 ± 1.38	27.96 ± 1.29	***
20:5(n-3)	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02	7.56 ± 0.46	***
22:5(n-6)	1.32 ± 0.07	1.00 ± 0.08	0.19 ± 0.02	***
22:5(n-3)	2.32 ± 0.15	3.32 ± 0.18	8.31 ± 0.47	***
22:6(n-3)	3.52 ± 0.18	3.72 ± 0.22	9.74 ± 0.51	***
Total SFA	23.01 ± 1.04	23.59 ± 1.12	24.63 ± 2.40	
Total MUFA	22.23 ± 1.20	22.21 ± 0.8	15.87 ± 0.94	***
Total PUFA	54.03 ± 2.02	53.44 ± 1.81	58.48 ± 2.29	
Total n-6 PUFA	47.68 ± 1.79	46.01 ± 1.5	32.63 ± 1.14	***
Total n-3 PUFA	6.09 ± 0.33	7.28 ± 0.37	25.65 ± 1.34	***
n-6 PUFA/n-3 PUFA	7.83 ± 0.33	6.32 ± 0.18	1.27 ± 0.04	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; *: $p < 0.025$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 4: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of red blood cells phosphatidylcholine (PC) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	41.95 ± 0.94	41.37 ± 0.72	44.81 ± 0.69	**
16:1 (n-7)	1.16 ± 0.09	0.87 ± 0.04 ##	0.79 ± 0.08	
18:0	11.76 ± 0.49	14.18 ± 0.34 ##	13.07 ± 0.32	
18:1(n-9)	10.27 ± 0.39	9.04 ± 0.24 #	8.52 ± 0.47	
18:1(n-7)	6.33 ± 0.21	5.42 ± 0.22 #	4.99 ± 0.19	
18:2(n-6)	9.94 ± 0.42	9.42 ± 0.46	11.59 ± 0.47	**
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	11.58 ± 1.13	13.57 ± 0.75	6.01 ± 0.24	***
20:5(n-3)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	2.90 ± 0.23	***
22:5(n-6)	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.04 ± 0.01	***
22:5(n-3)	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.01 ###	0.41 ± 0.02	***
22:6(n-3)	1.15 ± 0.12	1.44 ± 0.11	2.24 ± 0.17	**
Total SFA	55.52 ± 0.84	57.02 ± 0.78	59.95 ± 0.67	*
Total MUFA	19.40 ± 0.65	16.54 ± 0.40 ##	15.61 ± 0.53	
Total PUFA	24.58 ± 1.25	26.00 ± 0.65	24.11 ± 0.65	
Total n-6 PUFA	22.99 ± 1.15	24.14 ± 0.58	18.45 ± 0.50	***
Total n-3 PUFA	1.39 ± 0.11	1.78 ± 0.12	5.64 ± 0.39	***
n-6 PUFA/n-3 PUFA	16.54 ± 0.87	13.56 ± 0.79	3.27 ± 0.21	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

#: $p < 0.025$; ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; *: $p < 0.025$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 5: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of hippocampal phosphatidylethanolamine (PE) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	5.83 ± 0.21	5.98 ± 0.15	6.20 ± 0.17	
16:1 (n-7)	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.00 ###	0.30 ± 0.02	***
18:0	18.44 ± 0.44	18.14 ± 0.36	17.51 ± 0.43	
18:1(n-9)	11.47 ± 0.35	12.50 ± 0.23 #	13.91 ± 0.47	*
18:1(n-7)	1.91 ± 0.08	2.13 ± 0.06	2.13 ± 0.09	
18:2(n-6)	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.27 ± 0.01	***
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	13.98 ± 0.25	13.38 ± 0.12	11.20 ± 0.27	***
20:5(n-3)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.01	***
22:5(n-6)	1.01 ± 0.13	0.99 ± 0.06	0.26 ± 0.02	***
22:5(n-3)	0.13 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.82 ± 0.03	***
22:6(n-3)	17.07 ± 0.58	15.66 ± 0.41	19.06 ± 0.71	***
Total SFA	39.57 ± 0.58	38.38 ± 0.44	37.66 ± 0.46	
Total MUFA	21.56 ± 0.69	24.64 ± 0.36 ###	25.73 ± 0.73	
Total PUFA	38.49 ± 0.97	36.67 ± 0.60	36.19 ± 0.98	
Total n-6 PUFA	21.06 ± 0.38	20.55 ± 0.26	15.80 ± 0.31	***
Total n-3 PUFA	17.22 ± 0.59	15.85 ± 0.41	20.14 ± 0.72	***
n-6 PUFA/n-3 PUFA	1.22 ± 0.02	1.30 ± 0.03	0.78 ± 0.02	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

#: $p < 0.025$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; *: $p < 0.025$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 6: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of hippocampal phosphatidylcholine (PC) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	Control	EPA/DHA
16:0	42.10 ± 0.73	41.68 ± 0.63	42.45 ± 0.32	
16:1 (n-7)	0.38 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.49 ± 0.02	*
18:0	12.78 ± 0.21	12.97 ± 0.17	12.74 ± 0.17	
18:1(n-9)	21.29 ± 0.34	22.79 ± 0.40	23.76 ± 0.38	##
18:1(n-7)	5.98 ± 0.07	5.97 ± 0.11	5.41 ± 0.04	***
18:2(n-6)	0.36 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.57 ± 0.03	**
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	9.06 ± 0.40	8.06 ± 0.32	6.53 ± 0.29	**
20:5(n-3)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.13 ± 0.01	***
22:5(n-6)	0.36 ± 0.04	0.32 ± 0.06	0.17 ± 0.04	
22:5(n-3)	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.19 ± 0.01	***
22:6(n-3)	3.28 ± 0.20	2.69 ± 0.16	3.26 ± 0.20	# *
Total SFA	56.01 ± 0.55	55.89 ± 0.53	56.43 ± 0.37	
Total MUFA	29.37 ± 0.42	31.16 ± 0.49	31.47 ± 0.42	##
Total PUFA	14.43 ± 0.67	12.78 ± 0.60	11.90 ± 0.57	
Total n-6 PUFA	10.91 ± 0.47	9.83 ± 0.41	8.11 ± 0.35	*
Total n-3 PUFA	3.35 ± 0.20	2.79 ± 0.16	3.59 ± 0.22	# **
n-6 PUFA/n-3 PUFA	3.26 ± 0.07	3.52 ± 0.07	2.26 ± 0.06	## ***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

#: $p < 0.025$; ##: $p < 0.01$ vs Adult control; *: $p < 0.025$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 7: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of striatal phosphatidylethanolamine (PE) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	4.92 ± 0.35	4.89 ± 0.10	4.85 ± 0.12	
16:1 (n-7)	0.24 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.02	
18:0	14.99 ± 0.45	13.97 ± 0.41	14.29 ± 0.50	
18:1(n-9)	15.70 ± 0.32	17.00 ± 0.20 ##	19.09 ± 0.43 ***	
18:1(n-7)	3.16 ± 0.09	3.77 ± 0.09 ###	3.85 ± 0.10	
18:2(n-6)	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.02 **	
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	10.61 ± 0.22	10.19 ± 0.18	7.85 ± 0.17 ***	
20:5(n-3)	ND	ND	0.15 ± 0.01 ***	
22:5(n-6)	0.59 ± 0.03	0.46 ± 0.02 ##	0.15 ± 0.01 ***	
22:5(n-3)	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01 ###	0.72 ± 0.02 ***	
22:6(n-3)	12.32 ± 0.46	10.71 ± 0.37 #	12.75 ± 0.45 **	
Total SFA	35.61 ± 0.48	32.49 ± 0.44 ###	32.34 ± 0.34	
Total MUFA	34.36 ± 0.84	39.53 ± 0.60 ###	41.32 ± 0.61	
Total PUFA	29.57 ± 0.69	27.32 ± 0.56 #	25.74 ± 0.68	
Total n-6 PUFA	16.79 ± 0.27	16.07 ± 0.22	11.86 ± 0.23 ***	
Total n-3 PUFA	12.48 ± 0.46	10.94 ± 0.38 #	13.64 ± 0.47 ***	
n-6 PUFA/n-3 PUFA	1.34 ± 0.03	1.46 ± 0.04	0.87 ± 0.02 ***	

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

#: $p < 0.025$; ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; *: $p < 0.025$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 8: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of striatal phosphatidylcholine (PC) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	Control	EPA/DHA
16:0	34.22 ± 0.55	32.57 ± 0.74	34.41 ± 0.45	
16:1 (n-7)	0.47 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.61 ± 0.02	**
18:0	15.21 ± 0.18	15.99 ± 0.35	15.32 ± 0.20	
18:1(n-9)	24.51 ± 0.54	27.02 ± 0.38 ##	27.52 ± 0.28	***
18:1(n-7)	7.10 ± 0.11	7.42 ± 0.09	6.79 ± 0.09	***
18:2(n-6)	0.49 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.69 ± 0.02	**
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	6.42 ± 0.34	5.28 ± 0.41	4.24 ± 0.21	
20:5(n-3)	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.01	***
22:5(n-6)	0.25 ± 0.05	0.12 ± 0.02 #	0.03 ± 0.01	***
22:5(n-3)	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.23 ± 0.02	***
22:6(n-3)	3.66 ± 0.19	2.60 ± 0.28 ##	3.07 ± 0.26	
Total SFA	51.43 ± 0.54	50.74 ± 0.60	51.81 ± 0.41	
Total MUFA	35.56 ± 0.71	39.08 ± 0.41 ###	38.62 ± 0.46	
Total PUFA	12.45 ± 0.56	9.87 ± 0.79 #	9.30 ± 0.51	
Total n-6 PUFA	8.27 ± 0.38	6.94 ± 0.50	5.74 ± 0.24	
Total n-3 PUFA	3.87 ± 0.21	2.72 ± 0.29 ##	3.38 ± 0.28	
n-6 PUFA/n-3 PUFA	2.14 ± 0.08	2.55 ± 0.18 #	1.69 ± 0.09	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

#: $p < 0.025$; ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ vs Adult control; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 9: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of cortical phosphatidylethanolamine (PE) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	6.57 ± 0.20	6.87 ± 0.31	6.69 ± 0.18	
16:1 (n-7)	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.04	
18:0	22.99 ± 0.52	23.75 ± 0.58	21.82 ± 0.42	
18:1(n-9)	8.34 ± 0.19	8.11 ± 0.60	9.23 ± 0.55	
18:1(n-7)	1.76 ± 0.08	1.75 ± 0.10	1.62 ± 0.09	
18:2(n-6)	0.28 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.45 ± 0.12	
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	14.66 ± 0.58	14.54 ± 0.45	11.55 ± 0.47	***
20:5(n-3)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.24 ± 0.01	***
22:5(n-6)	1.28 ± 0.05	1.18 ± 0.10	0.29 ± 0.02	***
22:5(n-3)	0.15 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.94 ± 0.05	***
22:6(n-3)	20.36 ± 0.52	20.52 ± 0.77	26.31 ± 0.97	***
Total SFA	41.76 ± 0.42	42.29 ± 1.12	40.23 ± 0.68	
Total MUFA	14.60 ± 0.56	14.10 ± 0.70	15.61 ± 1.06	
Total PUFA	43.29 ± 0.89	43.20 ± 1.14	43.86 ± 1.41	
Total n-6 PUFA	22.49 ± 0.58	22.12 ± 0.53	16.18 ± 0.49	***
Total n-3 PUFA	20.57 ± 0.52	20.79 ± 0.75	27.53 ± 1.01	***
n-6 PUFA/n-3 PUFA	1.10 ± 0.03	1.06 ± 0.03	0.59 ± 0.01	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

***: $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Table 10: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of cortical phosphatidylcholine (PC) of rats fed the control diet or the EPA/DHA supplemented diet.

Fatty acids	Adult		Aged	
	Control	Control	EPA/DHA	
16:0	45.60 ± 1.51	44.56 ± 1.98	44.12 ± 1.94	
16:1 (n-7)	0.54 ± 0.01	0.54 ± 0.03	0.59 ± 0.03	
18:0	11.70 ± 0.34	12.75 ± 0.49	12.39 ± 0.69	
18:1(n-9)	21.24 ± 0.43	20.75 ± 0.61	21.94 ± 0.60	
18:1(n-7)	5.88 ± 0.06	5.81 ± 0.09	5.24 ± 0.10	**
18:2(n-6)	0.55 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.85 ± 0.09	
18:3(n-3)	ND	ND	ND	
20:4(n-6)	6.70 ± 0.35	6.82 ± 0.60	5.74 ± 0.44	
20:5(n-3)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.01	***
22:5(n-6)	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.06 ± 0.01	***
22:5(n-3)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.02	***
22:6(n-3)	3.59 ± 0.23	3.90 ± 0.34	5.01 ± 0.55	
Total SFA	58.21 ± 1.15	58.30 ± 1.62	57.49 ± 1.23	
Total MUFA	29.06 ± 0.55	28.51 ± 0.70	29.19 ± 0.79	
Total PUFA	12.47 ± 0.69	12.92 ± 1.08	13.08 ± 1.09	
Total n-6 PUFA	8.71 ± 0.47	8.86 ± 0.75	7.65 ± 0.56	
Total n-3 PUFA	3.68 ± 0.24	3.98 ± 0.34	5.35 ± 0.58	
n-6 PUFA/n-3 PUFA	2.37 ± 0.05	2.23 ± 0.08	1.43 ± 0.11	***

Values are means ± SEM. Student's t-test was performed after Bonferroni correction for pairwise comparisons ($\alpha = 0.025$): Adult vs Aged control and Aged control vs Aged EPA/DHA.

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs Aged control.

ND: Not detected.

Figure 1:

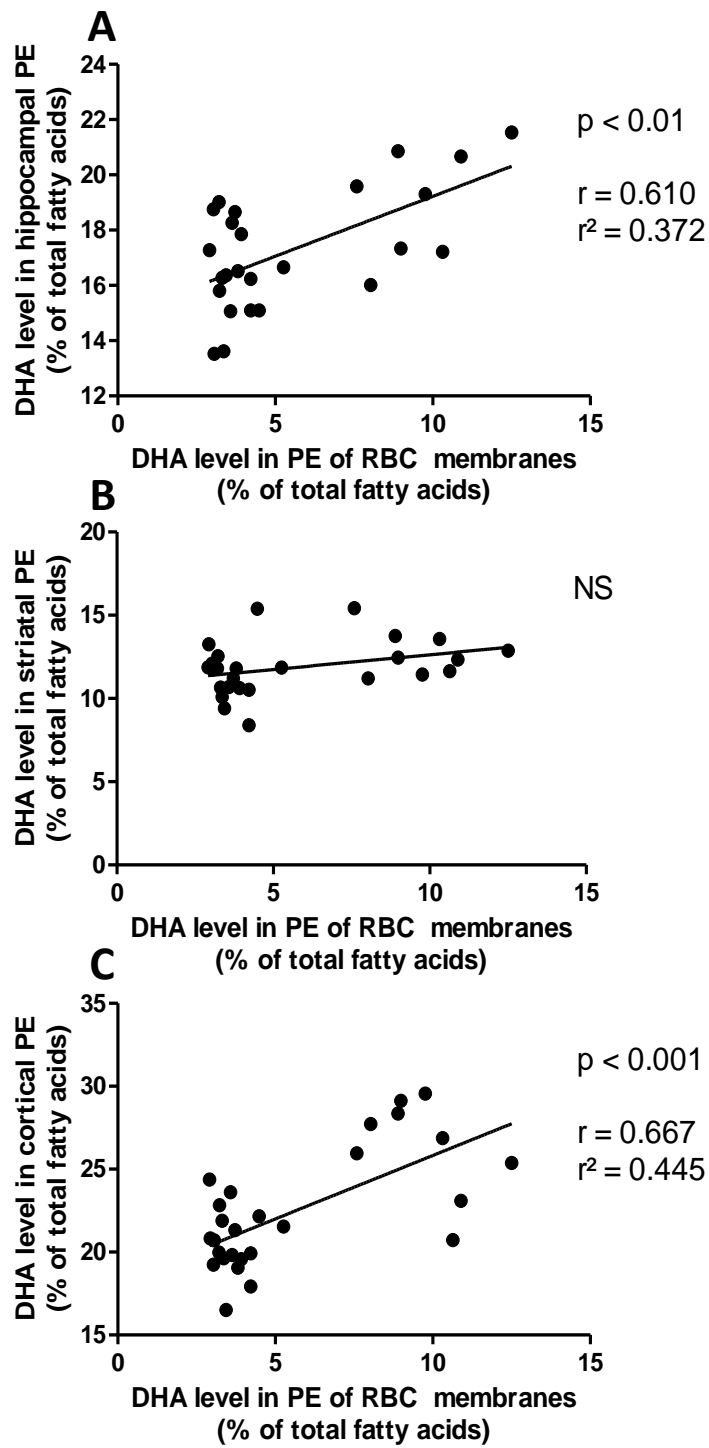


Figure 1: Effect of aging and EPA/DHA supplementation on DHA content in PE fractions from red blood cells and brain regions. Figures show the percentages of DHA anchored in PE from (A) hippocampus, (B) striatum and (C) prefrontal cortex correlate with the DHA levels in PE from red blood cells. *r*: Pearson correlation coefficient; DHA: docosahexaenoic acid; PE: phosphatidylethanolamine; RBC: red blood cells; NS: Not significant.

Chapitre 2: Effets de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A sur la mémoire spatiale au cours du vieillissement et implication des voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes

Introduction :

Le vieillissement cérébral et associé à de multiples altérations morphologiques et biochimiques conduisant progressivement à des déficits cognitifs et mnésiques (Lister et Barnes, 2009). Les données bibliographiques obtenues au cours de ces dernières décennies plaident en faveur d'un rôle essentiel joué par les AGPI-LC n-3 et plus particulièrement du DHA dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement (Denis et al. 2013). Un certain nombre de données de la littérature font état d'une diminution des contenus cérébraux en AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement (Dyall et al. 2007) associée à une diminution des performances mnésiques (Labrousse et al. 2012). Cependant, il a également été montré qu'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3 permettait de maintenir le contenu cérébral en AGPI-LC n-3 et de prévenir les déficits mnésiques liés à l'âge (Labrousse et al. 2012).

D'autre part, le vieillissement est également associé à une hyposignalisation de la voie des rétinoïdes, impliquée dans la mise en place des déficits mnésiques liés à l'âge (Etchamendy et al. 2001). L'acide rétinoïque (AR) est le métabolite actif de la vitamine A, jouant un rôle majeur dans la régulation de la plasticité synaptique et des processus mnésiques (Lane et Bailey 2005). De plus, une étude récente menée dans notre laboratoire a mis en évidence qu'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A donnée à partir de la mi-vie permettait de maintenir les performances mnésiques de rats âgés (Touyarot et al. 2013).

Plusieurs modes d'actions ont été rapportés afin d'expliquer les effets exercés par ces nutriments, parmi lesquels figure la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique (Lane et Bailey 2005, Su 2010). En effet, les AGPI n-3 et l'AR peuvent se

fixer à des récepteurs nucléaires tels que les PPAR, les RAR et les RXR. Le récepteur RXR, en tant que partenaire commun d'hétérodimérisation des RAR et des PPAR joue donc un rôle central dans la régulation des voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes. Ce mode d'action génique des AGPI n-3 et de l'AR met donc en évidence des relations étroites entre ces deux voies de signalisation (Germain et al. 2006).

En plus de cette activité transcriptionnelle, les AGPI n-3 et l'AR peuvent également moduler l'activité de voies de signalisations impliquées dans la modulation de la plasticité synaptique telles que la voie des MAPK ou des PI-3K (Gronemeyer et al. 2004).

L'ensemble de ces données indique l'existence de plusieurs niveaux d'interaction entre les voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes, suggérant que ces nutriments peuvent agir de manière complémentaire, voire synergique sur la modulation de la plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'examiner les effets de supplémentation nutritionnelles en AGPI n-3 et en vitamine A, données seules ou en combinaison sur les performances mnésiques évaluées dans le labyrinthe aquatique de Morris au cours du vieillissement. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation des performances mnésiques induite par les suppléments nutritionnelles, nous avons évalué l'expression des récepteurs nucléaires (RAR et RXR) ainsi que de plusieurs kinases impliquées dans la modulation de la plasticité synaptique (CAMKII, ERK1/2, CREB et AKT) au niveau de l'hippocampe.

Méthodologie :

Des rats mâles Wistar âgés de 13 mois ont été soumis à (i) un régime alimentaire à base d'huile de poisson, enrichi en EPA et en DHA (250 mg d'EPA et 250 mg de DHA par jour), ou (ii) un régime alimentaire supplémenté en vitamine A (45 UI/g) et équilibré en précurseurs AGPI n-3 mais dépourvu d'AGPI-LC n-3, ou (iii) un régime alimentaire supplémenté à la fois en EPA/DHA (250 mg d'EPA et 250 mg de DHA par jour) et en vitamine A (45 UI/g) durant une période de 5 mois. Parallèlement, des rats contrôles âgés de 3 semaines ou des rats âgés de 13 mois ont reçu un régime à base d'huile de colza, d'arachide et de tournesol, équilibré en vitamine A et en précurseurs AGPI n-3 mais dépourvu d'AGPI-LC n-3 durant la même période. Nous avons étudié les effets du vieillissement, ainsi que de la

supplémentation en EPA/DHA/et ou vitamine A sur les performances des mémoires spatiales de référence et de travail évaluées dans le labyrinthe aquatique de Morris. Ensuite, nous avons étudié l'impact des supplémentation en AGPI n-3 et en vitamine A sur la composition des membranes cérébrales en AG au sein de la PC hippocampique et sur les concentrations de rétinol sérique. Enfin, nous avons étudié l'impact des suppléments nutritionnelles sur les voies de signalisation cellulaires des AGPI n-3 et des rétinoïdes en mesurant par qPCR les niveau d'expression des ARNm des RAR et des RXR ainsi que plusieurs kinases pouvant être modulées par l'AR et les AGPI n-3 : CAMKII, ERK1/2, CREB et AKT. Ces résultats on été complétés par l'analyse des niveaux d'expression protéiques de ERK1/2 et AKT par western blot.

Principaux résultats :

Brièvement, nos résultats montrent que le vieillissement est associé à une diminution du contenu membranaire en AGPI-LC n-3 au niveau de la PC de l'hippocampe ainsi qu'à une diminution de concentration en rétinol sérique. Les suppléments nutritionnelles en EPA/DHA permettent d'augmenter les niveaux d'AGPI-LC n-3 dans l'hippocampe, ce qui nous permet de valider notre modèle nutritionnel. En revanche, les suppléments en vitamine A ne permettent pas de maintenir la concentration de rétinol sérique chez les rats âgés. De plus les performances de mémoire spatiale de référence et de mémoire spatiale de travail des rats âgés contrôles sont inférieures à celles des rats adultes contrôles. Ces déficits mnésiques sont associés à une diminution de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires RAR α , RAR β et RXR γ ainsi que de la CAMKII, ERK1/2, CREB et AKT. Les niveaux d'expression protéiques de ERK1/2 et AKT sont également diminués chez les rats âgés contrôles. Par ailleurs, la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA seule, permet de maintenir les performances de mémoire de travail chez les rats âgés pour un intervalle inter-essais de 30 s. D'autre part, la supplémentation nutritionnelle en vitamine A permet de maintenir partiellement les performances de mémoire de référence pour les 20 premières secondes de probe-test et est associée à un maintien de l'expression des ARNm des kinases CAMKII, ERK1/2 et CREB. Enfin, la supplémentation en EPA/DHA et en vitamine A permet de maintenir les performances de la mémoire spatiale de référence à un niveau équivalent à celui des rats adultes contrôles. Cette amélioration des performances est associée à une

augmentation de l'expression des ARNm de RXR γ , CAMKII, ERK1/2, CREB et AKT, ainsi que du niveau d'expression protéique de ERK1/2 et de AKT, effet qui n'est pas significatif chez les animaux supplémentés en vitamine A seule.

Conclusion :

Les résultats de cette étude, plaident en faveur d'une altération du métabolisme des lipides et de la vitamine A chez le rat âgé, associé à une hypoexpression des voies de signalisation cellulaires modulées par les AGPI n-3 et les rétinoïdes, ceci contribuant à la mise en place des déficits mnésiques liés à l'âge. De plus, nos travaux suggèrent que les suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et en vitamine A ont un effet bénéfique synergique sur l'expression du RXR γ et des kinases ERK et AKT, et contribuent au maintien des performances de la mémoire spatiale de référence au cours du vieillissement.

N-3 Polyunsaturated fatty acids and vitamin A have synergetic effects on spatial memory in aged rats

Létondor A.^{1,2,3}, Buaud B.³, Vaysse C.³, Djoukitch S.³, Herrouin C.³, Servat B.^{1,2,3}, Richard E.⁴, Layé S.^{1,2}, Pallet V.^{1,2}, Alfos S.^{1,2*}

¹Univ. Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

²INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

³ITERG, Institut des corps gras, 33600 Pessac, France.

⁴INSERM, Transfert de gènes à visée thérapeutique dans les cellules souches, U1035, 33000 Bordeaux, France.

*Corresponding author:

S. Alfos, Tel: +33 5 57 57 95 23, email: serge.alfos@enscbp.fr

This work was supported by Région Aquitaine, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt – ACTIA, Association Nationale de la Recherche et de la Technologie – ANRT, Société Lesieur and ONIDOL.

Abstract:

Several studies suggested that n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) and most particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) are critical for the maintenance of cognitive functions during aging. N-3 PUFAs may modulate brain functions, by binding to nuclear receptors (NRs), and notably the retinoid X receptors (RXRs). RXR is a master regulator that forms heterodimers with numerous NR such as the retinoic acid receptors (RARs) which are transcription factors that modulate the expression of genes involved in brain synaptic plasticity. Moreover, NRs can also activate cellular signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in response to their ligands, independently of their transcriptional effects, also leading to modulation of synaptic plasticity. Besides, several studies have reported that retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, improves memory performances of aged animals by modulating RARs and RXRs expression in the hippocampus, suggesting that n-3 PUFA and vitamin A may modulate synaptic plasticity processes in a similar way. Therefore, the aim of the present study was to evaluate in aged rats, the effect of nutritional supplementation with EPA/DHA and/or vitamin A on memory performances in the Morris water maze, and to investigate the molecular mechanisms underlying the memory performances by measuring the hippocampal expression of RARs, RXRs, and several protein kinase signaling pathways. Our main result show that EPA/DHA and vitamin A had beneficial synergetic effects on reference memory in aged rats, associated with a preservation of the expression of RXR γ , CAMKII, CREB, AKT and ERK1/2 MAPK in the hippocampus. This study provides a new combined nutritional strategy to delay brain aging.

Introduction:

Brain aging is associated with multiple morphological and biochemical changes leading to cognitive decline such as learning and memory impairments (Lister and Barnes 2009). Nutrition is one of the multiple environmental factors which contribute to successful aging and may modulate mental health (Dauncey 2009). Among the dietary nutrients most closely associated with optimal brain function, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFAs) are particularly important (Cunnane et al. 2009). Indeed, numerous studies highlighted the involvement of n-3 LC-PUFAs, and most particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), in the maintenance of cognitive functions during aging (Denis et al. 2013, Su 2010). The efficiency of n-3 LC-PUFA to act on brain functions could be modulated by the accretion level in the brain, closely related to the dietary intake. Indeed, it has been shown that a n-3 PUFA deprivation in rats results in reduced performance in learning and reference memory tasks evaluated in the Morris water maze, and that a n-3 PUFAs supplemented diet restored brain DHA levels and spatial memory performances according to the duration of the dietary supplementation (Moriguchi and Salem 2003, Moriguchi et al. 2000). Aging is associated with a decrease in brain n-3 LC-PUFA contents (Labrousse et al. 2012), and particularly an age-related decrease in DHA content in the hippocampus has been observed (Dyall et al. 2007, Favreliere et al. 2003). Moreover, several studies have shown that this decrease can be reversed by an n-3 LC-PUFA enriched diet, which can also improve reference and working memory performances in aged animals (Gamoh et al. 2001, Kelly et al. 2011, Labrousse et al. 2012, Alfos et al. unpublished data). Moreover, brain aging is also associated with an hyposignaling of retinoic acid pathway which could be involved in the age-related memory impairments (Enderlin et al. 1997a, Enderlin et al. 1997b, Mingaud et al. 2008). Retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, plays a key role in the regulation of synaptic plasticity and in learning and memory in adults (Lane and Bailey 2005). Indeed, it has been shown that the administration of RA improves reference and relational memory performances of aged animals by restoring retinoic acid nuclear receptor (RAR and RXR) expression and synaptic plasticity-associated marker expression in the hippocampus (Etchamendy et al. 2001). Moreover, we have recently shown that a mid-life vitamin A supplementation during 4 months prevents spatial memory decline in 17-month-old rats and improves the dendritic arborisation of newborn immature neurons (Touyarot et al. 2013). These effects of vitamin A supplementation in aged rats were

associated with a modulation of hippocampal CRABP-I expression which controls the intracellular availability of RA.

Among mechanisms by which n-3 LC-PUFA and retinoids may modulate brain functions, it has been described a transcriptional activity leading to the regulation of the expression of genes involved in synaptic plasticity (Lane and Bailey 2005, Su 2010). Indeed, DHA and RA can bind to nuclear receptors (NRs), such as the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), the retinoic acid receptors (RARs), and the retinoid X receptors (RXRs). These NRs belong to the NR superfamily and act as transcription factors, binding as homo- or heterodimer to DNA, on a response element upstream the promoter to allow gene transcription (Gronemeyer et al. 2004). PPARs are classically considered as fatty acid receptors and RARs and RXRs as retinoid receptors. However, several studies highlighted multiple levels of interaction between the fatty acid and the retinoid signaling pathways. On one hand, it has been shown that RXR is the common partner of heterodimerization of RARs and PPARs, suggesting that RXRs play a key role in both retinoid- and n-3 PUFA-mediated signaling pathways (van Neerven et al. 2008). On the other hand, *in vitro* studies have shown that fatty acids and particularly DHA can bind and activate RXR (de Urquiza et al. 2000, Lengqvist et al. 2004) and that RA can bind to the PPAR (Schug et al. 2007, Shaw et al. 2003), implying interactions at the nuclear level between DHA and RA for binding to their receptors.

In addition to the transcriptional activity of NRs, non genomic effects have also been described. Indeed, in response to n-3 PUFAs or RA treatments, several studies have reported an early stimulation of cellular signalisation pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK), regardless of the transcriptional activity mediated by the NRs (Al Tanoury et al. 2013, Canon et al. 2004, Rao et al. 2007). The MAPK signaling pathway is involved in the activation of transcription factors such as the cAMP response element binding protein (CREB), which plays a key role in synaptic plasticity processes and thus in learning and memory (Carlezon et al. 2005). It has been shown that the MAPK signaling pathway was impaired in the forebrain and hippocampus during aging (Simonyi et al. 2003, Williams et al. 2007).

Altogether these data indicate that there is a close relationship between the n-3 LC-PUFA and the retinoid signaling pathways with both intra- and extranuclear interactions, suggesting that these nutrients may act together to modulate synaptic plasticity processes and memory altered during aging.

The present study therefore evaluate in aged rats the potential synergetic effects of nutritional supplementation with n-3 PUFAs and vitamin A on memory performances and on the brain NRs and MAPK signaling pathway. In order to address this issue, spatial reference and working memories were assessed in the Morris water maze. To specify the molecular mechanisms mediated by the dietary supplementations on memory processes, we assessed the NR and MAPK signaling pathway activities, by measuring the mRNA expression of NRs (RXRs and RARs) and several kinases involved in MAPK signaling pathway and their associated protein levels in the hippocampus.

Material and methods

Animals and diets

The study was conducted according to the INRA Quality Reference System and to the directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Protocols were approved by the French Ministry for Higher Education and Research and the Animal Care and Use Committee of Bordeaux University.

3-week-old (adult) and 13-month-old (aged) male Wistar rats purchased from Janvier (France) were maintained under standard housing conditions in a temperature- ($22\pm 1^\circ\text{C}$) and humidity-controlled room (40%) with a 12 hour light/dark cycle. All animals were fed and given water *ad libitum*. After 1 week of acclimatization to the housing conditions with a standard chow, aged rats were randomly divided into 4 groups (n=9-10 per group): the first group received a control diet (aged control group), the second group received an EPA/DHA enriched diet (aged EPA/DHA group), the third received a vitamin A supplemented diet (aged Vit A group) and the fourth received an EPA/DHA + vitamin A enriched diet (aged EPA/DHA + Vit A group). The 3-week-old rats (n=10) received exclusively the control diet (adult control group). All the diets were given for 21 weeks.

Diets:

The control and vitamin A diets were free from any LC-PUFA and consisted of a mix of peanut, colza and sunflower oils (60/25/15, by weight) added to a standard laboratory chow (Control) or a vitamin A enriched chow (Vit A) (UPAE-INRA Jouy-en-Josas, France). The EPA/DHA supplemented diet was a mix of fish oils (EPAX® 4510 TG and 1050 TG; Polaris, France) and colza and sunflower oils (25/25/20/30, by weight) added to a standard laboratory chow (EPA/DHA) or a vitamin A enriched chow (EPA/DHA + Vit A). The composition of

diets is detailed in Table 1. The diets were prepared every two days and stored at 4°C until their use. They were given daily between 5:00 and 7:00 p.m

At the end of the 21-week feeding period, the adult rats (6-month-old) and the aged rats (18-month-old) were euthanized and then decapitated. The brain was quickly removed and the whole hippocampus was dissected out bilaterally and rapidly frozen, then stored at -80°C until further analysis.

Behavioral procedure:

Reference and working memories were tested in a Morris water maze (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (21-22°C) made opaque with non-toxic white paint. Before the start of testing, animals were habituated to the pool without any platform 60s/day for 2 days. The principle of this test is based on the capacity to memorize and to develop a spatial map of the extra-maze cues, to find an escape platform hidden 2 cm below the surface of the water. The distance swum, the speed and the latency to reach the platform were measured with a computerized tracking system (Videotrack, Viewpoint, Lyon, France). Reference and working memories were evaluated according to the protocol of Wainwright et al. (1999) modified as follow.

Spatial learning and reference memory (place version): On the first 9 days (learning stage), the rats were required to find the hidden platform, located in a fixed position, by using distal extra-maze cues. Rats were tested for one session per day composed of four consecutive trials. On each trial, the rats were placed, facing the wall, in one of the four quadrants in the tank, and allowed to swim for a maximum of 90 s. The start points were previously determined in a pseudo-random order for each day (not twice from the same quadrant and varying from day to day). Once the rat reaches the platform, it remained there for 30 s before being returned to a different start point in the pool. The distance swum to reach the platform should decrease over testing sessions (days) as the rats learn the location of the platform.

Twenty-four hours after the last training day (day 10), animals were placed once a time for 60 s in the pool without the platform (probe test). Reference memory performance was evaluated by the percentage of time spent in the quadrant where the platform was during the phase of acquisition (target quadrant). It is expected that if the rat has learned the location of the platform in relation to the extra-maze cues, its initial response on the probe test will be to swim directly to the target quadrant. Thus the distances swum and time spent in the target quadrant should be greater than that in the other quadrants and above chance level (25%).

Working-memory (matching to place version): After a two-day interval following the probe test, rats were tested in the matching to place version, with the maze set up as previously, but with the following variation in the procedure. In each testing session, the rats received a pair of trials in which the start position was varied pseudo randomly, but the platform remained in the same place. However, in contrast to the reference memory task, location of the platform is changed from day to day for 6 days. On the first three days, animals were tested with an inter-trial interval (ITI) of 30 s, and being allowed to swim for a maximum of 90 s on each trial and remaining on the platform for 30 s. Then, the ITI was 2 min on the last three days. In this version of the task, each of the testing session can be considered as a separate “problem” in which the first trial is a search trial and the second trial is a test trial which highlight the ability to remember the immediately preceding location of the platform in the first trial. A significantly shorter distance (and latency) swum to reach the platform on the second trial is considered as an evidence of working memory.

Cued learning version: At the end of the behavioral procedure, rats were tested another day (one session with four trials) on the cued version of the maze where the location of the platform is indicated by some prominent visual cues attached on the platform (intra-maze cue). Differences in performances on this task would be indicative of potential alterations in the sensory, motor or motivational attributes of the animals.

Quantification of mRNAs by real-time PCR:

Extraction and reverse transcription of total mRNAs. Half of the dissected hippocampi were homogenized in 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, France) and total RNAs were extracted according to the manufacturer’s instructions. The organic phase containing proteins was stored at -20°C for subsequent western blot analysis. The concentration of the purified RNA was measured by spectrophotometry at 260 nm using a Nanodrop ND-1000 (Labtech, France). Integrity of RNA samples was assessed using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France). RNAs were reverse transcribed in complementary DNA using Improm II reverse transcriptase (Promega, France). Briefly, 1 µg of total RNA was incubated 15 minutes at 37°C in the presence of RNasin (Promega, France) and DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Then, OligodT and random primers (Promega, France) were added to the mix and incubated at 75°C for 10 minutes. The reverse transcriptase reaction was performed at 42°C for 60 minutes in a final volume of 20 µl.

Real-time PCR: Real-time PCR were performed using a LigthCycler 480 system and the SYBR Green I Master kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Briefly, 0.5 μ M of each forward and reverse primer were mixed with 1X SYBR Green I Master solution and 6 μ l of cDNA. The forward and reverse primers sequences used for housekeeping gene, NR and cellular signaling involved genes are shown in table 2. cDNA amplification was performed in a final volume of 20 μ l according to the following program: initial denaturation step for 10 minutes at 95°C, 40 amplification cycles (10 seconds denaturation at 95°C, 6 seconds annealing at 62°C and 10 seconds extension at 72°C). Specificity of each primer pairs was checked by the melting curve analysis with a single melting peak after amplification used as criteria. Data analysis were performed using the LigthCycler 480 software (version 1.5) which calculates relative expression levels of target genes reported to the reference gene. In this study we used the β 2-microglobulin (BMG) housekeeping gene as the reference gene since its expression level was unaffected by our experimental conditions. In order to compensate possible different PCR efficiencies due to the different sequences and amplicon lengths between target and reference, the software provides a calibrator normalized ratio, including a PCR efficiency correction. In our case, the calibrator was chosen among the adult control rats. Therefore results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Western blot analysis:

Total proteins from half hippocampi were extracted from the Trizol fraction previously recovered from the RNA extraction step according to the manufacturer's instructions slightly modified by Simoes et al. (2013). Briefly, the tube containing the organic phase was centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and the remaining supernatant was removed and discarded. DNA was precipitated by addition of 100% ethanol and centrifuged at 2,000 g for 5 min at 4°C. Proteins in the phenol-ethanol supernatant were precipitated by addition of isopropanol and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Protein pellet was next washed 3 times with 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol. After the final wash and centrifugation at 7,500 g for 5 min at 4°C, proteins were precipitated by addition of 100% ethanol followed by a final centrifugation at 7,500 g for 5 min at 4°C. The protein pellet was solubilized by sonication in a 1:1 solution of 1% SDS and 8 M urea in Tris-HCl 1M, pH 8.0. The samples were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C, to sediment insoluble material and the supernatant containing the solubilized proteins was stored at -80°C. Protein concentration

was determined using the MicroBC Assay protein quantitation kit. Western blot analysis was performed as previously described by Boucheron et al. (2006) with slight modifications. Briefly, aliquots containing 40 µg of total proteins were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred to immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Blots were incubated overnight at 4°C with primary rabbit anti-actin (diluted 1:5000, Sigma, France), anti-AKT, anti-phospho-AKT, anti p44/42 MAPK (ERK1/2) and anti-phospho-p44/42 MAPK (phospho-ERK1/2), all diluted 1:1000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After washing, the blots were incubated with appropriated horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, Westgrove, PA, USA). Following washes, the bands were developed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA) and quantified by measuring chemiluminescence with an image analysis system (Syngene, Frederick, MD, USA). The relative levels of proteins in aged control and supplemented rats were expressed as a percentage of the same proteins in adult rats. The constant level of actin was verified and found to be identical in all groups (data not shown).

Measurement of serum retinol concentration:

Blood was collected at the sacrifice and spun at 1500 g for 15 minutes. The supernatant was removed and snap frozen on dry ice. Serum retinol was assessed by HPLC according to the method previously described by Biesalski et al. (1983).

Hippocampal phosphatidylcholine analysis:

Isolation of phosphatidylcholine (PC):

Total lipids from other half of hippocampi were extracted using a method adapted from Folch and collaborators (Folch et al. 1957) by 20 volumes of chloroform/methanol (2/1, v/v) per g of tissue. The extraction was carried out under agitation at room temperature. After 1 hour, 0.2 volume of KCl (0.8% in water, w/v) per volume of extraction mixture was added and samples were centrifuged to separate chloroform and hydroalcoholic phases. The hydroalcoholic phase was removed and the chloroform phase containing fatty acids was filtered with chloroform-methanol (2/1, v/v); then solvent was evaporated under vacuum, at room temperature with a rotary evaporator. The extracts were redissolved in chloroform and filtered to obtain a chloroform solution. The solvent was evaporated under nitrogen and dry extracts were finally dissolved again in chloroform-methanol (2/1, v/v).

PC contained in the Folch extracts obtained from hippocampus was isolated from others lipid classes by thin layer chromatography (TLC) using plates pre-coated with 0.35 mm silica gel 60 H (Merck, Fontenay-sous-Bois, France). The solvent system used for separation was a mixture of chloroform/methanol/acetic acid/distilled water (50/37.5/3.5/2, by vol.). After migration and revelation with 2,7-dichlorofluorescein (0.2% in ethanol, w/v), the silica gel area corresponding to PC was visualized under UV light (254 nm), removed from the TLC plate and transferred in a glass tube for preparation of the fatty acid methyl ester (FAME).

Preparation of FAME:

Total fatty acids of PC isolated from hippocampus were methylated and analyzed as previously described (Buaud et al. 2010). Briefly, total fatty acid chains of PC were transmethylated according to the method of Morrison and Smith (1964). 1 ml of boron trifluoride-methanol solution (14%, w/v, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) was added to the silica gel containing the phospholipid fraction in a glass tube maintained at 100°C for 20 minutes. Then, after addition of 1 ml of NaOH (5M), FAME were extracted three times with 2 ml of isooctane. Organic phases were concentrated, washed with 1 ml of water and stored at -20°C until gas chromatography (GC) analysis.

Analysis of FAME:

The analysis of FAME was performed with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a split injector. A fused silica capillary column (BPX 70, 60m x 0.25mm internal diameter, 0.25mm film; Phenomenex, Germany) was used with H₂ as the carrier gas (inlet pressure: 1 bar). The split ratio was 1:70. The column temperature was programmed to increase from 150 to 200°C at 1.5°C/min for 25 min, then from 200 to 225°C at 20°C/min and held at 225°C until completion of the analysis (20 min). The injection port and detector were maintained at 250 and 280°C, respectively. The GC peaks were integrated using a Chromjet SP4400 integration system (Spectra Physics, Irvine, CA, USA). Individual FAME were identified by comparing their retention times with those of authentic standards eluted in the same conditions (Sigma Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France). Results are expressed as a percentage of total fatty acids.

Statistical analysis:

Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (mean \pm SEM). Statistical analyses were performed with StatView 5.0 software. Data were analyzed by a one-way ANOVA or repeated measures ANOVA (learning) followed by a Fischer PLSD *post-hoc* test; or a Student's t-test to compare with chance level and for working memory analysis.

Results:*Spatial learning and reference memory:*

Spatial learning and reference memory performances of rats were evaluated using the Morris water maze. In acquisition task, rats were trained over 9 days with 4 trials per day to find a submerged platform. The swimming speed during the acquisition was significantly different between aged and adult rats (data not shown). For this reason, we measured the mean distances swum to reach the platform over the nine days of training (Figure 1A). Distances to reach the escape platform decreased along the days with a main effect of days ($F_{(8,304)}=35.863$; $p<0.0001$), meaning that all rats learned this task. However we did not observed any effect of groups on learning ($F_{(4,38)}=1.310$; $p=0.284$).

During the probe test, we measured the percentage of time spent in the target quadrant where the platform was removed. Analysis over the 60 seconds of the probe test did not revealed any effect of group (Figure 1B). However, when comparing memory performances with chance level (25%), only adult rats and aged rats supplemented with EPA/DHA + Vit A showed performances above the chance level (respectively: $t=7.472$, $p<0.0001$ and $t=5.501$, $p<0.001$). These results suggest better reference memory performances in aged rats supplemented with both EPA/DHA and vitamin A. Then, analyzing more precisely the first 20 seconds (Figure 1C) which is more relevant to avoid a possible extinction, there was a significant group effect on time spent in the target quadrant ($F_{(4,38)}=4.54$; $p<0.01$). Aged control rats and aged supplemented rats with only EPA/DHA or vitamin A presented lower memory performances than the adult control group. Moreover, the group supplemented with EPA/DHA + Vit A showed higher performance level than the group supplemented only with EPA/DHA ($p=0.026$) suggesting a potential synergetic effect of EPA/DHA and vitamin A. When comparing the time spent in the target quadrant over the first 20 seconds with the chance level, analysis revealed that only three groups of rats: adult control ($p<0.0001$), aged Vit A ($p<0.05$) and aged EPA/DHA + Vit A ($p<0.01$) remember the location of the hidden platform.

Spatial working memory:

In the matching-to-place version of the Morris water maze, rats need to remember each day the location of the platform (test trial, T2) learned at a previous trial that occurred 30 seconds or 2 minutes before (search trial, T1). For an ITI of 30 seconds (Figure 2A), all groups displayed similar performances at the search trial and at the test trial with a main effect of the trial ($F_{(1, 38)}=19.44$; $p<0.0001$), indicating that they remembered the location of the hidden platform learned at the previous trial. When comparing the first with the second trial, adult control and aged rats supplemented with EPA/DHA presented distances swum during the test trial significantly shorter than in the first trial ($p=0.005$ and $p=0.044$ respectively), revealing better working memory performances in aged rats supplemented with EPA/DHA. When the ITI was 2 minutes (Figure 2B), the effect observed with an ITI of 30 seconds, was alleviated. There was no more global trial effect and only the adult control group exhibited distances swum during the test trial shorter than the search trial indicating that adult rats remembered the location of the platform ($p=0.023$).

Cued learning:

In order to detect possible visual or motor affection, rats were tested in the cued version of Morris water maze. Distances swum to find the visible platform were similar for the five different groups indicating no differences in physical capabilities (data not shown).

Nutritional status of the rats:

Serum retinol concentration:

In order to assess the vitamin A status of aged rats and the impact of vitamin A supplementation, analysis of serum retinol concentrations were performed (Figure 3). Our results showed a significant difference of retinol levels between groups ($F_{(4,38)}=20.76$; $p<0.0001$). Indeed, *post-hoc* analysis revealed that control group of aged rats presented lower levels of serum retinol compared to the adult control group (-32%, $p<0.0001$). This reduction was not alleviated by neither vitamin A nor EPA/DHA supplementations nor the combined supplementation, (respectively: -29%, $p<0.0001$; -41%, $p<0.0001$ and -46%, $p<0.0001$). Interestingly, rats which received the EPA/DHA + Vit A diet displayed lower levels of retinol than aged control rats ($p=0.024$) and aged Vit A rats ($p=0.01$). The EPA/DHA group presented an intermediate level of serum retinol and differed only from the adult rats.

Lipid status in the hippocampus:

In order to assess the lipid status of aged rats and the impact of n-3 LC-PUFA supplementation, fatty acid composition of the hippocampal PC, which is the most abundant membrane phospholipid class in this brain region (Dyall et al. 2007), was analyzed and results are reported in table 3. As regards the effect of age, the main variations measured were a reduction in total n-3 LC-PUFAs in the aged control group (-16%; $p < 0.05$), due to a decrease in DHA level (-17%; $p < 0.05$) and leading to a slight elevation of the n-6 PUFA/n-3 PUFA ratio (+8%, $p < 0.05$) compared to the adult control group. Furthermore, our results showed a higher level of total monounsaturated fatty acids (MUFAs) in aged control rats compared to adult control rats (+6%; $p < 0.05$).

Regarding the dietary supplementation effects, we measured a diet-related accretion in n-3 LC-PUFAs with an increase in DHA levels in aged EPA/DHA and in aged EPA/DHA + Vit A supplemented rats (respectively +21%, $p < 0.05$ and +26% $p < 0.01$) compared to the aged control group. DHA level in VitA supplemented group was not different than that of adult control rats. The EPA and its derivative n-3docosapentaenoic acid (n-3 DPA) levels were also strongly increased in aged EPA/DHA and in aged EPA/DHA + Vit A (EPA, respectively increased by 9.5, $p < 0.0001$ and 9, $p < 0.0001$; n-3 DPA, respectively increased by 2.5, $p < 0.0001$ and 2.6, $p < 0.0001$). In contrast to this n-3 PUFA accretion, the n-6 PUFAs as arachidonic acid (AA) and n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA) contents were reduced in aged rats supplemented with EPA/DHA or EPA/DHA + Vit A (AA, respectively -19%, $p < 0.01$ and -19%, $p < 0.01$; n-6 DPA, respectively -48%, $p < 0.05$ and -39%, $p < 0.0001$) excepted for the n-6 PUFA precursor linoleic acid (LA). Indeed LA contents increased in the aged EPA/DHA and EPA/DHA + Vit A groups (LA, respectively: +35%, $p < 0.01$ and +40%, $p < 0.0001$) compared to the aged control group. Thus, EPA/DHA and EPA/DHA + Vit A supplementations induced a significant decrease of the n-6 PUFA/n-3 PUFA ratio (respectively: -35%, $p < 0.0001$ and -37%, $p < 0.0001$).

mRNA expression in the hippocampus:

The mRNA expression of several PUFAs and retinoid NRs was quantified by real-time PCR in the hippocampus. Results summarized in figure 4 show a significant group effect only for RAR α , RXR β and RXR γ . Aging was associated with a decreased expression of RAR α (-17%; $F_{(4,37)}=3.29$; $p < 0.05$) and RXR β (-22%; $F_{(4,36)}=3.44$; $p < 0.05$) mRNA expression in the

hippocampus compared to the adult control animals. These mRNA levels were not modified with any dietary supplementations. For the RXR γ mRNA in the hippocampus, an hypo-expression was observed in the aged control group compared to the adult control group (-32%; $F_{(4,35)}=7.98$; $p<0.0001$), the EPA/DHA group and the Vit A group. However, the RXR γ mRNA level in the EPA/DHA + Vit A group presented an intermediate level ($p<0.05$ compared to the Vit A group).

The mRNA expression of a number of genes implicated in both PUFA and RA non genomic signaling pathways were also measured (figure 5). An aged-related hypo-expression was observed in the hippocampus of aged control rats for the mRNA levels of CAMKII (-21%; $F_{(4,37)}=6.602$; $p<0.001$), AKT (-21%; $F_{(4,37)}=3.35$; $p<0.05$) and MAPK as ERK1 (-19%; $F_{(4,37)}=3.228$; $p<0.05$), ERK2 (-21%; $F_{(4,37)}=2.668$; $p<0.05$) and CREB (-25%; $F_{(4,37)}=3.850$; $p<0.05$) compared to adult control rats. Interestingly, aged rats which received a vitamin A supplementation (Vit A and EPA/DHA + Vit A) exhibited mRNA levels not different from those of the adult controls, excepted for AKT where the Vit A group exhibited mRNA levels different from those of the adult control. Moreover mRNA level of ERK1 was significantly higher ($p<0.05$) only in the EPA/DHA + Vit A group compared to the aged control group.

Protein levels in the hippocampus:

Results of protein quantification are reported in figure 6. As for the mRNA levels, we measured a significant reduced level of AKT (-19%; $F_{(4,32)}=3.857$; $p<0.05$) and ERK1/2 (-30%, $F_{(4,32)}=4.639$; $p<0.01$) in aged control rats compared to the adult controls. However, the EPA/DHA + VitA supplemented rats presented a level of AKT not significantly different from adult controls rats and an intermediated level of ERK1/2, indicating a combined effect of EPA/DHA and vitamin A supplementations. As regard the phosphorylated forms of AKT and ERK1/2, there was no statistical difference in expression levels between groups.

Discussion:

Previous studies have demonstrated that n-3 PUFA or vitamin A dietary supplementations provided at mid-life could participate to the maintenance of cognitive functions in aged animals (Lim and Suzuki 2000, Touyarot et al. 2013). The beneficial effects observed on memory performances with these two nutrients may involve common mechanisms including maintenance of nuclear receptor (NR) expression and activation of the same cellular signaling pathways, suggesting that they could act in a synergetic manner. Several studies have indeed

demonstrated the beneficial effect of each of these two nutrients but none have taken into account the both together. Therefore, in the present study, the combined effect of n-3 PUFAs and vitamin A on memory performances and signaling pathways was evaluated for the first time in aged rats.

In order to assess the vitamin A status of the animals, we measured the retinol concentration in the serum. Aged rats exhibited a significant decrease in serum retinol concentration compared to adult rats, as previously described in animals (Feart et al. 2005, Touyarot et al. 2013, van der Loo et al. 2004) and elderly (Haller et al. 1996). This reduction could be explained by a loss, during aging, in the capacity to mobilize vitamin A from the liver and thereby to regulate serum retinol levels as it was previously described by Borel et al. (1998) and Azais-Braesco et al. (1995). Thus, these metabolic changes could explain that the vitamin A enriched diet failed to normalize the serum retinol level in aged rats. Moreover, similar results have already been observed in 13-month-old rats supplemented with 45 IU retinol/g of diet for 4 months (Touyarot et al. 2013).

We also measured fatty acid levels in the hippocampus, a brain region known to be involved in spatial learning and memory (Henke 2010), more precisely we analyzed the fatty acid profile in the hippocampal PC, which is the most abundant membrane phospholipid class in the hippocampus (Dyall et al. 2007) containing the highest proportion of the DHA (Sastry 1985). Our results revealed a significant decrease in DHA level in the hippocampus of aged control rats, compared to the adult control rats. These results are consistent with a previous study which reported a clear decrease in hippocampal DHA PC of 24-month-old rats compared to 3-month-old rats (Dyall et al. 2007). Aging was also associated with a significant increase in total MUFA levels as it was previously observed in the hippocampus and the cerebral cortex of 18-month-old rats (Favrelière et al. 2000).

The EPA/DHA enriched diet induced a strong increase in the n-3 LC-PUFA levels, including EPA, DHA and n-3 DPA, in the hippocampal membranes of EPA/DHA supplemented aged rats. This increase was in balance with the lower levels of n-6 LC-PUFAs leading to a decrease of the n-6 PUFA/n-3 PUFA ratio in the hippocampus. It is well known that fish oil diets containing n-3 LC-PUFAs reduce delta-6 and delta-5 desaturase activities leading to a decrease in n-6 LC-PUFAs (Christiansen et al. 1991). These data indicate that the age-related decrease in n-3 LC-PUFA levels in the hippocampal membranes can be reversed by the

EPA/DHA enriched diet as already reported in 21-month-old rats receiving a n-3 PUFA enriched diet for 3 months (Favreliere et al. 2003).

According to numerous data obtained in aged animals, we demonstrated a clear age-related impairment in hippocampus-dependent spatial reference memory and spatial working memory (Lister and Barnes 2009). These age-related memory impairments were associated with an hypoexpression of both retinoid and n-3 PUFA signaling pathways, with a reduced expression of RAR α , RXR β and RXR γ mRNA in aged control animals. These results are coherent with previous data obtained in 23-month-old mice, showing a reduced level of RXR β/γ mRNA expression in hippocampus and whole brain (Enderlin et al. 1997a), that was associated with a relational memory impairment (Etchamendy et al. 2001).

Furthermore, the down-regulation of NR expression is consistent with the decrease in serum retinol concentration observed in the aged rats. Indeed, it has been showed that the three RXR isotypes and RAR α 2, RAR β 2 and RAR γ 2 are autoregulated by the retinol concentrations in tissues (Balmer and Blomhoff 2002). Thus the decrease in serum retinol concentration could lead to a decrease in RA bioavailability in the brain, associated with a decrease in RAR and RXR expression in the hippocampus. In addition, it has been reported a decrease in independent phospholipase A2 (iPLA2) mRNA expression, involved in the release of DHA from membrane phospholipids, in the hippocampus of 24-month-old rats compared to 4-month-old rats (Aid and Bosetti 2007). This could induce a decrease in the content of cytoplasmic DHA which is involved in intracellular signaling pathways and notably activate the RXR (de Urquiza et al. 2000). The potential decrease in intracellular DHA bioavailability could lead to a disruption in RXR signaling pathway that can be reversed by an EPA/DHA enriched diet.

The RXR signaling pathway and mainly RXR γ seems to play a major role in memory processes. Indeed, using a microarray analysis approach, Blalock et al. (2003) have shown a down regulation of RXR γ mRNA level in hippocampal CA1 region of aged rats, associated with an age-dependant impairment in reference memory performances and in a novel object recognition task. In addition, these authors reported a strong correlation between memory performances and RXR γ mRNA expression in the hippocampus of aged animals, supporting the hypothesis that RXR γ plays a key role in learning and memory. Moreover, an *in-vitro* study showed that RXR activation induced by DHA treatment was associated with a stimulation of neuritogenesis in mice neuroblastoma cells (Calderon and Kim 2007),

demonstrating that RXR is involved in the modulation of synaptic plasticity. Furthermore, a recent study showed that pharmacological administration of 1 mg/kg of unesterified DHA improved the working memory of 5-month-old mice *via* the RXR γ activation (Wietrzych-Schindler et al. 2011). These data support the hypothesis that the age-related memory impairments observed in the present study may be closely linked to the disruption of retinoid and n-3 PUFA signaling pathway, involving notably the RXR γ .

In the present study we demonstrated a decrease in mRNA and protein levels of AKT and ERK1/2 which are kinases belonging to cellular signaling pathways and can be regulated by the retinoid as a result of the non genomic effect of this nutrient (Al Tanoury et al. 2013). An age-related decrease in AKT and ERK1/2 expression as already been observed in rodents. Indeed, Simonyi et al. (2003) reported a decrease in ERK2 mRNA expression in the hippocampus of 12-month-old rats compared to 3-month-old rats. Moreover a reduced AKT signaling pathway activation was observed in the hippocampus of 28-month-old rats compared to 4-month-old rats (Jackson et al. 2009) and in the hippocampus of a mice model of senescence-accelerated (Nie et al. 2009). These two signaling pathways are implicated in brain functions since AKT signaling pathway is involved in neuronal survival (Kaplan and Miller 2000) and ERK1/2 MAPK signaling pathway plays a role in hippocampus-dependant learning and memory, by inducing activation of transcription factor such as CREB (Xia and Storm 2012). Interestingly, in our study, CREB expression was also decreased in the hippocampus of aged control rats. While a persistent reduction in hippocampal CREB mRNA may have resulted in reduced CREB protein available for phosphorylation, further protein based studies would need to be performed to clarify the current findings. CREB is known to be involved in regulation of learning and memory processes (Carlezon et al. 2005), thus the concomitant decrease in CREB expression and in ERK1/2 MAPK signaling pathway in the hippocampus of aged rats could be responsible, in part, of the spatial memory impairments observed in the aged control rats. Furthermore, CAMKII mRNA expression which is an ubiquitous kinase in the brain, involved in the regulation of the strengthening synaptic transmission and therefore learning and memory processes (Lisman et al. 2002) was also decreased in aged rats. Since CAMKII mRNA expression is regulated by retinoic acid (Chen and Kelly 1996), this last result support the hypothesis of retinoid signaling pathway disruption in the aged brain that may be responsible in part of memory impairments by altering kinase signaling pathways.

As regard the diet-related effect on memory, our present study demonstrated for the first time a beneficial synergetic effect of EPA/DHA and Vitamin A supplementations on reference memory since only adult and aged EPA/DHA + Vit A supplemented rats exhibited performances above the chance level in the probe test over 60 seconds. In order to avoid an extinction effect due to a possible lack of interest related to the absence of the platform, we also performed analysis only over the first third of the probe test. In this case, we observed a stronger effect of this diet since only the aged EPA/DHA + Vit A supplemented rats exhibited similar performances to those of the adult control rats. The beneficial memory effect of this diet was associated with a partial maintenance of RXR γ mRNA expression in the hippocampus of aged rats. This result is in agreement with data supporting the major role played by RXR γ in memory processes since it was previously reported an impairment in working memory in RXR γ knock-out mice and wild-type adult mice injected with a specific RXR γ antagonist (Wietrych-Schindler et al. 2011, Wietrych et al. 2005). On one hand, as previously discussed, the increase in RXR γ mRNA expression could be due to an autoregulation mediated by the vitamin A supplementation (Balmer and Blomhoff 2002). On the other hand, a study performed in mouse neuroblastoma cells showed that the iPLA2 activity in nuclear membrane but not in cytosolic fractions was induced by a retinoic acid treatment (Farooqui et al. 2004). Since iPLA2 is involved in DHA release from the phospholipid membranes and that DHA is a RXR ligand, these data suggest therefore that the increase of cellular DHA bioavailability mediated by the combined effect of EPA/DHA and vitamin A could contribute to the maintenance of RXR γ signaling pathway in the aged brain.

In addition, aged rats receiving the vitamin A enriched diet displayed memory performances significantly above to the chance level, which confirms the beneficial effect of a long-period vitamin A supplementation on aged-related spatial reference memory deficits in rats (Touyarot et al. 2013) or relational memory deficits in mice (Mingaud et al. 2008). This beneficial effect of vitamin A supplementation on memory occurred in spite of the decrease in serum retinol concentration measured in aged vitamin A supplemented rats. This result supports the hypothesis that the newly-absorbed retinol could be used directly by target tissues such as the brain in order to cover RA needs by an *in-situ* synthesis, as it was suggested in previous studies (Ross et al. 2009, Touyarot et al. 2013). Moreover, the aged rats receiving the two vitamin A enriched diets exhibited higher ERK1/2, CREB, AKT and CAMKII mRNA levels in the hippocampus than the control or EPA/DHA aged rats, and close

to those measured in the adult control group. These kinases are involving in modulation of synaptic plasticity underlying learning and memory processes (Carlezon et al. 2005, Kaplan and Miller 2000, Lisman et al. 2002, Xia and Storm 2012) and could participate to the beneficial effect observed on reference memory in vitamin A supplemented rats. Since the mRNA expression of these different kinases was increased, it could be hypothesized that this transcriptional regulation of these cellular signaling pathways could be mediated by the retinoid as previously shown for CAMKII (Chen and Kelly 1996).

The single EPA/DHA supplementation was not able to prevent the age-related reference memory deficit, as it was already previously reported in studies performed with the same diet duration. Indeed studies have shown an enhancement of spatial reference memory performances in adult non-human primates receiving 6 mg EPA and 30 mg DHA per day (Vinot et al. 2011) and an enhancement of maze-learning ability in aged mice receiving 0.9 to 23.7 g of DHA/100g of fatty acids (Lim and Suzuki 2000). Nevertheless, our results highlighted a beneficial effect of n-3 PUFA supplementation on the working memory performances assessed over a short retention delay (ITI=30s). These results are in accordance with previous data obtained in our laboratory showing that 4 months EPA/DHA supplementation in 13-month-old rats prevented the age-related working memory deficits with an ITI of 30 s (Alfos et al. unpublished data). Interestingly, we demonstrated that the beneficial effect mediated by n-3 LC-PUFA supplementation remained limited since no memory improvement was observed in supplemented aged rats with an ITI longer than 30 seconds. There was no effect of the EPA/DHA supplemented diet on mRNA and protein levels measured in the hippocampus contrary to the effects observed with the diet enriched with vitamin A, suggesting that the EPA/DHA effect on working memory seems to be mediated at a molecular level by another signaling pathway.

Taken together, this study demonstrated an age-related impairment in reference and working memories, associated with an hypoexpression both of NRs belonging to the retinoid and n-3 PUFA pathways and of some kinases involved in the transduction of non genomic effects of these nutrients. Our results highlight for the first time a preventive synergetic effect of an EPA/DHA and vitamin A enriched diet on the age-related decline in reference memory performances associated with a preservation of the expression of RXR γ , CAMKII, CREB, AKT and ERK1/2 MAPK in the hippocampus. Altogether these data suggest that the beneficial effect of the diet on memory performances could be mediated, in part, by the

induction of RA and DHA signaling pathways involving both RXR γ and some protein kinase signaling pathways. Our findings provide new target in the framework of preventive dietary supplementation to delay the age-related impairments and demonstrated that combinations of dietary supplements need to be more fully evaluated to determine optimal strategies.

Table 1: Composition of experimental diets.

	Control	Vit A	EPA/DHA	EPA/DHA + Vit A
<u>Ingredients (% of total provided energy)</u>				
Lipids	11.2	11.2	11.2	11.2
Saturated	1.6	1.6	1.0	1.0
Monounsaturated	6.9	6.9	3.4	3.4
Polyunsaturated	2.7	2.7	6.8	6.8
Proteins	18.0	18.0	18.0	18.0
Carbohydrates	69.8	69.8	69.8	69.8
Energy (kJ/g of diet)	16.7	16.7	16.7	16.7
Vitamin A (UI/g of diet)	5.0	45	5.0	45
<u>Fatty acid composition (g/100g of diet)</u>				
16:0	0.4	0.4	0.2	0.2
18:0	0.2	0.2	0.2	0.2
18:1n-9	3.0	3.0	1.6	1.6
18:2n-6	1.1	1.1	1.2	1.2
20:4n-6	0.0	0.0	0.1	0.1
22:5n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
18:3n-3	0.1	0.1	0.1	0.1
20:5n-3	0.0	0.0	0.7	0.7
22:5n-3	0.0	0.0	0.1	0.1
22:6n-3	0.0	0.0	0.7	0.7
Total SFAs	0.6	0.6	0.4	0.4
Total MUFAs	3.0	3.0	1.6	1.6
Total PUFAs	1.2	1.2	2.9	2.9
Total n-6 PUFAs	1.1	1.1	1.3	1.3
Total n-3 PUFAs	0.1	0.1	1.6	1.6
18:2n-6/18:3n-3	11	11	12	12

16:0: palmitic acid; 18:0: stearic acid; 18:1 (n-9): oleic acid; 18:2 (n-6): linoleic acid; 20:4 (n-6): arachidonic acid; 22:5 (n-3) or (n-6): docosapentaenoic acid; 18:3 (n-3): α -linolenic acid;

20:5 (n-3): eicosapentaenoic acid; 22:6 (n-3): docosahexaenoic acid; SFA : saturated fatty acid ; MUFAs : monounsaturated fatty acids; PUFA : polyunsaturated fatty acids.

Table 2: Primers used for quantitative RT-PCR:

Gene name	Nucleotide sequence	Product length (bp)
BMG	F: 5' - GCCCAACTTCCTCAACTGCTACG - 3' R: 5' -GCATATACATCGGTCTCGGTGGG - 3'	180
RARα	F: 5' - GCCTCGATTCTACAAGCCTTGC - 3' R: 5' - GGATACTGCGTCGGAAGAAGC - 3'	107
RARβ	F: 5' - CAGCTGGGTAAATACACCACGAA - 3' R: 5' - GGGGTATACCTGGTACAAATTCTGA - 3'	227
RARγ	F: 5' - GCCCTAAGGCTTTATGCCCGG - 3' R: 5' - GCTCCCTTGGTGCTGATGCC - 3'	104
RXRα	F: 5' -GCTGGTGTCGAAGATGCGTGAC - 3' R:5' -GGGTACTTGTGTTTGCAGTACG - 3'	171
RXRβ	F: 5' - TGGGAACAGGGAGAATGTGG - 3' R: 5' - CTGGAAAGCGACTTTATGTGCAAG - 3'	129
RXRγ	F: 5' - GGAAAGACCTCATCTACACG - 3' R: 5' - CAGCTTCCCTCTTCATGCCC - 3'	123
ERK1	F: 5' -TCCCCTTGACCTGAGTGATGAG - 3' R: 5' -CCATTCCAGAACCGTCTACCAGA - 3'	102
ERK2	F: 5' -CGTCTCAGCTTACCCACTCTTGA - 3' R: 5' -TGCAGGAGAACTCTCTGGACTG - 3'	109
CREB	F: 5' - GTTCAAGCCCAGCCACAGATT - 3' R: 5' - GGTTACAGTGGGAGCAGATGAC - 3'	84
CAMKII	F: 5' -TGCACAGACAGGAGACCGTGGAC -3' R: 5' -GTTTCCTCCACTCTTCCCTCCGG - 3'	122
AKT	F: 5' -TGAGCGCGTGTTTTTCAGAGG - 3' R: 5' -CCTTGTCCAGCATGAGGTTCTC - 3'	131

Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers.

Table 3: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of hippocampal phosphatidylcholine of rats fed the control diet or a supplemented diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A).

Fattyacids	Adult		Aged		
	Control	Control	Vit A	EPA/DHA	EPA/DHA + Vit A
16:0	42.10 ± 0.73 ^a	41.68 ± 0.63 ^a	41.70 ± 0.53 ^a	42.45 ± 0.32 ^a	41.42 ± 0.82 ^a
16:1 (n-7)	0.38 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.01 ^b	0.44 ± 0.02 ^{bd}	0.49 ± 0.02 ^{cd}	0.50 ± 0.02 ^c
18:0	12.78 ± 0.21 ^a	12.97 ± 0.17 ^a	12.83 ± 0.15 ^a	12.74 ± 0.17 ^a	12.98 ± 0.37 ^a
18:1(n-9)	21.29 ± 0.34 ^a	22.79 ± 0.40 ^{bc}	22.43 ± 0.31 ^{ab}	23.76 ± 0.38 ^c	23.91 ± 0.41 ^c
18:1(n-7)	5.98 ± 0.07 ^a	5.97 ± 0.11 ^a	5.89 ± 0.10 ^a	5.41 ± 0.04 ^b	5.47 ± 0.17 ^b
18:2(n-6)	0.36 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.03 ^a	0.43 ± 0.02 ^a	0.57 ± 0.03 ^b	0.60 ± 0.04 ^b
18:3(n-3)	ND	ND	ND	ND	ND
20:4(n-6)	9.06 ± 0.40 ^a	8.06 ± 0.32 ^b	8.21 ± 0.27 ^{ab}	6.53 ± 0.29 ^c	6.54 ± 0.46 ^c
20:5(n-3)	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.02 ^b
22:5(n-6)	0.36 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.06 ^{ac}	0.41 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.04 ^b	0.19 ± 0.04 ^{bc}
22:5(n-3)	0.06 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.02 ^b
22:6(n-3)	3.28 ± 0.20 ^a	2.69 ± 0.16 ^b	2.84 ± 0.13 ^{ab}	3.26 ± 0.20 ^a	3.39 ± 0.21 ^a
Total SFAs	56.01 ± 0.55 ^a	55.89 ± 0.53 ^a	55.72 ± 0.49 ^a	56.43 ± 0.37 ^a	55.78 ± 0.36 ^a
Total MUFAs	29.37 ± 0.42 ^a	31.16 ± 0.49 ^b	30.76 ± 0.42 ^{ab}	31.47 ± 0.42 ^b	31.76 ± 0.61 ^b
Total PUFAs	14.43 ± 0.67 ^a	12.78 ± 0.60 ^{ab}	13.27 ± 0.46 ^{ab}	11.90 ± 0.57 ^b	12.20 ± 0.66 ^b
Total n-6 PUFAs	10.91 ± 0.47 ^a	9.83 ± 0.41 ^b	10.11 ± 0.33 ^{ab}	8.11 ± 0.35 ^c	8.27 ± 0.43 ^c
Total n-3 PUFAs	3.35 ± 0.20 ^{ac}	2.79 ± 0.16 ^b	2.93 ± 0.13 ^{ab}	3.59 ± 0.22 ^c	3.74 ± 0.24 ^c
n-6/n-3 PUFAs	3.26 ± 0.07 ^a	3.52 ± 0.07 ^b	3.45 ± 0.08 ^{ab}	2.26 ± 0.06 ^c	2.21 ± 0.08 ^c

Values are means ± SEM and were compared using one way ANOVA and the Fischer PLSD *post hoc* test. Values not sharing a common superscript within a row are significantly different ($p < 0.05$). ND: Not detected.

16:0: palmitic acid; 16:1 n-7: palmitoleic acid; 18:0: stearic acid; 18:1 (n-9): oleic acid; 18:1 n-7: *trans*-vaccenic acid; 18:2 (n-6): linoleic acid; 18:3 (n-3): α -linolenic acid; 20:4 (n-6): arachidonic acid; 20:5 (n-3): eicosapentaenoic acid; 22:5 (n-3) or (n-6): docosapentaenoic acid; 22:6 (n-3): docosahexaenoic acid; SFA : saturated fatty acid ; MUFA : monounsaturated fatty acid; PUFA : polyunsaturated fatty acid.

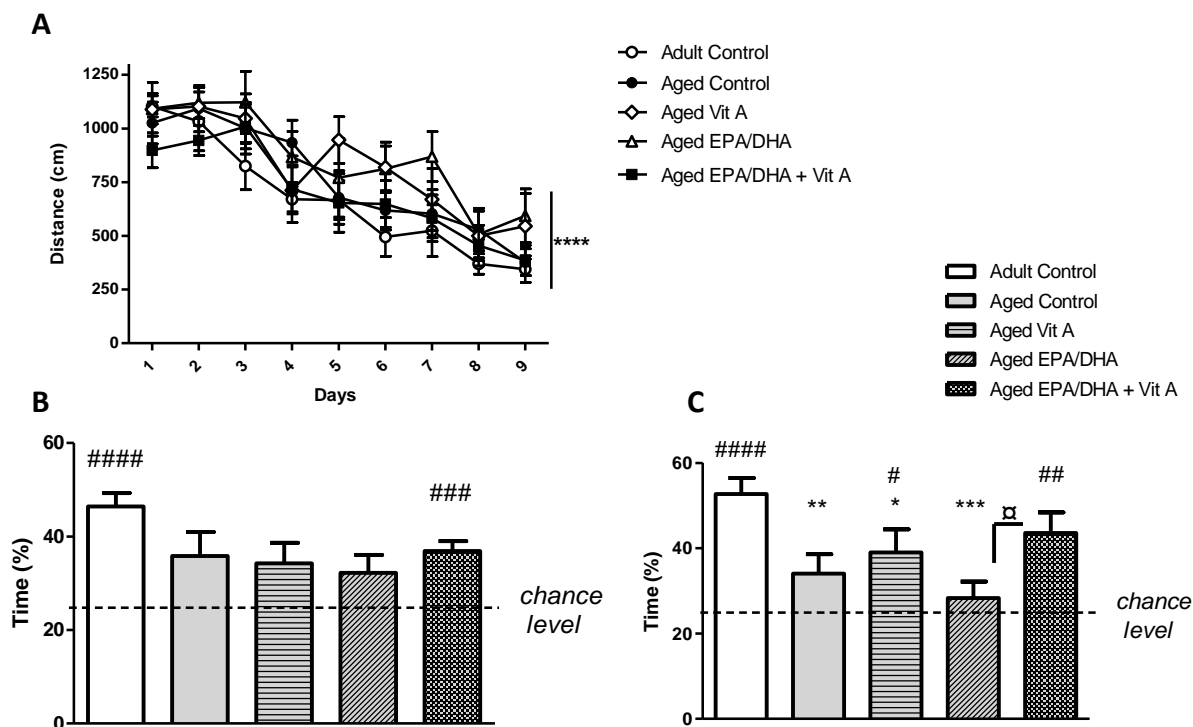


Figure 1:

Effect of age and diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A) on spatial learning and reference memory in the Morris water maze. Figures show (A) the mean distances swum during acquisition to reach a submerged platform located at the same position over 9 days with 4 trials per day and (B, C) percentage of time spent in the target quadrant with the platform removed in the probe test over (B) 60s or (C) 20s. Values are means \pm SEM, n=8-10 rats per group. Data were analyzed by (A) repeated measures ANOVA or (B,C) one way ANOVA followed by the Fischer PLSD *post-hoc* test: different from (A) Day 1 or (C) from Adult control: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ and from aged EPA/DHA: $\#p < 0.05$; or compared with chance level by a Student's one group t-test: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$.

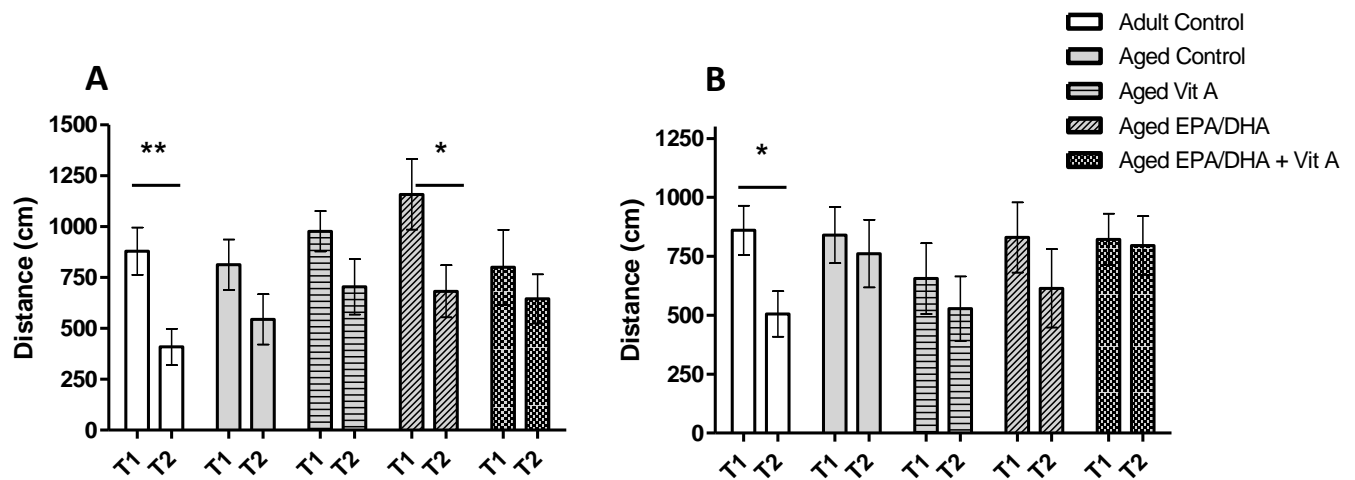


Figure 2:

Effect of age and diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A) on spatial working memory (matching to place version) in the Morris water maze. Figures show (A) the mean distances swum to reach a submerged platform over 3 days in the first trial (T1) followed by a second trial (T2) with an inter trial interval (ITI) =30s; (B) the mean distances swum to reach a submerged platform over 3 days in the T1 and T2 with an ITI=2min. The platform was moved to a different location each day. Values are means \pm SEM, n=8-10 rats per group. Data were analyzed by Student's unpaired t-test: different from T1: *p<0.05; **p<0.01.

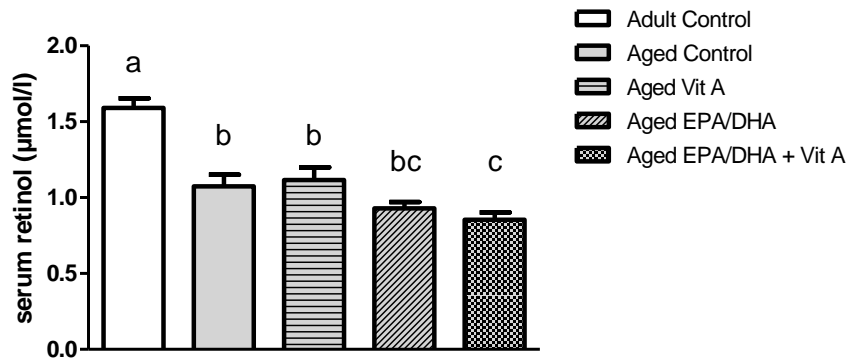


Figure 3:

Effect of age and diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A) on serum retinol levels. Values are means + SEM, n=8-10 rats per group. Data were analyzed by one way ANOVAs followed by the Fischer PLSD *post-hoc* test. Bars not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

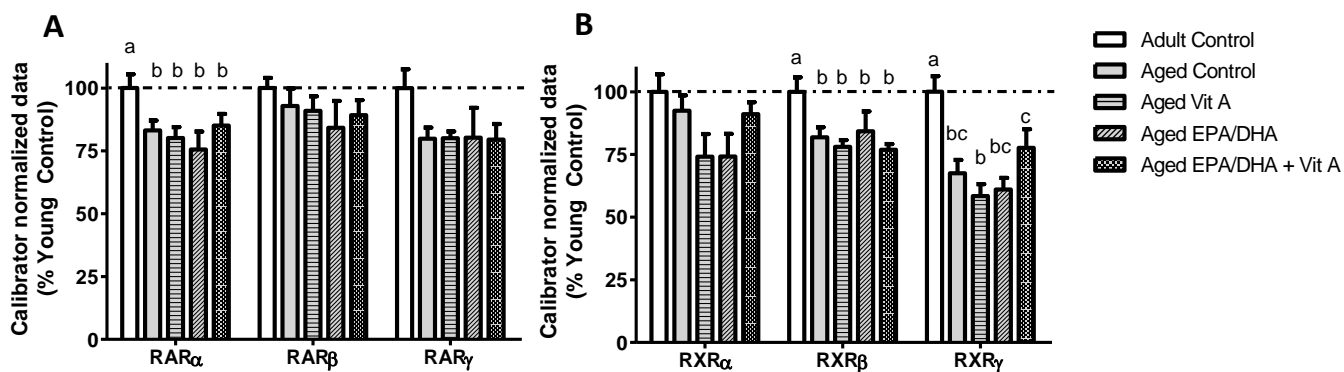


Figure 4:

Effect of age and diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A) on mRNA expression of RAR α , β and γ (A) and RXR α , β and γ (B). Target mRNAs are relative levels and are expressed as percentage of Adult control expression of target/reference ratio normalized by the calibrator. Values are means + SEM, n=8-10 rats per group. Data were analyzed by one way ANOVAs followed by the Fischer PLSD *post-hoc* test. Bars not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

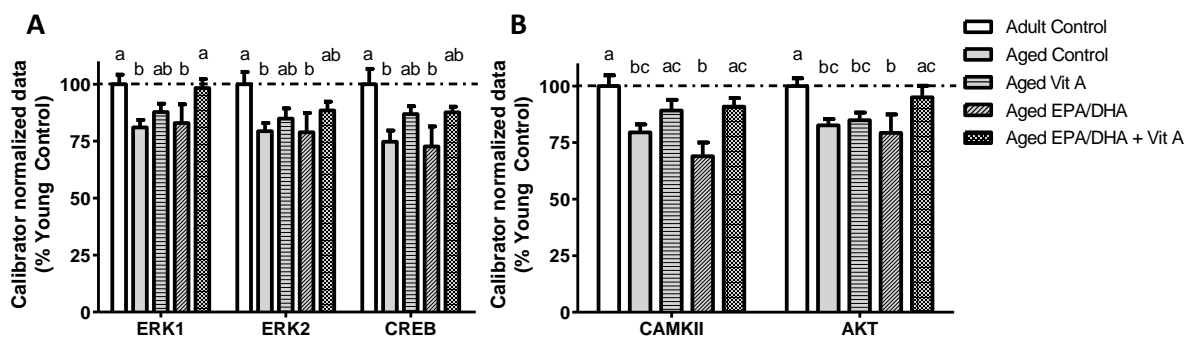


Figure 5:

Effect of age and diet (EPA/DHA, Vit A or EPA/DHA + Vit A) on mRNA expression of ERK1, ERK2, and CREB (A) and CAMKII and AKT (B). Target mRNAs are relative levels and are expressed as percentage of Adult control expression of target/reference ratio normalized by the calibrator. Values are means + SEM, n=8-10 rats per group. Data were analyzed by one way ANOVAs followed by the Fischer PLSD *post-hoc* test. Bars not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

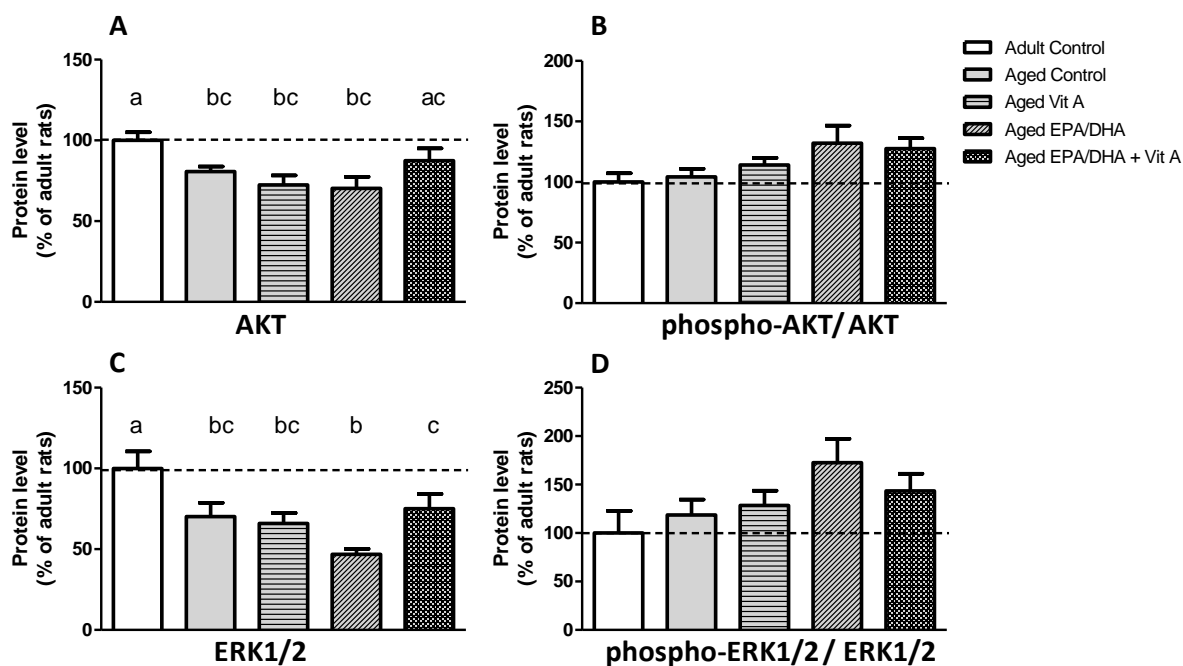


Figure 6:

Effect of age and diet (EPA/DHA, VitA or EPA/DHA + Vit A) on protein expression of AKT (A), phospho-AKT/AKT ratio (B), Erk1/2 (C) and phospho-Erk1/2/Erk1/2 ratio (D). Relative protein levels are expressed as percentage of Adult control expression of the same protein. Values are means + SEM, n=6-9 rats per group. Data were analyzed by one way ANOVAs followed by the Fischer PLSD *post-hoc* test. Bars not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05).

References:

- Aid S, Bosetti F. 2007. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. *Brain Res Bull* 73: 108-113.
- Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. 2013. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and non-genomic effects. *J Lipid Res*.
- Azais-Braesco V, Dodeman I, Delpal S, Alexandre-Gouabau MC, Partier A, Borel P, Grolier P. 1995. Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1259: 271-276.
- Balmer JE, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-1808.
- Biesalski HK, Ehrental W, Gross M, Hafner G, Harth O. 1983. Rapid determination of retinol (vitamin A) in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Vitam Nutr Res* 53: 130-137.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23: 3807-3819.
- Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufriere B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V. 1998. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53: B133-140.
- Boucheron C, Alfos S, Enderlin V, Husson M, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. 2006. Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging* 27: 1326-1334.
- Buaud B, Esterle L, Vaysse C, Alfos S, Combe N, Higuieret P, Pallet V. 2010. A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr* 103: 1720-1729.
- Calderon F, Kim HY. 2007. Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosaehaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77: 227-232.
- Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A. 2004. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15: 5583-5592.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28: 436-445.
- Chen J, Kelly PT. 1996. Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J Neurosci* 16: 5704-5714.

- Christiansen EN, Lund JS, Rortveit T, Rustan AC. 1991. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1082: 57-62.
- Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Begin M, Feart C, Barberger-Gateau P. 2009. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res* 48: 239-256.
- Dauncey MJ. 2009. New insights into nutrition and cognitive neuroscience. *Proc Nutr Soc* 68: 408-415.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, Perlmann T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290: 2140-2144.
- Denis I, Potier B, Vancassel S, Heberden C, Laviolle M. 2013. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. *Ageing Res Rev* 12: 579-594.
- Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT. 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 28: 424-439.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P. 1997a. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229: 125-129.
- Enderlin V, Alfos S, Pallet V, Garcin H, Azaïs-Braesco V, Jaffard R, Higuieret P. 1997b. Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* 412: 629-632.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21: 6423-6429.
- Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA, Freysz L. 2004. Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 179-195.
- Favreliere S, Perault MC, Huguet F, De Javel D, Bertrand N, Piriou A, Durand G. 2003. DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 24: 233-243.
- Favrelière S, Stadelmann-Ingrand S, Huguet F, De Javel D, Piriou A, Tallineau C, Durand G. 2000. Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Aging* 21: 653-660.
- Feart C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfos S, Higuieret P, Pallet V. 2005. Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26: 729-738.

- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Gamoh S, Hashimoto M, Hossain S, Masumura S. 2001. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 266-270.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964.
- Haller J, Weggemans RM, Lammi-Keefe CJ, Ferry M. 1996. Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. *SENECA Investigators. Eur J Clin Nutr* 50 Suppl 2: S32-46.
- Henke K. 2010. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11: 523-532.
- Jackson TC, Rani A, Kumar A, Foster TC. 2009. Regional hippocampal differences in AKT survival signaling across the lifespan: implications for CA1 vulnerability with aging. *Cell Death Differ* 16: 439-448.
- Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kelly L, Grehan B, Chiesa AD, O'Mara SM, Downer E, Sahyoun G, Massey KA, Nicolaou A, Lynch MA. 2011. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol Aging* 32: 2318 e2311-2315.
- Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Gregoire S, Bretillon L, Laye S. 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7: e36861.
- Lane MA, Bailey SJ. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75: 275-293.
- Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, Willson TM, Sjovall J, Perlmann T, Griffiths WJ. 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 3: 692-703.
- Lim S-Y, Suzuki H. 2000. Intakes of Dietary Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Egg Phosphatidylcholine Improve Maze-Learning Ability in Young and Old Mice. *J Nutr* 130: 1629-1632.
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175-190.
- Lister JP, Barnes CA. 2009. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol* 66: 829-833.

- Mingaud F, et al. 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28: 279-291.
- Moriguchi T, Salem N, Jr. 2003. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem* 87: 297-309.
- Moriguchi T, Greiner RS, Salem N, Jr. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75: 2563-2573.
- Morrison WR, Smith LM. 1964. Preparation Of Fatty Acid Methyl Esters And Dimethylacetals From Lipids With Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608.
- Nie K, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX. 2009. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 103-107.
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Jr., Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP. 2007. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 12: 36-46.
- Ross AC, Russell RM, Miller SA, Munro IC, Rodricks JV, Yetley EA, Julien E. 2009. Application of a key events dose-response analysis to nutrients: a case study with vitamin A (retinol). *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 708-717.
- Sastry PS. 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24: 69-176.
- Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129: 723-733.
- Shaw N, Elholm M, Noy N. 2003. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 278: 41589-41592.
- Simoes AE, et al. 2013. Efficient recovery of proteins from multiple source samples after TRIzol((R)) or TRIzol((R))LS RNA extraction and long-term storage. *BMC Genomics* 14: 181.
- Simonyi A, Murch K, Sun GY. 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 mRNA expression in the rat brain during aging. *Neurochem Res* 28: 1375-1378.
- Su HM. 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21: 364-373.
- Touyarot K, Bonhomme D, Roux P, Alfos S, Lafenetre P, Richard E, Higuere P, Pallet V. 2013. A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS One* 8: e72101.
- van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF. 2004. Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 26-30.
- van Neerven S, Kampmann E, Mey J. 2008. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol*.

- Vinot N, Jouin M, Lhomme-Duchadeuil A, Guesnet P, Alessandri JM, Aujard F, Pifferi F. 2011. Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. *PLoS One* 6: e20491.
- Wainwright PE, Xing HC, Ward GR, Huang YS, Bobik E, Auestad N, Montalto M. 1999. Water maze performance is unaffected in artificially reared rats fed diets supplemented with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *J Nutr* 129: 1079-1089.
- Wietrzych-Schindler M, Szyszka-Niagolov M, Ohta K, Endo Y, Perez E, de Lera AR, Chambon P, Krezel W. 2011. Retinoid x receptor gamma is implicated in docosahexaenoic acid modulation of despair behaviors and working memory in mice. *Biol Psychiatry* 69: 788-794.
- Wietrzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W. 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12: 318-326.
- Williams B, Granholm AC, Sambamurti K. 2007. Age-dependent loss of NGF signaling in the rat basal forebrain is due to disrupted MAPK activation. *Neurosci Lett* 413: 110-114.
- Xia Z, Storm DR. 2012. Role of signal transduction crosstalk between adenylyl cyclase and MAP kinase in hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 19: 369-374.

Chapitre 3 : L'administration de DHA non estérifié améliore les performances mnésiques de souris âgées : Implication du RXR γ

L'administration de DHA non estérifié améliore les performances mnésiques de souris âgées : Implication du RXR γ

Létondor A.^{1,2,3}, Béracochéa D.^{4,5}, Krazem A.^{4,5}, Herrouin C.³, Baud B.³, Vaysse C.³, Pallet V.^{1,2}, Alfos S.^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

²INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

³ITERG, Institut des corps gras, 33600 Pessac, France.

⁴CNRS, INCIA, UMR 5287, 33400 Talence, France.

⁵Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, 33400 Talence, France.

Soutiens financiers :

Conseil Régional d'Aquitaine - Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt
– ACTIA, Association Nationale de la Recherche et de la Technologie – ANRT

Résumé :

Le vieillissement cérébral se traduit par de multiples altérations biochimiques et morphologiques associées à un déclin cognitif progressif, et notamment des performances mnésiques. Les acides gras sont les principaux constituants des membranes cérébrales, parmi lesquels les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 et notamment l'acide docosahexaénoïque (DHA), jouent un rôle primordial dans le maintien des fonctions cognitives au cours du vieillissement. Or, il a été rapporté que la teneur plasmatique en DHA non estérifié est diminuée au cours du vieillissement. De plus, plusieurs études ont montré une baisse de la teneur cérébrale en DHA, associée à une altération des performances mnésiques. Parmi les mécanismes d'action connus du DHA sur le fonctionnement cérébral, il a été rapporté son rôle dans la régulation de l'expression de gènes *via* sa fixation à des récepteurs nucléaires tels que le peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) et le retinoid X receptor (RXR), facteurs de transcription modulant l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques. Ainsi, une étude récente a montré l'implication du DHA non estérifié dans la modulation de la mémoire de travail *via* l'activation de RXR γ . L'objectif de cette étude a consisté à évaluer les effets d'injections intrapéritonéales de DHA non estérifié sur les performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelle chez la souris âgée. L'expression de RXR γ a été mesurée au niveau de l'hippocampe par PCR quantitative en temps réel. Nos résultats montrent un effet bénéfique de l'administration de 0,1 et 1 mg de DHA/kg de poids corporel sur les performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelle chez la souris âgée. De plus, nous montrons une corrélation positive entre l'expression de RXR γ dans l'hippocampe et les performances de mémoire contextuelle, supportant l'hypothèse du rôle essentiel joué par ce récepteur nucléaire dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement.

Introduction :

Le vieillissement cérébral se traduit par de nombreuses altérations morphologiques et biochimiques, associées à un déclin cognitif progressif, notamment une altération de la mémoire (Morrison J. H. and Baxter 2012). Ainsi, de nombreuses études menées chez des animaux âgés ont montré une altération des performances dans des tests comportementaux de mémoire spatiale dépendante de l'intégrité de l'hippocampe tels que le labyrinthe aquatique de Morris ou le test de Barnes (Lister and Barnes 2009). Par ailleurs, il a été montré sur un modèle de souris âgées de 18 mois, une diminution des performances de mémoire de travail évaluée par un test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T, pour un intervalle inter-essais de 90 secondes, par comparaison avec des souris âgées de 5 mois (Vandesquille et al. 2011). La mémoire contextuelle est également altérée chez la souris mais à un âge plus précoce. En effet, Béracochéa et al. (2007) ont montré une diminution du pourcentage de réponses correctes dans une tâche de discrimination contextuelle chez des souris âgées de 14 mois par comparaison avec des souris âgées de 5 mois, suggérant une vulnérabilité accrue au vieillissement cérébral pour ce type de mémoire.

Parmi les nutriments d'intérêt jouant un rôle majeur dans le fonctionnement cérébral, de nombreuses études ont rapporté l'implication des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement (Denis et al. 2013, Su 2010). En effet, le cerveau est, après le tissu adipeux, l'organe le plus riche en lipides, et notamment en AGPI-LC n-3 tel que l'acide docosahexaénoïque (DHA) contenu principalement dans la phosphatidyléthanolamine (PE) des membranes cérébrales (Sastry 1985), jouant ainsi un rôle fondamental dans le fonctionnement cérébral (Lauritzen et al. 2001). Cependant, il a été montré au cours du vieillissement une diminution de la teneur cérébrale en DHA, associée à une altération de la mémoire de reconnaissance spatiale ou d'objet (Labrousse et al. 2012). Cette diminution de la teneur cérébrale en DHA avec l'âge pourrait résulter d'une altération de la biodisponibilité du DHA pour le cerveau au cours du vieillissement. Ainsi, chez l'Homme, une étude récente a montré une augmentation transitoire des teneurs plasmatiques de DHA, ainsi que du niveau de β -oxydation chez des sujets âgés de 77 ans en moyenne, ayant ingéré une dose de 50 mg de DHA radiomarqué, par comparaison à des sujets âgés de 27 ans en moyenne ayant ingéré

la même dose de DHA (Plourde et al. 2011). Ces données suggèrent une altération du métabolisme lipidique chez le sujet âgé, entraînant une accumulation transitoire du DHA dans le plasma. Chez l'animal, il a été montré que la teneur plasmatique en DHA non estérifié, forme qui peut être intégrée rapidement dans les membranes cérébrales (DeGeorge et al. 1991, DeMar et al. 2005), était diminuée chez des rats âgés de 20 mois par comparaison avec des rats de 10 mois (Gao et al. 2013). Ces données soutiennent l'hypothèse d'une diminution de la biodisponibilité tissulaire du DHA au cours du vieillissement, notamment pour le cerveau.

A l'inverse, il a récemment été mis en évidence qu'un traitement pharmacologique avec du DHA permettait de moduler les performances de mémoire chez l'animal adulte. En effet, Wietrych-Schindler et al. (2011) ont montré qu'une injection unique par voie intrapéritonéale (ip.) d'une dose de 1 mg de DHA/kg permettait d'améliorer les performances de mémoire de travail et de réduire le comportement de résignation chez la souris adulte âgée de 5 mois, *via* son action sur le RXR γ .

En effet, outre leur rôle structural, les AGPI-LC n-3 et notamment le DHA, peuvent moduler l'expression du génome *via* leur action sur des récepteurs nucléaires tels que les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) et les RXR (retinoid X receptor) (Georgiadi et al. 2012). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription permettant de réguler l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique soutenant les processus mnésiques (Dyall S. C. and Michael-Titus 2008). Une étude transcriptomique a rapporté une diminution de l'expression des ARNm d'un des isotopes des RXR, le RXR γ , dans la région CA1 de l'hippocampe de rats âgés de 24 mois par comparaison avec des rats âgés de 4 mois. De plus, cette diminution était corrélée à des déficits de la mémoire spatiale de référence testée dans le labyrinthe aquatique de Morris et dans une tâche de reconnaissance d'objet. Ces résultats suggèrent ainsi que l'hypoexpression de ce récepteur nucléaire pourrait contribuer aux altérations mnésiques décrites au cours du vieillissement (Blalock et al. 2003).

L'ensemble de ces données suggère donc qu'une diminution de la biodisponibilité en DHA, associée à une hypoexpression du récepteur nucléaire RXR γ , pourrait participer à la mise en place des atteintes mnésiques liées à l'âge. Par ailleurs, ces données semblent indiquer

qu'un traitement pharmacologique avec du DHA pourrait améliorer les performances de mémoire chez l'animal.

Dans ce contexte, nous avons évalué les effets d'injections ip. de DHA non estérifié sur les performances mnésiques de souris âgées dans deux tâches comportementales dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe et dans lesquelles il est démontré que les souris âgées présentent des déficits. Afin de déterminer la dose efficace de DHA sur le maintien des performances mnésiques, nous avons dans un premier temps, étudié l'effet de doses croissantes de DHA sur les performances de mémoire de travail de souris âgées évaluées dans une tâche d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T. Ensuite, les performances d'animaux âgés injectés avec les doses efficaces de DHA ont été évaluées dans une tâche de discrimination sérielle et contextuelle. Afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet bénéfique du DHA sur les performances de mémoire, l'expression des ARNm des RAR, RXR et des PPAR a été mesurée dans l'hippocampe par PCR quantitative en temps réel. Le statut cérébral en acides gras a également été évalué au sein de la phosphatidyléthanolamine afin de déterminer l'effet des injections de DHA sur la composition en acides gras des membranes cérébrales.

Matériel et Méthodes :

Animaux :

Cette étude a été menée selon le Système Qualité INRA de Référence et la directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil de protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les protocoles ont été approuvés par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et le comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'Université de Bordeaux.

74 souris mâles C57Bl/6 ont été réceptionnées par lots homogènes de 20 souris âgées de 12 à 14 mois (Janvier, France). A leur arrivée au laboratoire, les souris ont été placées en stabulation en cages collectives (surface de 720 cm²) avec eau et nourriture *ad libitum* (Régime standard UAR A04, Safe) dans un environnement à température et hygrométrie contrôlés (21±1°C ; 55±10 % respectivement) et sous cycle nyctéméral 12h/12h (7h00-19h00). Au moment des expériences, les animaux sont âgés de 16 à 18 mois.

10 jours avant le début de l'expérimentation, les animaux ont été répartis en 2 lots homogènes et placés en cages individuelles (surface de 180 cm²). L'eau et la nourriture étaient données *ad libitum* (Régime standard UAR A04, Safe). Le premier lot comprenant 5 groupes homogènes (solvant ; 0,1 ; 1 ; 3 et 10 mg DHA/kg de poids corporel (n=9-10 / groupe), a été soumis au test d'alternance spontanée. Le second lot comprenant 3 groupes homogènes (groupes solvant ; 0,1 ; 1 mg DHA/kg de poids corporel (n=8 / groupe) a été soumis au test de discrimination sérielle et contextuelle. 5 jours avant le début des tests comportementaux, les souris ont été manipulées quotidiennement afin de les habituer à l'expérimentateur et à la préhension nécessaire aux traitements pharmacologiques dans le but de réduire les réactions de peur et d'anxiété causées par la manipulation.

Tests comportementaux :

Les dispositifs expérimentaux et les procédures comportementales sont détaillés dans la figure 1.

Alternance spontanée :

Les performances d'alternance spontanée ont été évaluées dans un labyrinthe en T suivant le protocole précédemment décrit par Vandesquille et al. (2011).

Dispositif expérimental : Le labyrinthe en T est situé dans une pièce à luminosité constante (30 lux), dont les murs comportent divers indices visuels permettant à l'animal de se repérer. Les indices spatiaux (papiers colorés et contrastés) sont positionnés sur les murs à 1 mètre au dessus du dispositif. Le labyrinthe, conçu en PVC gris, comporte un compartiment de départ (14x10x20 cm) relié à deux compartiments d'arrivée (29x10x20 cm) par une allée centrale (46x10x20 cm). Les trois compartiments sont séparés de l'allée centrale par des portes coulissantes actionnables à distance par un système de vérins. Les déplacements de l'animal sont contrôlés à l'aide d'une caméra située au dessus du labyrinthe.

Procédure comportementale :

Habituation : A l'issue des 5 jours de manipulation, les animaux ont été soumis à 2 sessions d'habituation pendant 2 jours (1 session / jour). Ils ont été placés dans le compartiment de départ et laissés libres d'explorer le labyrinthe (portes ouvertes) pendant 10 minutes afin de se familiariser à l'appareil et aux indices spatiaux.

Prétest : Les souris ont été soumises à une première session d'alternance spontanée ayant pour but d'habituer les animaux aux conditions expérimentales (ouverture/fermeture des portes, confinement, manipulations par l'expérimentateur) afin de minimiser les effets du stress et de la néophobie et de s'assurer de la mise en place du comportement d'alternance. Ce prétest comprenait 7 essais consécutifs séparés par un intervalle inter-essais (IIE) de 30 secondes pour lequel il a été montré que les animaux âgés ne présentent pas de déficit d'alternance (Vandesquille et al. 2011). Un huitième essai a été réalisé après un IIE de 5 secondes afin de contrôler la motivation des animaux. A chacun des essais, l'animal était placé dans le compartiment de départ fermé durant 30s ; à l'issue de cet intervalle, la porte du bras de départ s'ouvrait et l'animal était laissé libre d'explorer l'un ou l'autre des bras d'arrivée. Une fois entré dans le bras d'arrivée, l'animal était confiné dans le bras par la fermeture de la porte durant un délai invariable de 30s. A l'issue de ce délai de confinement, l'animal était replacé dans le compartiment de départ pour l'essai suivant.

Test : 48h après le prétest, les animaux ont été soumis à une seconde session d'alternance spontanée, différant du prétest seulement par la longueur de l'IIE de 90s et pour lequel il a été montré que les animaux âgés présentent des déficits d'alternance (Vandesquille et al. 2011).

Entre chaque essai, et chaque animal, le labyrinthe était nettoyé avec un chiffon imbibé d'eau.

Discrimination sérielle et contextuelle :

Les performances de mémoire contextuelle des animaux ont été évaluées dans une tâche de discrimination sérielle et contextuelle (CSD) selon la procédure mise au point et précédemment décrite par plusieurs auteurs (Beracochea et al. 2007, Celerier et al. 2004, Chauveau et al. 2008, Tronche et al. 2010).

Dispositif expérimental : Le dispositif expérimental est situé dans une pièce éclairée uniformément (20 lux). L'acquisition ainsi que le test de rétention sont réalisés avec une planche percée d'un trou dans chacun des 4 angles et fermée par une paroi en PVC gris (45x45x30 cm). Ce plancher à trous est interchangeable (blanc ou noir) afin de créer deux contextes d'apprentissage différents. Chacun des trous percés (3 cm de diamètre x2,5 cm de profondeur) placé à 6 cm de la paroi s'ouvre sur une coupelle pouvant contenir des pastilles

de sucrose comme renforcement alimentaire (Bioserv pellets). Le dispositif est nettoyé avec un chiffon imbibé d'éthanol à 95%, puis avec de l'eau entre chaque souris. Des cellules photoélectriques placées dans chaque trou permettent de mesurer le nombre et la durée de chaque visite, le nombre total de visites dans chacun des trous et la durée totale de toutes les visites. Ces mesures permettent d'extraire le pourcentage de visites de chaque trou ainsi que d'évaluer l'exploration globale du dispositif.

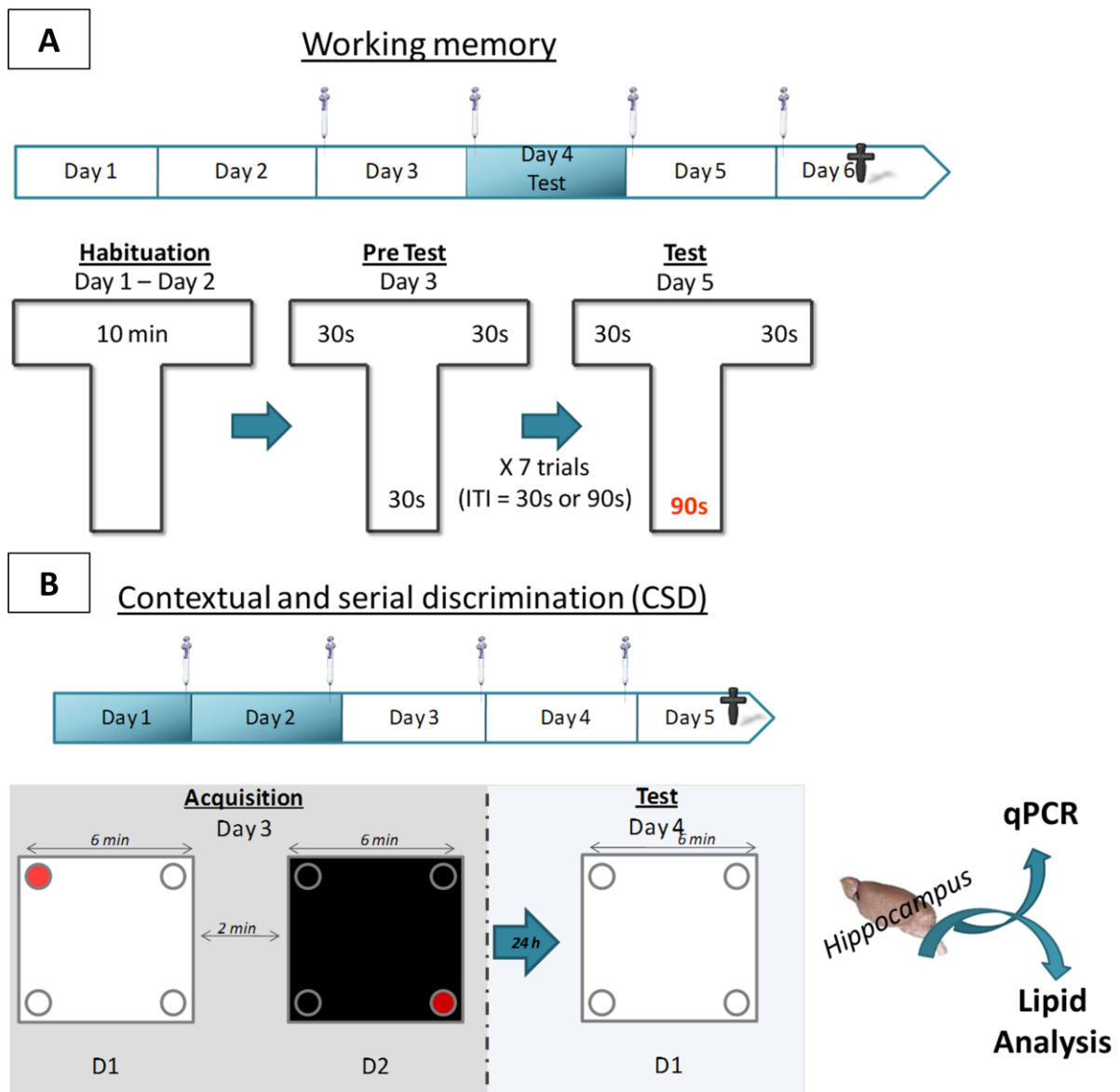


Figure 1 : Procédure comportementale utilisée lors des tests d'alternance spontanée (A) et lors de la tâche de discrimination sérielle et contextuelle (B). A l'issue de la deuxième tâche, les hippocampes ont été disséqués en vue de l'analyse de la composition lipidique et de la quantification par qPCR de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires. ITI : inter-trial interval ; D1 : discrimination 1 ; D2 : discrimination 2.

Procédure comportementale :

Acquisition : L'acquisition a été réalisée dans la pièce où a lieu le test. Les souris ont été placées au centre de la planche à trous à l'aide d'un cylindre en PVC et maintenues pendant 15 secondes afin de permettre une direction de départ randomisé dans le dispositif. A l'issue de ce délai, le cylindre a été retiré et la souris laissée libre d'explorer le dispositif durant 6 minutes pour chacune des deux discriminations successives. Les deux discriminations différaient par la couleur du plancher (discrimination n°1, D1 : blanc et discrimination n°2, D2 : noir) et été séparées par un intervalle de temps de 2 minutes durant lequel les souris ont été replacées dans leur cage d'hébergement. La séquence des deux discriminations (D1 *versus* D2) était alternée d'une souris à l'autre au sein d'un même groupe. Pour D1, 10 pastilles de 20 mg étaient disponibles dans un seul des 4 trous de la planche et l'emplacement du renforcement était randomisé entre chaque animal. Pour D2, les pastilles de renforcement étaient placées dans le trou diagonalement opposé au premier trou appâté. Les animaux n'ayant pas mangé au moins 8 pastilles sur 10 au cours de D1 ou D2 ont été exclus des analyses. Les indices spatiaux (papiers colorés et contrastés) étaient positionnés sur les murs à 1 mètre au dessus du dispositif. Ces indices allocentriques restaient à la même position pour les deux discriminations successives. Ainsi, l'apprentissage de cette tâche était basé sur l'utilisation des indices allocentriques externes seulement. A la fin de la phase d'acquisition, les souris ont été replacées dans leur cage d'hébergement à l'animalerie jusqu'au test.

Test : 24 heures après l'acquisition, les souris ont été replacées sur le plancher correspondant à la discrimination D1 mais sans renforcement alimentaire, et laissées libres d'explorer le dispositif durant 6 minutes. Les performances mnésiques ont été évaluées par la mesure du pourcentage de réponses correctes (pourcentage de visite du trou appâté lors de D1), le pourcentage de réponses interférentes (pourcentage de visite du trou appâté lors de D2), le pourcentage d'erreur (pourcentage de visite des deux autres trous non appâtés) et le pourcentage de réponse spatiale (pourcentage de visite des trous appâtés lors de D1 et D2).

Traitements pharmacologiques :

Préparations des solutions : Toutes les solutions ont été préparées avant l'expérience à partir de DHA pur (Sigma-Aldrich, France) dissout dans une solution d'éthanol et de sérumalbumine bovine dissoute à 10% dans une solution de NaCl (0,9%). Les concentrations finales en DHA étaient de 0,1 ; 1 ; 3 ou 10 mg /kg de poids corporel. Une fois le DHA dissout, les solutions ont été aliquotées, passées sous un flux d'azote afin d'éviter toute oxydation, puis conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Injections : Les solutions ont été injectées quotidiennement le soir par voie ip. durant quatre jours : 3 jours avant le test d'alternance ou de mémoire contextuelle selon la procédure comportementale utilisée, puis le soir du test précédant l'euthanasie.

Euthanasie : A l'issue des tests comportementaux, les animaux ont été replacés à l'animalerie dans leur cage d'hébergement. 24 heures après, les souris ont été euthanasiées par décapitation, le cerveau prélevé puis l'hippocampe disséqué rapidement et conservé à -80 °C en vue des analyses ultérieures.

Quantification de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires:

Les ARN totaux des hippocampes ont été extraits comme décrit précédemment (Buaud et al. 2010) à l'aide du kit Trizol (Invitrogen, France) selon les instructions du fabricant. La concentration et la pureté des ARN isolés ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Labtech, France). La qualité des échantillons a également été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (AgilentTechnologies, France) et du kit LabChip Nano RNA-6000 permettant de déterminer le ratio des ARNr 28s/18s. Tous les échantillons présentaient un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 8, indiquant leur absence de dégradation.

Les ADNc, complémentaires des brins d'ARNm ont été synthétisés en présence de la transcriptase réverse ImPromII (Promega, France) comme décrit précédemment (Buaud et al. 2010). 1 µg d'ARNs totaux a été incubé pendant 15 minutes à 37 °C en présence de 20 unités de RNasin (Promega, France) et de 10 unités de DNase I. Ensuite, des amorces oligodT (Promega, France) et des amorces aléatoires (Promega, France) ont été ajoutées aux échantillons, puis incubées pendant 10 minutes à 75 °C. La transcription réverse a ensuite été réalisée à 42 °C pendant 60 minutes dans un volume final de 20 µl.

La réaction de PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du LightCycler 480™ (Roche Diagnostics, Allemagne) sur des plaques 96 puits dans un volume final de 20 µl. Le mix réactionnel de 6 µl contenait 2,5 ng d'ADNc, 0,5 µl de chaque amorce amont et aval ainsi que le tampon LC480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Allemagne) à la concentration 1X. Les séquences des amorces amont et aval des gènes cible étaient les suivantes : RXR γ : Amont : 5'-ATTGGAATATGAACTACCCATCCA-3', Aval : 5'-CGTAGTGCTTCCCTGAGGATCT-3' permettant l'amplification d'un produit de 94 pb ; PPAR α : Amont : 5'-GCAGAGGTCCGATTCTTCCA-3', Aval : 5'-GGTCGTTCAAGTCCAAGTTTGC-3' permettant l'amplification d'un produit de 112 pb ; PPAR δ : Amont : 5'-CGCAACAAGTGTCAGTACTG-3', Aval : 5'-CCAAAGCGGATAGCGTTGTG-3' permettant l'amplification d'un produit de 74 pb ; PPAR γ : Amont : 5'-CACAATGCCATCAGGTTTGG-3', Aval : 5'-GCTGGTCGATATCACTGGAGATC-3' permettant l'amplification d'un produit de 82 pb. Les séquences amont et aval des gènes RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β , étaient les mêmes que celles utilisées par Brossaud et al. (2013). Le programme utilisé consistait en une étape initiale de dénaturation durant 10 min à 95 °C, 40 cycles d'amplification (10 s de dénaturation à 95°C, 6 s d'hybridation des amorces à 62°C et 10 s d'élongation à 72°C) suivis d'une étape de fusion afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées (5 s à 95°C, 1 min à 65°C et montée lente en température jusqu'à 97°C). La courbe de fusion ne présentait qu'un seul pic après l'amplification indiquant la spécificité de l'amplification. Le gène codant pour la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été choisi comme gène de référence, après avoir vérifié que son expression ne variait pas entre les groupes expérimentaux. Les amorces utilisées avaient pour séquences: Amont : 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3' ; Aval : 5'-GAACATCATCCCTGCATCCA-3' et la taille de l'amplicon était de 78 pb. La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel LightCycler 480 Relative Quantification Software (version 1.5). Afin de corriger les variations potentielles d'efficacité entre le gène de référence et le gène cible, l'efficacité de la PCR pour chaque gène a été calculée à l'aide de gammes étalons. Un échantillon calibrateur, permettant de corriger un éventuel effet plaque, a été choisi dans le groupe solvant. Le logiciel fournit ainsi une quantification relative normalisée par rapport au calibrateur et tenant compte des corrections d'efficacité. Les résultats sont donc exprimés par le ratio cible/référence divisé par le ratio cible/référence du calibrateur.

Analyse des lipides :

Extraction des lipides totaux :

Après broyage des restes de cerveaux, les lipides totaux ont été extraits selon la méthode adaptée de Folch et al. (1957), par ajout de 20 fois le volume d'un mélange de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) par gramme de tissu. L'extraction s'est faite sous agitation à température ambiante. Après 1 heure, 0,2 volumes de chlorure de potassium (0,8% dans l'eau) ont été ajoutés par volume de mélange d'extraction. Les phases hydroalcoolique et chloroformique ont ensuite été séparées par centrifugation.

La phase chloroformique (organique) a ensuite été filtrée avec un mélange de chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Les solvants ont ensuite été évaporés sous vide à température ambiante avec un évaporateur rotatif. L'extrait lipidique sec a été repris dans du chloroforme puis filtré. La solution finale ou « extrait de Folch » a été stockée à 4 °C dans l'attente de la poursuite des analyses.

Isolement de la phosphatidyléthanolamine cérébrale :

La phosphatidyléthanolamine (PE) contenue dans les membranes de l'hippocampe a été isolée par chromatographie sur couche mince à partir des extraits de Folch. Après évaporation du solvant sous un flux d'azote, les extraits lipidiques ont été repris dans quelques gouttes de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) puis déposés sur un gel de silice (Merck, France). La phase mobile utilisée était composée d'un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (50/37,5/3,5/2 ; v/v/v/v). Après migration, une solution de 2,7-dichlorofluorescéine à 0,2% dans l'éthanol a été vaporisée sur le gel afin de révéler les lipides sous lumière UV à 254nm. La zone de gel correspondant à la PE a été délimitée puis récupérée en vue de la préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG).

Préparation des EMAG :

Les acides gras totaux de la PE ont été transméthylés selon la technique de Morrison et Smith (1964). 1 ml de trifluorure de bore à 14% dans du méthanol (Sigma, USA) a été ajouté aux prélèvements de gel de silice correspondant à la fraction de PE, qui ont ensuite été chauffés pendant 20 minutes à 100 °C. Après addition de 1 ml de NaOH (5N), les EMAG

obtenus ont été extraits trois fois avec 2 ml d'isooctane. Les phases organiques ont été concentrées, lavées avec 1 ml d'eau puis stockées à -20 °C jusqu'à l'analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Analyse des EMAG :

La composition des EMAG de la PE hippocampique a été établie par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé était équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur en mode split. Les échantillons ont été injectés sur une colonne capillaire BPX70 (longueur = 60m, diamètre interne = 0,25 mm, épaisseur du film = 0,25 µm ; SGE, Phenomenex, Allemagne). Le gaz porteur utilisé était l'hydrogène à la pression de 1 bar et le ratio de la fuite était de 1/70. La température de la colonne était programmée pour augmenter de 150 à 200 °C (1,5 °C/min) durant 25 min, puis de 200 à 225° (20 °C/min) et être maintenue à 225 °C jusqu'à la fin de l'analyse (20 min). Le port d'injection et le détecteur étaient respectivement maintenus à 250 et 280 °C. Les pics de rétention ont été intégrés à l'aide d'un système d'intégration Chromjet SP4400 (SpectraPhysics, USA). L'identification des différents EMAG était basée sur la comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'esters méthyliques standards (Sigma-Aldrich, France), chromatographiés dans les mêmes conditions.

Analyses statistiques : Les résultats sont exprimés sous la forme valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel StatView (5.0). Les différences significatives entre les groupes ont été déterminées par une ANOVA à un facteur (dose) suivi d'un test *post-hoc* de Fischer PLSD. Les différences significatives par rapport au hasard ont été déterminées par un test *t* de Student (un groupe).

Résultats :

Les performances de mémoire des souris ont été évaluées dans deux paradigmes différents, l'un faisant appel à la mémoire immédiate, dite de travail, dans la tâche d'alternance spontanée, l'autre faisant appel à une mémoire épisodique de référence, lors d'un

apprentissage spatial dans un contexte précis dans la tâche de discrimination sérielle et contextuelle.

Alternance spontanée :

Les performances d'alternance spontanée séquentielle des souris testées dans un labyrinthe en T sont présentées dans la figure 2. La comparaison des moyennes des performances (figure 2A) entre les 5 groupes d'animaux ne montre pas de différence statistiquement significative d'alternance entre les groupes. En revanche, l'analyse de la moyenne de chaque groupe comparée par rapport au hasard met en évidence que les groupes ayant reçu des doses de 0,1 ou 1 mg de DHA /kg ont des performances significativement supérieures par rapport au hasard (respectivement 66,6%, $t = 2,70$; $p < 0,05$ et 70,4% ; $t = 3,77$; $p < 0,01$), indiquant ainsi que les animaux de ces deux groupes sont moins sensibles à l'interférence entre les essais et se souviennent du bras visité à l'essai précédent, contrairement aux groupes ayant reçu la solution contenant uniquement le solvant ou 3 et 10 mg de DHA/kg lors des injections. Afin de vérifier un éventuel effet du délai d'entrée dans le bras d'arrivée sur les performances d'alternance, les latences moyennes au cours des 7 essais du test ont été analysées (figure 2B). Ces latences d'entrées ne sont pas significativement différentes entre les groupes montrant ainsi qu'elles n'influencent pas les performances d'alternance.

Discrimination sérielle et contextuelle :

Les performances de mémoire de référence sérielle et contextuelle des animaux évaluées dans le paradigme du CSD sont présentées dans la figure 3. L'analyse du pourcentage de réponses correctes (figure 3A) montre que le groupe de souris ayant reçu des injections de 1 mg de DHA/kg présente des performances significativement supérieures au groupe de souris contrôle (53,7% contre 20,0% ; $F_{(2,20)} = 7,80$; $p < 0,001$) et au groupe de souris ayant reçu des injections de 0,1 mg/kg de DHA (53,7% contre 33,9% ; $F_{(2,20)} = 7,80$; $p < 0,05$). Par ailleurs, l'analyse des pourcentages de visites par rapport au hasard (calculé par rapport au nombre total de visites) montre que seul le groupe ayant reçu des injections de 1 mg de DHA/kg présente des performances supérieures au hasard ($t = 8,33$; $p < 0,001$), indiquant que les animaux se souviennent de l'emplacement du trou appâté lors de l'acquisition. Le pourcentage du nombre de réponses interférentes a également été mesuré (figure 3B) et

montre que les groupes ayant reçu des injections de DHA de 0,1 ou 1 mg/kg présentent un taux de réponses interférentes significativement inférieur à celui des souris contrôles (respectivement : 40,9% ; $F_{(2,20)} = 7,04$; $p < 0,05$ et 25,0% ; $F_{(2,20)} = 7,04$; $p < 0,01$). Ces résultats montrent que les souris contrôles présentent une préférence pour le trou interférent, appâté lors de D2, avec un taux de visites largement supérieur au hasard (62,9% ; $t = 9,84$, $p < 0,001$), mettant ainsi en évidence une interférence proactive liée à la visite du deuxième contexte sur le rappel du premier contexte. En revanche, il n'y a pas d'effet de cette interférence chez les souris ayant reçu les injections de 0,1 et 1 mg/kg de DHA qui ont des taux de visites proches du hasard (respectivement : 40,9% et 25,0%). Cependant, le pourcentage de réponses spatiales (figure 3C), correspondant aux taux de réponses correctes et interférentes, ne montre pas de différence d'apprentissage entre les groupes, indépendamment du contexte. Par ailleurs tous les groupes ont des performances spatiales supérieures au hasard (Solvent : 82,3% ; $t = 6,98$; $p < 0,001$; DHA 0,1 : 74,8% ; $t = 3,52$; $p < 0,01$; DHA 1 : 78,7% ; $t = 16,27$; $p < 0,001$), mettant en évidence des performances de mémoire spatiale équivalentes entre le groupe de souris contrôles et les souris ayant reçu des injections de DHA.

Quantification de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires et corrélation de l'expression de RXR γ avec les performances mnésiques :

L'expression des ARNm des récepteurs nucléaires RAR α , β , γ , des RXR α , β , γ et des PPAR α , δ , γ a été mesurée dans l'hippocampe de souris ayant reçu des injections quotidiennes de 0, 0,1 ou 1 mg de DHA /kg durant 4 jours. Leur expression ne varie pas en fonction de la dose de DHA injectée (données non montrées).

En ce qui concerne RXR γ , son expression ne varie pas en fonction de la dose de DHA injectée comme le montre la figure 4. En revanche, la figure 5 montre une corrélation positive entre l'expression relative des ARNm de RXR γ dans l'hippocampe et les performances mnésiques des animaux dans le paradigme de la discrimination sérielle et contextuelle ($r = 0,444$; $p = 0,034$), suggérant que les performances mnésiques des animaux dépendent en partie du niveau d'expression de RXR γ dans l'hippocampe.

Statut lipidique des membranes cérébrales :

Afin de mesurer l'effet des injections de DHA sur la composition en acides gras des membranes cérébrales, le profil en acides gras de la phosphatidyléthanolamine des membranes cérébrales a été établi (tableau1). Les proportions des différents acides gras, et notamment du DHA, ne varient pas entre les groupes expérimentaux.

Discussion :

De nombreuses données suggèrent que l'administration pharmacologique de DHA pourrait améliorer les performances mnésiques d'animaux âgés, *via* son action sur les récepteurs nucléaires, notamment le *RXR γ* . Le but de cette étude était d'évaluer les effets de l'administration de DHA non estérifié, sur les performances de souris âgées testées dans deux tâches comportementales dépendantes de l'hippocampe, pour lesquelles il a été montré que ces animaux présentent des déficits (Vandesquille et al. 2011, Béracochéa et al. 2007). Nos résultats montrent un effet bénéfique du DHA injecté à la dose de 1 mg/kg sur les performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelle chez la souris âgée. De plus, les performances des animaux âgés dans la tâche de discrimination sérielle et contextuelle sont corrélées positivement avec le niveau d'expression du *RXR γ* dans l'hippocampe.

L'objectif de la première expérience consistait à évaluer l'effet de différentes doses de DHA sur les performances de mémoire d'alternance spontanée séquentielle dans un labyrinthe en T. Ce paradigme permet de tester la mémoire de travail des animaux, faisant intervenir entre autres l'hippocampe et le cortex préfrontal, dont le rôle crucial dans la réalisation de cette tâche a été mis en évidence dans plusieurs études lésionnelles (pour revue, Lalonde and Chaudhuri 2002). Dans notre étude, les animaux âgés contrôles ont des performances d'alternance qui ne sont pas différentes du hasard pour un IIE de 90 s, attestant des déficits de mémoire précédemment observés chez les animaux âgés dans ce type de test. En effet, il a été mis en évidence un déficit d'alternance pour un IIE de 90 s chez des souris âgées de 18 mois, qui sont plus sensibles aux interférences proactives entre les essais successifs, que des animaux jeunes âgés de 3 mois (Vandesquille et al. 2011). En outre, seuls les groupes ayant reçu des injections de 0,1 et 1 mg de DHA/kg présentaient des performances d'alternance

significativement au dessus du hasard, montrant un effet bénéfique des injections de DHA non estérifié sur les performances mnésiques chez des animaux âgés. Les latences moyennes des animaux sur les 7 essais du test étaient similaires entre les groupes, indiquant que les différences dans les performances d'alternance des animaux ne sont pas liées au délai d'entrée dans le bras d'arrivée du labyrinthe, mais bien aux capacités de rétention des informations. Ces données sont cohérentes avec une étude récente ayant montré un effet bénéfique d'une dose unique de 1 mg de DHA/kg injectée par voie ip. chez des souris âgées de 5 mois, 5 heures avant d'être évaluées dans une tâche de mémoire de travail dans un labyrinthe en Y (Wietrzych-Schindler et al. 2011). Cependant, dans notre étude, les souris ayant reçu des doses plus élevées de DHA ne présentaient pas d'amélioration des performances d'alternance, suggérant un possible effet délétère du DHA lorsqu'il est administré à des doses importantes. Ainsi, un effet neuroprotecteur d'une dose de 630 mg de DHA/kg administré par voie intraveineuse a été mis en évidence sur un modèle de rats ischémiques adultes ; cet effet disparaissait pour une dose plus élevée de 1,25 g de DHA/kg qui pourrait induire une élévation du statut oxydatif (Belayev et al. 2005). En effet, chez des patients ischémiques il a été montré que les teneurs élevées en DHA dans les membranes érythrocytaires étaient associées à une augmentation de la vulnérabilité à la peroxydation des lipides, suggérant un effet délétère lié à de fortes concentrations de DHA (Imre et al. 1994).

Dans la deuxième expérience, nous avons analysé l'effet de l'administration de deux doses : 0,1 et 1 mg de DHA/kg sur le statut en acides gras dans la PE cérébrale, qui est un des principaux phospholipides membranaires contenant la plus grande proportion de DHA (Sastry et al. 1985). Nos résultats pour cette fraction phospholipidique ne mettent pas en évidence de changement de la composition en acides gras. Pourtant, il a été précédemment montré une incorporation rapide dans les phospholipides des membranes cérébrales, d'acide α -linoléique radiomarqué, précurseur des AGPI-LC n-3 et notamment du DHA, administré sous forme non estérifiée par voie intraveineuse chez des rats âgés de 2 mois (Demar et al. 2005). Toutefois, cette incorporation ne représentait que 10% du marquage total retrouvé dans le cerveau, la plus grande majorité provenant des produits dérivés de la β -oxydation, pouvant expliquer la stabilité de la composition des membranes cérébrales observée dans notre étude.

Les effets de l'administration de 0,1 et 1 mg de DHA/kg sur les performances de mémoire de souris âgées ont été évalués dans un test de discrimination sérielle et contextuelle. Ce test a été choisi car il fait appel à un apprentissage contextuel également dépendant de l'hippocampe (Chauveau et al. 2008). Par ailleurs, contrairement au test d'alternance spontanée, il permet de mettre en évidence des déficits mnésiques à un âge plus précoce de 14 mois (Béracochéa et al. 2007, Tronche et al. 2010), permettant éventuellement d'accentuer les différences entre les performances mnésiques des souris traitées et celles des souris non traitées. Nos résultats montrent que les souris du groupe contrôle présentaient un pourcentage de réponses correctes au niveau du hasard et à l'inverse un pourcentage de réponses interférentes d'environ 60%. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus précédemment sur des souris âgées de 14 à 19 mois, confirmant la vulnérabilité des animaux âgés aux interférences proactives liées à la visite du deuxième contexte au cours de la phase d'acquisition (Béracochéa et al. 2007, Tronche et al. 2010). De plus, nos résultats montrent un net effet bénéfique sur le rappel du premier contexte correspondant au pourcentage de réponses correctes, au détriment des performances de rappel du deuxième, correspondant au pourcentage de réponses interférentes, chez les animaux injectés avec une dose de 1 mg de DHA/kg. Les animaux ayant reçu une dose de 0,1 mg de DHA/kg présentaient des performances intermédiaires confirmant l'effet dose-réponse obtenu lors du test d'alternance. En accord avec les résultats obtenus sur les performances d'alternance spontanée, ces données confirment l'effet bénéfique de l'administration pharmacologique d'une dose de 1 mg de DHA/kg sur les performances mnésiques des animaux âgés. Par ailleurs ces résultats ne mettent pas en évidence de différence des performances de mémoire spatiale entre le groupe solvant et les groupes ayant reçu du DHA, indiquant que les déficits de mémoire observés chez les animaux contrôles sont spécifiques du contexte et liés à l'interférence proactive induite par la visite du deuxième environnement au cours de l'acquisition.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet bénéfique des injections de DHA sur les performances mnésiques des animaux âgés, nous avons mesuré par PCR quantitative l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires RAR, RXR et PPAR. Bien que nos résultats ne mettent pas en évidence d'effet significatif du traitement sur l'expression hippocampique des ARNm des récepteurs nucléaire RAR, RXR et PPAR, nous montrons une

corrélation positive uniquement entre l'expression des transcrits de RXR γ et les performances de mémoire contextuelle des souris âgées. Nos résultats suggèrent ainsi que les performances de mémoire épisodique sont en partie dépendantes de l'expression de RXR γ au niveau de l'hippocampe. Un ensemble de données bibliographiques viennent conforter ces résultats. Par une étude de transcriptomique, il a été mis en évidence une diminution de l'expression des ARNm de RXR γ dans la région CA1 de l'hippocampe de rats âgés de 14 à 24 mois, ainsi qu'une corrélation positive entre son niveau d'expression et les déficits de mémoire spatiale de référence des rats âgés (Blalock et al. 2003). Plus récemment Wietrych-Schindler et al. (2011) ont mis en évidence, chez des souris âgées de 5 mois, des effets bénéfiques de l'administration pharmacologique de 1 mg de DHA/kg sur les performances d'alternance spontanée qui sont abolis dans le cas d'une co-administration d'un antagoniste des RXR. Par ailleurs, des souris du même âge, knock-out (KO) pour l'isotype RXR γ , présentaient une altération des performances d'alternance spontanée par comparaison aux souris sauvages. Ce déficit de mémoire chez les animaux KO n'était pas reversé par l'administration de DHA (Wietrych-Schindler et al. 2011).

Il a été montré que le DHA constitue un ligand naturel des RXR, capable d'induire l'activité transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire (de Urquiza et al. 2000). Une fois activé le RXR pourrait jouer des rôles dans les processus de plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques. Ainsi, il a été mis en évidence sur une lignée cellulaire de neuroblastomes de souris que le DHA induisait l'activation de RXR, associée à une stimulation de la croissance des neurites (Calderon and Kim 2007). Des données précédemment obtenues au laboratoire ont montré qu'une supplémentation en EPA/DHA pendant 5 mois chez des rats âgés de 13 mois permettait de maintenir le niveau d'expression du RXR γ dans l'hippocampe (Alfos et al. non publié). Cet effet de la supplémentation était associé à un maintien de l'expression de protéines marqueurs de la plasticité synaptique telle que la neurogranine (RC3) et la neuromoduline (GAP-43) dans l'hippocampe ainsi qu'à une amélioration des performances de mémoire de travail des animaux âgés. De plus, RXR est le partenaire commun d'hétérodimérisation de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que le rétinoïc acid receptor (RAR) jouant un rôle essentiel dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement (Tafti and Ghyselinck 2007). Plusieurs études ont montré une hypoexpression des RAR et des RXR dans

le cerveau de souris au cours du vieillissement, associée à une diminution d'expression de RC3 et de GAP-43, participant ainsi à la mise en place des déficits mnésiques liés à l'âge (Enderlin et al. 1997, Etchamendy et al. 2001, Mingaud et al. 2008). Ces données suggèrent que le RXR pourrait jouer un rôle majeur dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement en modulant l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique.

Au cours du vieillissement il a été mis en évidence une diminution des teneurs en DHA dans différentes régions cérébrales dont notamment l'hippocampe (Dyall S.C. et al. 2007) pouvant résulter en partie d'une réduction de la biodisponibilité du DHA non estérifié plasmatique au cours du vieillissement (Gao et al. 2013). Pour activer les RXR au niveau intracellulaire, le DHA doit être libéré des phospholipides membranaires par l'intermédiaire de la phospholipase A2 indépendante du calcium (iPLA2) (Green et al. 2008). Or, il a été montré une diminution de l'expression de l'iPLA2 dans l'hippocampe de rats âgés de 24 mois par comparaison à des animaux de 4 mois (Aid and Bosetti 2007).

Ces données suggèrent que le vieillissement serait associé à une diminution des teneurs en DHA dans les phospholipides des membranes cérébrales ainsi qu'à une diminution de sa biodisponibilité intracellulaire pouvant conduire à une altération de la voie de signalisation des RXR, participant ainsi à des altérations de la plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques. Nos résultats montrent qu'en s'affranchissant de cette étape de mobilisation intracellulaire par l'administration de DHA libre directement actif, il est possible de restaurer l'activité de la voie de signalisation du RXR γ , contribuant ainsi à l'amélioration des performances mnésiques chez l'animal âgé.

En conclusion, nous montrons dans cette étude que l'administration pharmacologique d'une dose de 1 mg de DHA/kg durant 3 jours, correspondant au temps moyen des tests comportementaux, permet d'améliorer les performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelles chez des souris âgées de 18 mois. De plus, ces performances sont corrélées avec le niveau d'expression des ARNm de RXR γ , capable de lier le DHA. Ces résultats supportent l'hypothèse du rôle essentiel de ce récepteur dans le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement. Dans le contexte actuel de vieillissement de la population, ces résultats offrent de nouvelles pistes dans le cadre de la

recherche de nouveaux traitements permettant de diminuer les effets délétères du vieillissement sur les capacités mnésiques.

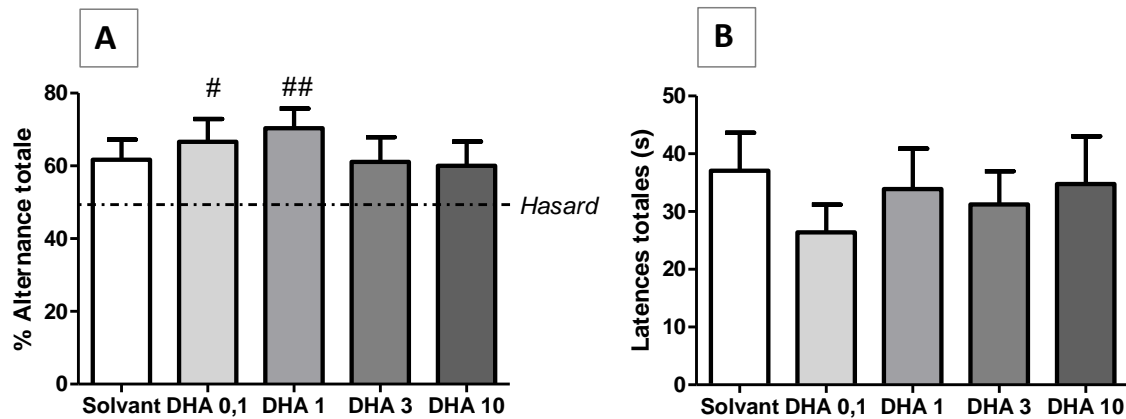


Figure 2 : Effet de doses croissantes de DHA (0 ; 0,1 ; 3 et 10 mg/kg), (A) sur les performances d'alternance spontanée et (B) sur les latences globales d'entrée dans le bras d'arrivée de souris âgées de 18 mois ($n = 9-10$ par groupe) dans un labyrinthe en T, pour un IEE de 90s. Les valeurs représentent (A) le pourcentage d'alternance globale sur 7 essais + ESM ou (B) la latence d'entrée dans le bras d'arrivée en secondes + ESM. Les données ont été analysées par une ANOVA à un facteur (dose) : non significative ; et un test t de Student (un groupe): # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ par rapport au hasard.

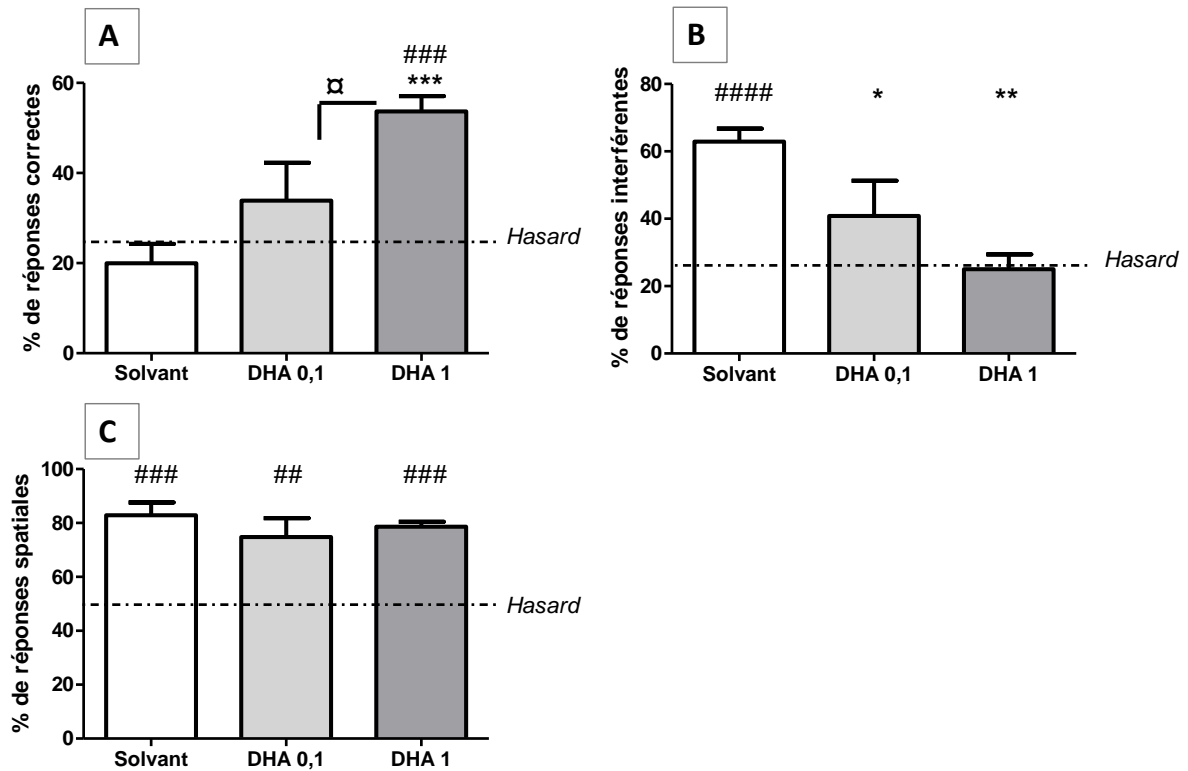


Figure 3 : Effet de doses croissantes de DHA (0 ; 0,1 et 1 mg/kg) sur les performances de discrimination sérielle et contextuelle (CSD) de souris âgées de 18 mois (n = 7-8 par groupe) sur une planche à trous. (A) Pourcentage de réponses correctes au cours du test + ESM. (B) Pourcentage de réponses interférentes au cours du test + ESM. (C) Pourcentage de réponse spatiale + ESM. Les données ont été analysées par une ANOVA à un facteur (dose) : * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 par rapport au groupe solvant ; α p < 0,05 par rapport au groupe DHA 0,1 et un test *t* de Student (un groupe) : ## p < 0,01 ; ### p < 0,001 par rapport au hasard.

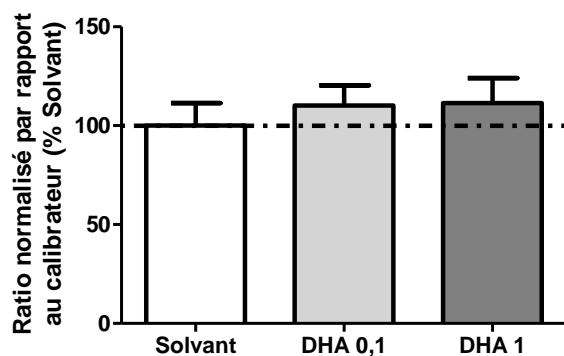


Figure 4 : Effet de doses croissantes de DHA (0 ; 0,1 et 1 mg/kg) sur l'expression relative de RXR γ dans l'hippocampe. Les valeurs représentent les ratios gène cible/gène de référence normalisés par rapport au calibrateur et sont exprimées en pourcentage relatif d'expression par rapport au groupe contrôle.

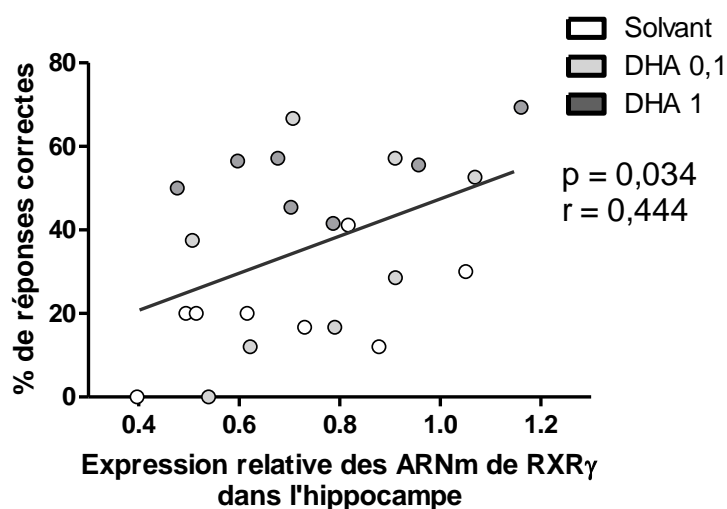


Figure 5 : Corrélation de Pearson entre les performances de mémoire contextuelle (% de réponses correctes dans le test de CSD) et l'expression relative des ARNm de RXR γ dans l'hippocampe de souris âgées de 18 mois ($n = 23$; $r = 0,444$; $p = 0,034$).

Tableau 1 : Composition en acides gras (% des acides gras totaux) de la phosphatidyléthanolamine hippocampique de souris âgées de 18 mois ayant reçu des injections ip. de 0 ; 0,1 ; 1 mg de DHA/kg de poids corporel.

Acides Gras	Solvant	DHA 0,1	DHA 1
20:4(n-6)	10,54 ± 0,16	10,60 ± 0,13	10,24 ± 0,11
20:5(n-3)	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22:5(n-6)	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,00	0,24 ± 0,01
22:5(n-3)	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01
22:6(n-3)	19,36 ± 0,25	19,41 ± 0,26	19,07 ± 0,35
AGS	36,71 ± 0,25	36,83 ± 0,23	36,94 ± 0,14
AGMI	31,55 ± 0,36	31,34 ± 0,42	31,97 ± 0,44
AGPI	31,62 ± 0,41	31,69 ± 0,40	30,97 ± 0,47
AGPI n-6	11,63 ± 0,17	11,70 ± 0,15	11,31 ± 0,14
AGPI n-3	19,64 ± 0,25	19,69 ± 0,26	19,34 ± 0,35

Les valeurs sont exprimées sous la forme pourcentage moyen ± ESM. 20:4(n-6) : acide arachidonique ; 20:5(n-3) : acide eicosapentaénoïque ; 22:5(n-6) : acide docosapentaénoïque n-6 ; 22:5(n-3) : acide docosapentaénoïque n-3 ; 22:6(n-3) : acide docosahexaénoïque ; AGS : acides gras saturés ; AGMI ; acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

- Aid S, Bosetti F. 2007. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. *Brain Res Bull* 73: 108-113.
- Belayev L, Marcheselli VL, Khoutorova L, Rodriguez de Turco EB, Busto R, Ginsberg MD, Bazan NG. 2005. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke* 36: 118-123.
- Beracochea D, Philippin JN, Meunier S, Morain P, Bernard K. 2007. Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. *Psychopharmacology (Berl)* 193: 63-73.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23: 3807-3819.
- Brossaud J, Roumes H, Moisan MP, Pallet V, Redonnet A, Corcuff JB. 2013. Retinoids and glucocorticoids target common genes in hippocampal HT22 cells. *J Neurochem* 125: 518-531.
- Buaud B, Esterle L, Vaysse C, Alfos S, Combe N, Higuieret P, Pallet V. 2010. A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr* 103: 1720-1729.
- Calderon F, Kim HY. 2007. Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77: 227-232.
- Celerier A, Pierard C, Rachbauer D, Sarrieau A, Beracochea D. 2004. Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice. *Learn Mem* 11: 196-204.
- Chauveau F, Pierard C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Beracochea D. 2008. Prefrontal cortex or basolateral amygdala lesions blocked the stress-induced inversion of serial memory retrieval pattern in mice. *Neurobiol Learn Mem* 90: 395-403.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjoval J, Perlmann T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290: 2140-2144.
- DeGeorge JJ, Nariai T, Yamazaki S, Williams WM, Rapoport SI. 1991. Arecoline-stimulated brain incorporation of intravenously administered fatty acids in unanesthetized rats. *J Neurochem* 56: 352-355.
- DeMar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. 2005. alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. *J Neurochem* 94: 1063-1076.
- Denis I, Potier B, Vancassel S, Heberden C, Lavalie M. 2013. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. *Ageing Res Rev* 12: 579-594.
- Dyall SC, Michael-Titus AT. 2008. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med* 10: 219-235.
- Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT. 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 28: 424-439.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P. 1997. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229: 125-129.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21: 6423-6429.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Gao F, Taha AY, Ma K, Chang L, Kiesewetter D, Rapoport SI. 2013. Aging decreases rate of docosahexaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified alpha-linolenic acid by rat liver. *Age (Dordr)* 35: 597-608.

- Georgiadi A, Boekschoten MV, Muller M, Kersten S. 2012. Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. *Physiol Genomics* 44: 352-361.
- Green JT, Orr SK, Bazinet RP. 2008. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J Lipid Res* 49: 939-944.
- Imre SG, Fekete I, Farkas T. 1994. Increased proportion of docosahexanoic acid and high lipid peroxidation capacity in erythrocytes of stroke patients. *Stroke* 25: 2416-2420.
- Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Gregoire S, Bretillon L, Laye S. 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7: e36861.
- Lalonde J, Chaudhuri A. 2002. Task-dependent transfer of perceptual to memory representations during delayed spatial frequency discrimination. *Vision Res* 42: 1759-1769.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40: 1-94.
- Lister JP, Barnes CA. 2009. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol* 66: 829-833.
- Mingaud F, et al. 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28: 279-291.
- Morrison JH, Baxter MG. 2012. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* 13: 240-250.
- Morrison WR, Smith LM. 1964. Preparation Of Fatty Acid Methyl Esters And Dimethylacetals From Lipids With Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608.
- Plourde M, Chouinard-Watkins R, Vandal M, Zhang Y, Lawrence P, Brenna JT, Cunnane SC. 2011. Plasma incorporation, apparent retroconversion and beta-oxidation of 13C-docosahexaenoic acid in the elderly. *Nutr Metab (Lond)* 8: 5.
- Sastry PS. 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24: 69-176.
- Su HM. 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21: 364-373.
- Tafti M, Ghyselinck NB. 2007. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64: 1706-1711.
- Tronche C, Lestage P, Louis C, Carrie I, Beracochea D. 2010. Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res* 215: 255-260.
- Vandesquille M, Krazem A, Louis C, Lestage P, Beracochea D. 2011. S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl)* 215: 709-720.
- Wietrzyk-Schindler M, Szyszka-Niagolov M, Ohta K, Endo Y, Perez E, de Lera AR, Chambon P, Krezel W. 2011. Retinoid x receptor gamma is implicated in docosahexaenoic acid modulation of despair behaviors and working memory in mice. *Biol Psychiatry* 69: 788-794.

Discussion générale

Dans les pays industrialisés d'Europe et d'Amérique du Nord, les données de la consommation lipidique obtenues au cours de ces dernières décennies font état d'un apport insuffisant en AGPI n-3, et plus particulièrement en DHA, en faveur d'une trop grande consommation d'AGPI n-6, au regard des recommandations nutritionnelles (Simopoulos Artemis P. 2011). Ce déséquilibre d'apport alimentaire semble être associé à l'incidence d'un certain nombre d'altérations physiologiques, telles que des atteintes du fonctionnement cérébral au cours du vieillissement (Cunnane et al. 2009). En effet, de nombreux travaux ont rapporté l'implication des AGPI n-3 et notamment du DHA dans nombre de manifestations comportementales et neurophysiologiques, notamment le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement normal ou pathologique (Denis et al. 2013). Ainsi les AGPI-LC n-3 seraient impliqués dans la modulation des processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances mnésiques (Su, 2010). Parmi les différents modes d'action des AGPI-LC n-3, il est désormais bien admis qu'ils peuvent moduler l'expression du génome en se liant à des récepteurs nucléaires tels que les PPAR ou les RXR, qui agissent en tant que facteurs de transcription.

Outre les AGPI n-3, la vitamine A, nutriment liposoluble, est connu pour jouer un rôle essentiel dans le fonctionnement du cerveau adulte. En effet l'acide rétinoïque (AR), son principal métabolite actif, peut moduler des mécanismes de plasticité cérébrale par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires RAR et RXR. Ainsi, un certain nombre de travaux menés dans notre laboratoire ont démontré l'implication de la vitamine A, et plus précisément de l'AR, dans le maintien des capacités mnésiques au cours du vieillissement chez l'animal (Mingaud et al. 2008, Touyarot et al. 2013, Etchamendy et al. 2001).

Sur la base de ces éléments, un certain nombre de données font état de multiples niveaux d'interactions entre la voie de signalisation des AGPI n-3 et celle des rétinoïdes dans l'organisme, notamment au niveau moléculaire en raison d'une part, de l'hétérodimérisation commune des PPAR et des RAR avec le RXR, mais aussi du rôle majeur de RXR en tant que ligand potentiel des acides gras et des rétinoïdes. Ainsi, des travaux menés au laboratoire ont montré qu'un régime alimentaire riche en acides gras saturés, à l'origine de la mise en

place d'un profil de déficience en AGPI n-3 au niveau circulant et cérébral, induisait une altération de la voie de signalisation des rétinoïdes et des acides gras, associée à une altération de la plasticité synaptique (Buaud et al. 2010).

Dans ce contexte, l'objectif général de notre travail était de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'action bénéfique des AGPI n-3 sur les processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances mnésiques au cours du vieillissement, notamment en abordant de manière spécifique les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes.

La première approche expérimentale mise en œuvre au cours de ce travail a consisté à étudier sur un modèle de vieillissement développé chez le rat, les effets de suppléments nutritionnelles en AGPI-LC n-3 *via* un régime composé d'huile de poisson riche en EPA et en DHA, administré seul ou en association avec un régime riche en vitamine A.

Ces régimes ont été administrés chez des rats âgés à mi-vie (13 mois) sur une période de 5 mois, parallèlement à l'administration d'un régime contrôle (équilibré en précurseurs LA et ALA ainsi qu'en vitamine A) chez des rats âgés et adultes (3 semaines) durant la même période.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser sur notre modèle de vieillissement, les effets de l'âge puis de l'apport en EPA/DHA sur le profil de composition en acides gras des compartiments sanguins et cérébral, avec un intérêt particulier pour trois structures cérébrales impliquées dans les fonctions mnésiques que sont l'hippocampe, le striatum et le cortex préfrontal (Henke et al. 2010). En effet, des données issues de la littérature font état de modifications du métabolisme lipidique au cours du vieillissement, à l'origine notamment de modifications de composition en AGPI n-3 aussi bien au niveau circulant que cérébral. Cependant, il convient de préciser que ces modifications varient en fonction du modèle animal étudié, du régime utilisé ainsi que des tissus analysés. Les investigations ainsi réalisées pour mener à bien la caractérisation de notre modèle ont également consisté à identifier, dans le cadre du développement d'une stratégie de prévention du déclin cognitif par voie nutritionnelle, de possibles marqueurs sanguins du statut cérébral en AGPI n-3 au cours du vieillissement et en réponse à une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet des suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou en vitamine A sur les performances de mémoire spatiale des animaux au cours du vieillissement. Pour ce faire, les animaux ont été testés *via* le paradigme du labyrinthe aquatique de Morris dans une tâche de mémoire spatiale de référence puis dans une tâche de mémoire spatiale de travail, qui toutes deux font appel à l'intégrité de l'hippocampe (Henke et al. 2010, Newman and Grace 1999). A l'issue de cette évaluation comportementale, nous avons étudié au sein de l'hippocampe, l'effet des différents régimes sur les niveaux d'expression des transcrits des récepteurs nucléaires des AGPI-LC n-3 et de l'AR en raison de son rôle essentiel dans ce type de tâche comportementale. De plus l'expression des récepteurs nucléaires dans l'hippocampe est très sensible aux variations du statut cérébral en vitamine A et en acides gras (Arfaoui et al. 2013, Dyall et al. 2010). Outre l'expression des récepteurs nucléaires des acides gras et des rétinoïdes, nous avons également évalué l'expression de kinases pouvant être impliquées dans la réponse cellulaire de l'AR et du DHA (Al Tanoury et al. 2013, Chen J. and Kelly 1996, Zassadowski et al. 2012) et induire la modulation de la plasticité synaptique sous-tendant les processus mnésiques (Carlezon et al. 2005, Lisman et al. 2002).

Parallèlement à ces investigations, nous avons développé une approche pharmacologique afin de préciser les mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'action bénéfique spécifique du DHA sur les processus mnésiques au cours du vieillissement. Cette approche, qui permet de nous affranchir des étapes métaboliques et de la mobilisation intracellulaire du DHA, a consisté à étudier l'effet, chez des souris âgées *via* différents tests comportementaux, de doses croissantes de DHA injectées par voie intrapéritonéale sur les performances de mémoires de travail et contextuelle, dépendantes de l'hippocampe (Chauveau et al. 2005, Lalonde and Chaudhuri 2002). Cette évaluation a été complétée par la mesure du niveau d'expression des ARNm de différents récepteurs nucléaires dans l'hippocampe. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au RXR γ connu pour être impliqué dans les mécanismes d'action du DHA et jouant un rôle dans les processus mnésiques chez l'animal adulte (Wietrych-Schindler M. et al. 2011a, Wietrych et al. 2005).

Les résultats de ces travaux ont contribué à mettre en évidence les altérations métaboliques et moléculaires participant à la mise en place des déficits cognitifs au cours du vieillissement. Ils ont aussi permis de mieux comprendre les interactions aux niveaux

métaboliques et cellulaires entre la voie de signalisation des AGPI-LC n-3 et celle des rétinoïdes impliquées dans la régulation des processus neurobiologiques sous-tendant les performances mnésiques.

I - Résumé des principaux résultats obtenus

I.1 : Première étude : Effets du vieillissement et d'une supplémentation

nutritionnelle en EPA/DHA sur les contenus sanguins et cérébraux en AGPI-LC

n-3 : Recherche de biomarqueurs sanguins du statut cérébral en DHA

Afin de caractériser sur notre modèle de vieillissement, l'effet de l'âge sur le statut sanguin et cérébral en acides gras, ainsi que les effets d'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA, nous avons déterminé les profils en acides gras totaux du plasma ainsi que celui de deux fractions phospholipidiques membranaires majeures (*i.e.* la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC)) au sein des membranes érythrocytaires, ainsi qu'au sein des membranes de l'hippocampe, du striatum et du cortex préfrontal. Brièvement, nos résultats mettent en évidence une augmentation des contenus en AGPI-LC n-3 (EPA, DPA n-3, DHA) et AGPI-LC n-6 (LA, ARA) dans le plasma au cours du vieillissement ; les compositions en EPA et en DHA des membranes érythrocytaires restant stables. Parallèlement, nos données ont mis en évidence que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des proportions cérébrales en AGPI-LC n-3, associée à une augmentation de celles en AGPI-LC n-6. Ces modifications s'avèrent être hétérogènes selon la structure cérébrale et la classe de phospholipides étudiées. Ainsi il ressort de ces données que l'hippocampe et le striatum sont deux structures cérébrales vulnérables aux effets du vieillissement, compte tenu des variations de composition en acides gras observées, le cortex préfrontal ne présentant pas de modification du contenu en AGPI-LC. De plus, la diminution des contenus cérébraux en DHA avec l'âge est plus importante au sein de la PC que de la PE, cette dernière semblant être une fraction phospholipidique relativement bien protégée contre les variations de composition en acides gras.

Concernant les effets de la supplémentation en AGPI-LC n-3, nos résultats montrent une forte augmentation des proportions en AGPI-LC n-3 chez les animaux supplémentés en EPA/DHA à la fois dans le pool circulant et les membranes cérébrales. Cependant, comme

pour la diminution des proportions en AGPI-LC n-3 induite par le vieillissement, la réplétion en AGPI-LC n-3 induite par la supplémentation n'est pas uniforme selon la structure cérébrale et la classe de phospholipides analysées. En effet, la supplémentation en EPA/DHA n'a pas eu d'effet significatif sur les contenus en DHA de la PC corticale et striatale. Prises dans leur ensemble, ces données ont permis de mettre en évidence que le contenu en DHA du pool circulant, tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire, ne semble pas être un indicateur pertinent de l'évolution du statut cérébral en DHA chez l'animal âgé. En revanche, en situation de supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA, nos données montrent que le contenu en DHA au sein de la PE érythrocytaire pourrait être un bon indicateur des niveaux de DHA contenu dans la PE hippocampique et la PE corticale chez l'animal âgé.

Dans le contexte de l'élaboration d'une stratégie de prévention du déclin cognitif lié à l'âge par voie nutritionnelle, ces données présentent un intérêt particulier. En effet, l'utilisation d'un tel biomarqueur chez l'Homme pourrait permettre d'apprécier le statut cérébral en AGPI n-3 de sujets âgés de manière non invasive, dans le cadre de suppléments nutritionnelles en AGPI n-3 apportés seuls ou en association avec d'autres nutriments.

I.2 : Effets de suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A sur la mémoire spatiale au cours du vieillissement et implication des voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes

Dans cette étude, nous avons étudié les effets d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC n-3 administrée seule ou en combinaison avec de la vitamine A, chez des rats âgés à partir de la mi-vie, sur une période de 5 mois.

Comme précédemment, la composition en acides gras des membranes cérébrales a été évaluée au niveau de la PC hippocampique pour chaque groupe de rats (adultes et âgés soumis au régime contrôle, âgés supplémentés en EPA/DHA et/ou vitamine A). Les résultats obtenus montrent d'une part une diminution du contenu en DHA au sein de la PC hippocampique, au profit d'une augmentation du contenu membranaire en ARA au cours du vieillissement. Outre les effets de l'âge déjà observés dans la précédente étude, l'analyse de la composition en acides gras de la PC hippocampique pour les animaux ayant consommé un régime riche en EPA/DHA (groupes Âgés EPA/DHA et Âgés EPA/DHA + vitamine A), montre

que la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA permet de maintenir les contenus membranaires en AGPI-LC n-3 à un niveau similaire à celui des animaux adultes ayant consommé le régime contrôle. Ces résultats valident ainsi notre modèle de supplémentation nutritionnelle en huile de poisson riche en AGPI n-3 à partir de la mi-vie chez le rat.

Par ailleurs, afin de vérifier l'effet de la supplémentation nutritionnelle en vitamine A, nous avons mesuré les concentrations en rétinol plasmatique dans les 5 groupes de rats. Cette concentration était plus faible chez les rats âgés et ce, indépendamment de la supplémentation nutritionnelle, suggérant une altération du métabolisme de la vitamine A chez les animaux âgés.

Après 4 mois de régime, les performances de mémoire spatiale de référence et de mémoire spatiale de travail ont été évaluées dans le labyrinthe aquatique de Morris. Nos résultats mettent en évidence un effet bénéfique du régime supplémenté en EPA/DHA sur les performances de mémoire de travail pour un intervalle inter-essais de 30 secondes, cet effet disparaissant pour un intervalle inter-essais plus long. Ceci suggère que l'efficacité de la supplémentation en AGPI-LC n-3 est limitée, puisque elle n'est plus significative lorsque le niveau de difficulté de la tâche est augmenté. En ce qui concerne la mémoire de référence, les suppléments nutritionnelles n'ont pas eu d'effet sur les performances d'apprentissage. En revanche, une analyse sur les 20 premières secondes du test de rappel fait apparaître un effet bénéfique de la supplémentation en vitamine A seule sur les performances mnésiques des rats âgés. Enfin, notre résultat le plus important est la mise en évidence pour la première fois d'un effet bénéfique synergique des suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et en vitamine A sur les performances de mémoire de référence au cours du test de rappel.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet bénéfique des suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou en vitamine A, nous nous sommes intéressés aux niveaux d'activité des voies de signalisation génomiques et non génomiques associées aux acides gras et aux rétinoïdes. Nos résultats mettent en évidence une diminution de l'expression des transcrits de $RAR\alpha$, $RXR\beta$ et $RXR\gamma$ dans l'hippocampe, au cours du vieillissement, ainsi qu'un maintien partiel du niveau d'expression des ARNm de $RXR\gamma$ sous l'effet de la supplémentation en EPA/DHA + vitamine A.

Parallèlement, alors que les niveaux d'expression des ARNm de CAMKII, kinase pouvant être régulée par l'AR (Chen et al. 1996) et de ERK1/2, CREB et AKT, kinases associées aux effets non génomiques de l'AR et des AGPI-LC n-3 (Al Tanoury et al. 2013, Akbar et al. 2005), s'avèrent être diminués dans l'hippocampe des rats âgés contrôle, il apparaît que la supplémentation en vitamine A permette de maintenir en partie les niveaux d'expression des ARNm de ERK1, ERK2, CREB, CAMKII et AKT. Cet effet est potentialisé chez les animaux ayant consommé un régime enrichi en EPA/DHA + vitamine A, notamment pour ERK1 et AKT.

Enfin, la mesure du niveau d'expression des protéines ERK1/2 et AKT qui se trouve être plus faible dans l'hippocampe des rats âgés contrôle par comparaison aux rat adultes contrôle, met en évidence un maintien de l'expression de ces deux protéines uniquement chez les animaux ayant consommé le régime enrichi en EPA/DHA + vitamine A. Le niveau d'expression des formes phosphorylées de ces deux protéines n'est quant à lui pas modifié sous l'effet de l'âge ou des supplémentations nutritionnelles en EPA/DHA ou en vitamine A.

I.3 : Etude des effets d'injections de DHA non estérifié sur les performances mnésiques d'animaux âgés : Implication du RXR γ

Afin d'étudier plus précisément les effets bénéfiques du DHA sur les performances de mémoire au cours du vieillissement, nous nous sommes affranchis des étapes métaboliques consécutives à l'administration par voie nutritionnelle de DHA et avons donc étudié l'effet de doses croissantes de DHA non-estérifié (0,1 ; 1 ; 3 et 10 mg/kg de poids corporel) administré par voie-intra-péritonéale chez la souris âgée.

Nos résultats mettent en évidence un effet dose-réponse sur les performances de mémoire de travail évaluée dans un labyrinthe en T. Seules les doses de 0,1 et 1 mg de DHA/kg de poids corporel ont des effets bénéfiques sur les performances d'alternance spontanée chez la souris âgée mesurées dans nos conditions expérimentales, les doses de 3 et 10 mg de DHA/kg n'ayant pas d'effet. Afin de confirmer nos premiers résultats dans un test évaluant un autre type de mémoire, nous avons étudié l'effet des deux doses efficaces de 0,1 et 1 mg de DHA/kg sur les performances de mémoire contextuelle dans un test de discrimination sérielle et contextuelle. Nos résultats mettent en évidence un effet bénéfique de la dose de 1 mg de DHA/kg sur les performances de mémoire contextuelle, par

comparaison avec les performances des animaux contrôles. Ces résultats confirment donc l'effet bénéfique de l'administration de DHA dans un autre type de test, dont la réalisation est également dépendante de l'hippocampe. La dose de 0,1 mg de DHA/kg induit une amélioration des performances à un niveau intermédiaire entre celui du groupe solvant et celui du groupe ayant reçu la dose de 1 mg de DHA/kg, confirmant ainsi l'effet dose-réponse obtenu dans la première expérience.

De plus, nous avons mesuré les niveaux d'expression hippocampique des ARNm des RAR, RXR et PPAR, récepteurs nucléaires impliqués dans les voies de signalisation des AGPI-LC n-3 et des rétinoïdes. Nos résultats ne mettent pas en évidence de modification significative de l'expression de ces récepteurs induite par l'administration de DHA non estérifié. En revanche, les performances mnésiques des animaux sont positivement corrélées au niveau d'expression de RXR γ dans l'hippocampe, soulignant son rôle essentiel dans la modulation des performances mnésiques.

II – Les altérations métaboliques et cellulaires des voies de signalisation des AGPI n-3 et des rétinoïdes induites par le vieillissement participent à la mise en place des déficits mnésiques

II.1 : Le vieillissement est associé à des altérations métaboliques et à des modifications de la composition cérébrale en AGPI-LC n-3

Les données acquises au cours de ce travail de thèse font état de multiples altérations métaboliques intervenant au cours du vieillissement. En effet, les données obtenues dans la première étude suggèrent une altération du métabolisme des lipides au cours du vieillissement. En effet, le vieillissement est associé à une augmentation du pool circulant d'AGPI n-6 et n-3, notamment dans le plasma. Ces résultats sont en accord avec des données précédemment obtenues tant chez l'animal que chez l'Homme, et qui ont mis en évidence une augmentation des taux circulants d'AGPI au cours du vieillissement, et ce indépendamment de la prise alimentaire (Engler et al. 1998, Fortier et al. 2010, Otsuka et al. 2013). Ces modifications traduisent une altération du métabolisme des lipides et suggèrent une possible diminution de la biodisponibilité des AGPI n-3, notamment pour le cerveau. L'accumulation d'AGPI dans le pool circulant pourrait être attribuée (i) : à une augmentation

de l'activité des enzymes permettant la conversion des précurseurs LA et ALA en dérivés à longue chaîne, (ii) une altération du passage des AGPI du pool circulant vers les tissus cibles tels que le cerveau. Cependant, des données ont montré que le vieillissement était associé à une diminution d'environ 30% de l'activité de la Δ -6 désaturase dans le foie chez des rats âgés de 24 mois par comparaison à des rats âgés de 12 mois (Dinh et al. 1993). Ceci suggère donc que l'accumulation des AGPI dans le pool circulant serait due à un défaut d'utilisation par les tissus cibles. Ceci semble être confirmé par le fait que le vieillissement est associé à une augmentation de la rigidité membranaire de la barrière hémato-encéphalique, pouvant induire une altération de sa perméabilité pour les acides gras (Yehuda et al. 2005) et ainsi contribuer à l'altération de la biodisponibilité des AGPI pour le cerveau.

En outre, une étude menée chez le rat a rapporté une diminution du pool de DHA non estérifié dans le plasma au cours du vieillissement (Gao et al. 2013), suggérant une altération de la biodisponibilité du DHA dans sa forme active pour les tissus cibles dont le cerveau. Nos résultats montrant une diminution globale du contenu en AGPI n-3 cérébral sont ainsi cohérents avec l'hypothèse d'une altération de la biodisponibilité des AGPI n-3 au cours du vieillissement.

Il convient de signaler qu'au cours du vieillissement, la baisse du contenu cérébral en DHA n'affecte pas de façon homogène les différentes régions cérébrales. Ainsi, nous montrons une plus grande vulnérabilité de l'hippocampe et du striatum vis à vis des effets délétères du vieillissement, notamment au sein de la PC, pour laquelle la baisse du contenu en DHA est la plus importante par comparaison avec la PE. Ces données suggèrent donc que le cortex préfrontal serait moins sensible, ou de façon plus tardive, aux effets délétères du vieillissement comparativement à l'hippocampe et au striatum. Une variation hétérogène des profils de composition en acides gras en fonction des régions cérébrales a déjà été observée dans un modèle de déficience en AGPI n-3 chez le rat (Xiao et al. 2005). Une explication possible de ces effets différentiels pourrait être liée à la composition phospholipidique de ces régions cérébrales. En effet, les membranes du cortex préfrontal sont constituées majoritairement de PE alors que la PC est la fraction phospholipidique prédominante dans les membranes du striatum et de l'hippocampe (Dyall et al. 2007). Compte tenu de nos résultats, suggérant que la PC serait plus sensible aux variations de composition en acides gras au cours du vieillissement que la PE, cette différence de contenu

en phospholipides pourrait expliquer la plus grande stabilité de la composition en acides gras membranaires du cortex, comparativement à l'hippocampe et au striatum. Cette hypothèse est également supportée par une étude de Rapoport S.I et al. (2001), qui a mis en évidence sur un modèle de rat anesthésié ayant reçu une injection de DHA par voie intraveineuse, une demi-vie du DHA plus courte dans la PC (22 h) que dans la PE (58 h).

Parallèlement à la baisse des contenus cérébraux en DHA, le vieillissement est également caractérisé par une diminution de l'activité de la phospholipase A2 Ca^{2+} indépendante (iPLA2), qui permet, dans la cellule, le clivage des molécules de DHA estérifiées dans les phospholipides membranaires et leur libération sous forme non estérifiée, dans la cellule (Aid and Bosetti 2007, Green J. T. et al. 2008). Le DHA ainsi libéré est capable d'induire l'activation de cascades de signalisation cellulaire impliquées dans les processus de plasticité synaptique notamment (Crupi et al. 2013, Wu A. et al. 2011). Ainsi, les résultats obtenus au cours de nos travaux suggèrent une altération de la biodisponibilité du DHA dans sa forme active ou non estérifiée pour activer les voies de signalisation des récepteurs nucléaires ainsi que des voies de signalisation non-génomiques.

Par ailleurs, les données issues de la deuxième étude mettent en évidence des altérations du métabolisme de la vitamine A. Ainsi, la concentration en rétinol sérique est fortement diminuée chez les rats âgés de 18 mois par comparaison à des rats âgés de 5 mois. Ces observations sont en accord avec plusieurs études ayant décrit une baisse de la concentration en rétinol circulant tant chez l'animal âgé (Van der Loo 2004, Féart et al. 2005, Touyarot et al. 2013) que chez l'Homme âgé (Haller et al. 1996). Dans la littérature, cette baisse est expliquée par la perte progressive avec l'âge de la capacité à mobiliser et utiliser la vitamine A stockée dans le foie (Borel et al. 1998, Azais-Braesco et al, 1995), ce qui se traduit par une baisse de la biodisponibilité de la vitamine A pour les tissus cibles tels que le cerveau. Des données acquises au laboratoire ont également permis de mettre en évidence une augmentation du niveau d'expression des transcrits de la CRABP1 dans les cellules hippocampiques de rats âgés de 18 mois par comparaison à des rats de 5 mois (Touyarot et al. 2013). Or, plusieurs études suggèrent que cette protéine permet de réguler la biodisponibilité de l'AR dans la cellule et ainsi son action sur les récepteurs nucléaires (Maden et al. 1988, Ong et al. 1994). Ainsi, il semble que le vieillissement soit aussi associé à une diminution de la biodisponibilité de l'AR au niveau cérébral.

II.2 : Le vieillissement est associé à des altérations des voies de signalisation cellulaire des AGPI n-3 et des rétinoïdes, participant à la mise en place des déficits mnésiques

Les données rapportées dans ce mémoire concernant l'expression des récepteurs nucléaires montrent une hypoexpression des isotypes RAR α , RAR β et RXR γ dans l'hippocampe qui traduisent une altération des voies de signalisation des rétinoïdes et des AGPI n-3. L'hypoexpression des récepteurs RAR et RXR pourrait être la conséquence directe d'une diminution de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR. En effet, il est maintenant admis que l'expression de certaines isoformes des RAR telles que RAR α 2, RAR β 2 et RAR γ 2, est auto-réglée par leur ligand, l'AR (Blomhoff et al. 2002). Les mécanismes de la régulation des RXR sont moins bien connus. Des études ont cependant montré une régulation des RXR par l'AR ou son isomère l'acide 9-*cis* rétinoïque dans certains modèles cellulaires (Wan et al. 1994, Duprez et al. 1996). Par ailleurs, des études précédemment menées au laboratoire ont montré une diminution de l'expression de certains transcrits des RXR et RAR dans le cerveau de rongeurs déficients en vitamine A ou âgés, qui pouvait être reversée par l'administration d'AR (Enderlin et al. 1997b, Husson et al. 2006).

En outre, un certain nombre de données cohérentes indiquent que la baisse d'activité des voies de signalisation des récepteurs nucléaires des acides gras et des rétinoïdes, étudiée sur des modèles de souris transgéniques, de carence en vitamine A ou même de vieillissement, est associée à des altérations de la plasticité synaptique (Etchamendy et al. 2001, Etchamendy et al. 2003, Nomoto et al. 2012) et de la neurogenèse hippocampique (Touyarot et al. 2013, Bonnet et al. 2008), participant ainsi à la mise en place de déficits mnésiques.

D'autres voies de signalisation cellulaire, dont l'activité peut également être régulée en réponse aux AGPI n-3 et à l'AR sont affectées au cours du vieillissement. En effet nos résultats mettent en évidence une diminution de l'expression des transcrits de plusieurs kinases impliquées dans la modulation de la plasticité synaptique et pouvant être régulées de manière directe par l'AR, comme c'est le cas pour la CAMKII qui possède dans son promoteur un élément de réponse à l'acide rétinoïque RARE (Wang L. et al. 2008). La CAMKII est une kinase présente en abondance dans les tissus cérébraux puisqu'elle représente 1 à 2

% des protéines cérébrales totales, ce qui lui confère un rôle majeur dans le fonctionnement cérébral, notamment dans la régulation de la transmission synaptique (Lisman et al. 2002). D'autres études ont également rapporté que le statut nutritionnel en DHA pouvait moduler l'expression de la CAMKII dans le cerveau. En effet, une étude a montré une diminution de l'expression des transcrits de la CAMKII dans le cortex de souris transgéniques Tg2576 modèle de la maladie d'Alzheimer, déficientes en AGPI n-3. Toutefois, une supplémentation nutritionnelle en DHA permettait de prévenir cette baisse d'expression (Calon et al. 2005). D'autre part, il a été montré une diminution de l'expression protéique de la CAMKII et de CREB au niveau de l'hippocampe, consécutivement à une lésion cérébrale. Ces niveaux d'expression étaient normalisés par l'administration d'une supplémentation nutritionnelle en DHA (Wu et al. 2011). Ainsi, la diminution de la biodisponibilité en AR et en DHA pour le cerveau pourrait être la cause de la diminution de l'expression de la CAMKII, induisant alors une altération de la plasticité synaptique.

Le vieillissement est également associé à une diminution de l'expression des ARNm ainsi que des protéines appartenant aux voies de signalisation des MAPK, telles que ERK1/2, capables d'induire l'activation du facteur de transcription CREB, qui joue un rôle majeur dans la régulation de la plasticité synaptique en induisant l'expression de gènes impliqués notamment dans la potentialisation à long terme (Xia and Storm 2012). D'autre part nous avons mis en évidence au cours de ce travail une altération de la voie de signalisation des phosphatidylinositol-3 kinases (PI-3K), à laquelle appartient la kinase AKT. Cette voie est également impliquée dans la modulation de la plasticité synaptique puisqu'elle permet notamment de réguler la survie neuronale (Kaplan and Miller 2000).

Considérant l'ensemble de ces données, le vieillissement est ainsi accompagné de multiples altérations de la plasticité synaptique, contribuant de manière importante à la mise en place des déficits mnésiques que nous avons observés dans nos études expérimentales. En effet, un certain nombre d'études ont pu mettre en évidence l'implication de ces kinases dans la régulation des processus mnésiques, notamment dans la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe (Carlezon et al. 2005, Lisman et al. 2002, Giese and Mizuno 2013).

III : Une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A permet de prévenir les déficits mnésiques liés à l'âge

III.1 : Conséquences métaboliques de la supplémentation en AGPI n-3 et en vitamine A au cours du vieillissement

Les résultats des travaux de cette thèse ont montré qu'un apport alimentaire enrichi en vitamine A ne permettait pas de prévenir la baisse de la concentration en rétinol plasmatique liée à l'âge. Ces données sont cohérentes avec celles d'une étude menée récemment dans notre laboratoire sur le même modèle de supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez l'animal âgé (Touyarot et al. 2013). Les altérations du métabolisme hépatique décrites dans la littérature au cours du vieillissement, notamment une perte de la capacité à mobiliser et à utiliser la vitamine A à partir du foie, pourraient constituer une explication de ces résultats (Borel et al. 1998, Azais-Braesco et al. 1995). De plus, il a été montré qu'en situation de carence vitaminique A, la vitamine A nouvellement absorbée pouvait être directement utilisée au niveau des tissus cibles en fonction des besoins de l'organisme (Ross et al. 2009). Ces dernières données suggèrent donc que les effets cellulaires induits par la supplémentation nutritionnelle en vitamine A sont indépendants de la capacité du foie à mobiliser les stocks de vitamine A. Notons également que le cerveau adulte possède toute la machinerie nécessaire à la synthèse de l'AR à partir du rétinol circulant, en particulier dans le striatum et dans les méninges adjacentes à l'hippocampe (Mc Caffery et Drager. 1994, Sakai et al. 2004), ce qui suggère que la supplémentation nutritionnelle en vitamine A permettrait de maintenir la biodisponibilité de l'AR dans le cerveau.

Par ailleurs, les données obtenues au cours de ce travail de thèse mettent en évidence une nette augmentation des contenus sanguins et cérébraux en AGPI n-3, notamment au niveau de l'hippocampe, permettant ainsi de prévenir la diminution du contenu en AGPI n-3 dans les membranes cérébrales induite par le vieillissement. Cet effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle sur la composition en acides gras des membranes cérébrales et sur les performances mnésiques chez la souris âgée a déjà été observé dans le cas d'une durée de supplémentation identique (Lim S.-Y. and Suzuki 2000). Ces données suggèrent que la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA permettrait de

maintenir les voies de signalisation cellulaires des AGPI n-3 impliquées dans la modulation des processus mnésiques (Kelly et al. 2011).

III.2 : La supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A permet de maintenir les voies de signalisation cellulaires des AGPI n-3 et des rétinoïdes et participe au maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement

Les travaux rapportés dans ce mémoire suggèrent que la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A induit des modifications métaboliques ainsi qu'une modulation des voies de signalisation cellulaires associées à ces nutriments, participant au maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement.

Chez les animaux âgés nous avons montré que la supplémentation en vitamine A permet de maintenir le niveau d'expression de kinases telles que la CAMKII, AKT et les MAPK ERK1/2. Ces données suggèrent une régulation directe ou indirecte de l'expression de ces kinases dans l'hippocampe par l'AR au cours du vieillissement.

Par ailleurs, nos résultats mettent également en évidence un effet synergique de la supplémentation en EPA/DHA + vitamine A sur l'expression des transcrits de ERK1 ainsi que sur les niveaux d'expression des ARNm et de la protéine AKT. Il est admis que l'AR, par l'intermédiaire de leurs récepteurs nucléaires RAR, peuvent agir de manière similaire sur les voies de signalisation des MAPK et des PI-3K et induire l'activation de ces kinases *via* une action non génomique (Al Tanoury et al. 2013).

De nombreuses données de la littérature ont rapporté une régulation de la voie des MAPK et de la voie des PI-3K *via* des effets non génomiques des récepteurs nucléaires, de l'AR notamment (Al Tanoury et al. 2013, Gronemeyer et al. 2004). En effet, bien que la majorité des récepteurs nucléaires se trouvent dans le noyau des cellules, il a été montré qu'une sous-population de ces récepteurs pouvait être localisée à proximité de la membrane, qui en réponse à la fixation de leur ligand, peuvent induire directement la phosphorylation de kinases conduisant à l'activation de voies de signalisation

indépendamment de la voie génomique dite « classique » (Cañon et al. 2004, Al Tanoury et al. 2013).

En outre, nos résultats sont en accord avec des études menées sur des modèles cellulaires montrant une induction de ces voies de signalisation par l'AR (Chen N. and Napoli 2008) et par le DHA (Akbar et al. 2005, Wu Haitao et al. 2009) accompagnée de modifications de la plasticité synaptique et de la neuritogenèse.

Cependant, notons que les données issues de nos travaux mettent en évidence une augmentation des transcrits des MAPK, d'AKT et de CAMKII en réponse aux suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou en vitamine A. Ceci suggère que les suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et/ou vitamine A peuvent moduler *via* une action génomique la transcription de ces kinases comme cité précédemment (Calon et al. 2005).

Par ailleurs, les données obtenues au cours de ces travaux mettent en évidence un effet synergique des suppléments en EPA/DHA et en vitamine A sur l'expression des ARNm de RXR γ . Rappelons que RXR est le partenaire commun d'hétérodimérisation d'un grand nombre d'autres récepteurs nucléaires, dont les RAR et les PPAR, respectivement, récepteurs classiques de l'AR et des acides gras (Olefsky et al. 2001). Ce récepteur nucléaire, considéré à l'origine comme le récepteur de l'AR 9-*cis* peut également lier le DHA (Lengqvist et al. 2004, de Urquiza et al. 2000), lui conférant un rôle majeur dans la modulation de l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des AGPI n-3. Les suppléments en EPA/DHA et en vitamine A donnés séparément ne permettaient pas de prévenir la baisse d'expression du RXR γ au cours du vieillissement. Cependant nous avons démontré une action conjointe de ces deux types de nutriments permettant de maintenir partiellement son expression. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le vieillissement serait associé à une diminution de la biodisponibilité cellulaire du DHA, qui pourrait être due en partie à l'hypoexpression de l'iPLA2 permettant la libération de la forme active du DHA à partir des phospholipides membranaires. Cependant nous observons qu'en dépit de l'enrichissement des membranes cérébrales en DHA induit par la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA, l'action du DHA sur les voies de signalisation cellulaires reste altérée. Toutefois, la supplémentation nutritionnelle en vitamine A pourrait induire une activation de cette phospholipase et permettre d'augmenter la biodisponibilité du DHA au sein de la cellule. En

effet, une étude menée sur un modèle cellulaire a mis en évidence une activation de l'iPLA2 induite par l'AR (Farooqui et al. 2004a). Ainsi, l'action conjointe de l'AR et du DHA pourrait participer au maintien partiel de l'expression de RXR γ au cours du vieillissement. En outre, cette action conjointe pourrait également participer à l'effet synergique de la supplémentation en EPA/DHA et en vitamine A observé sur l'expression des MAPK et de AKT.

L'ensemble des données obtenues concernant la régulation des voies de signalisation de l'AR et des AGPI n-3 est cohérente avec les effets synergiques des suppléments nutritionnelles en EPA/DHA et en vitamine A sur les performances de mémoire de référence évaluées chez le rat âgé. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, les voies des MAPK et des PI-3K sont toutes deux impliquées dans la régulation des processus de plasticité synaptique sous-tendant les performances mnésiques (Giese et Mizuno 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté l'implication de l'isoforme de RXR γ dans la modulation des performances mnésiques chez l'animal adulte (Wietrzych et al. 2005, Wietrzych-Schindler et al. 2011).

De plus, ces études montraient que l'amélioration des performances de mémoire de travail *via* l'activation de RXR γ était induite par l'administration de DHA non estérifié par voie intrapéritonéale. Ainsi, les résultats obtenus dans l'étude pharmacologique visant à étudier les effets de l'administration de DHA non estérifié sur les performances de mémoire de travail et de mémoire contextuelle chez la souris âgée concordent avec ces données bibliographiques. En outre, nos données montrent une corrélation positive avec l'expression des transcrits de RXR γ , confirmant l'implication de ce récepteur dans la modulation des performances mnésiques comme cela avait déjà été suggéré (Blalock et al. 2003).

Toutefois, notons que les résultats obtenus chez le rat âgé ont mis en évidence que la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA permet d'améliorer les performances de mémoire de travail pour un intervalle inter-essais de 30s mais qu'il semble que l'efficacité de ces AGPI n-3 soit limitée puisque les effets bénéfiques de la supplémentation ne sont plus significatifs lorsque le niveau de difficulté est augmenté. Par ailleurs, la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA n'a pas d'effet sur la mémoire spatiale de référence dans nos conditions expérimentales. Ces données suggèrent donc que l'efficacité de la supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA est limitée selon le type de mémoire

étudié, contrairement aux effets bénéfiques de l'administration de DHA non estérifié observés sur notre modèle pharmacologique pour les deux tâches comportementales. Cette différence d'efficacité pourrait être attribuée à une biodisponibilité limitée du DHA actif dans la cellule due à l'hypoactivité de l'iPLA2 (Aïd and Bosetti 2007) chez les rats âgés supplémentés en EPA/DHA.

Ainsi, notre modèle pharmacologique visant à étudier les effets de l'administration de DHA sur la mémoire de travail et contextuelle permettait de s'affranchir des étapes de mobilisation intracellulaire, dont l'activité de l'iPLA2. En effet, il a été montré une incorporation rapide d'ALA non estérifié, administré par voie intraveineuse, au sein des cellules cérébrales (DeMar et al. 2005), suggérant un effet rapide des AGPI n-3 non estérifiés sur les voies de signalisation cellulaires régulées par les acides gras. En outre, l'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence des effets bénéfiques sur la mémoire de travail et la mémoire contextuelle dès le 3^{ème} jour de traitement, montrant ainsi qu'il est possible de reverser les déficits de mémoire déjà établis chez l'animal âgé.

Par ailleurs, les effets bénéfiques du DHA sur le fonctionnement cérébral intervenant dans des délais courts ont déjà été rapportés dans la littérature sur des modèles lésionnels. Ainsi, Belayev et al. (2005) ont mis en évidence sur un modèle de rats ischémiques un effet neuroprotecteur du DHA non estérifié, injecté par voie intrapéritonéale dans un délai d'une heure après l'induction de l'ischémie. Cet effet était accompagné d'une augmentation de la teneur en neuroprotectine D1, formée à partir du DHA non estérifié et connue pour son effet neuroprotecteur (Bazan et al. 2011).

Ainsi l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse confirme l'intérêt de l'utilisation de supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A dans une démarche préventive pour retarder les effets délétères du vieillissement. De plus, nos données mettent en évidence des effets rapides du DHA non estérifié sur le fonctionnement cérébral, soulignant le rôle majeur du DHA dans le fonctionnement cérébral.

Perspectives

Etude chez l'animal et mécanistique

L'ensemble des données rapportées dans ce mémoire fait état d'une altération du métabolisme de la vitamine A mais aussi du métabolisme des lipides au cours du

vieillesse. En conséquence de ces altérations métaboliques, il résulte une hypoexpression des voies de signalisation cellulaires des acides gras et de la vitamine A, participant à la mise en place de déficits de mémoire chez l'animal âgé. Ces observations concernent plusieurs types de voies de signalisation de ces nutriments, mettant en jeu des régulations, passant par des voies génomiques ou non génomiques et pouvant aboutir à des effets synergiques dans la modulation des processus mnésiques. Afin de préciser les mécanismes mis en jeu dans l'effet bénéfique de la vitamine A et des AGPI n-3 sur les processus de plasticité synaptique, il serait opportun de préciser les effets bénéfiques de ces nutriments, tant sur le plan fonctionnel que sur le plan moléculaire par une approche pharmacologique permettant de combiner aisément les effets du DHA et de l'AR. Sur ce modèle, il serait également possible de bloquer les voies d'action des AGPI n-3 et de l'AR par des antagonistes spécifiques des récepteurs nucléaires permettant ainsi de vérifier leur implication potentielle dans les effets comportementaux observés. D'autre part, il serait intéressant de développer un modèle *in-vitro* afin de détailler les mécanismes d'action de molécules uniques ou combinées sur les processus de plasticité synaptique et ainsi de préciser les voies d'action moléculaires mises en jeu par le DHA associé à l'AR.

Perspectives chez l'Homme

La finalité de ce travail de thèse est de pouvoir éprouver chez l'Homme les hypothèses formulées à partir des données obtenues dans les études expérimentales menées chez l'animal.

Ainsi, le laboratoire NutriNeuro et l'ITERG, dans le cadre du consortium NutriMémo, sont actuellement impliqués dans une étude clinique visant à tester le potentiel effet synergique d'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA et en vitamine A sur les performances mnésiques et le bien-être de sujets âgés présentant un déclin cognitif non pathologique. L'efficacité de cette supplémentation sera appréciée grâce au suivi des performances cognitives des sujets, évaluées *via* différents tests de mémoire, ainsi que de différents biomarqueurs pertinents. Les résultats de cette étude, qui seront connus dans le courant de l'année 2016, pourraient contribuer au développement d'un ingrédient lipidique pouvant entrer dans la composition d'aliments fonctionnels et de compléments alimentaires

ciblés sur la prévention des déficits cognitifs et émotionnels qui apparaissent au cours du vieillissement.

Conclusion

Dans un contexte général, ce travail de thèse s'inscrit dans le domaine de la recherche en nutrition humaine, qui a pour but de mieux comprendre les relations entre l'alimentation et la santé. Plus précisément, ce travail visait à comprendre l'implication des AGPI-LC n-3 et de la vitamine A dans les processus de plasticité cérébrale participant au maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement, notamment en étudiant les différents types d'interactions intervenant entre ces voies de signalisation.

Nos résultats contribuent à la démonstration d'un effet bénéfique de suppléments nutritionnels en vitamine A et/ou en EPA/DHA, administrés à titre préventif à partir de la mi-vie. De plus, nous montrons un effet synergique de ces deux types de nutriments sur le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement.

Par ailleurs, nos travaux suggèrent l'implication de plusieurs voies de signalisation cellulaires pouvant interagir entre elles, *via* des effets dits « génomiques » ou non « génomiques ». Ainsi, il semble que la coopération des AGPI n-3 avec l'AR dans la cellule aboutisse à la régulation de l'activité des voies de signalisation classiques, mettant en jeu l'action génomique des récepteurs nucléaires des acides gras et des rétinoïdes. De plus, il semble possible que la régulation des processus de plasticité synaptique induite par ces deux nutriments, mette également en jeu des voies d'actions non génomiques.

Dans le contexte actuel de vieillissement de la population, l'acquisition de connaissances sur les mécanismes participant au maintien des fonctions cognitives au cours du vieillissement représente un intérêt social et économique majeur. C'est pourquoi, l'ensemble de ces travaux s'inscrit dans l'élaboration de stratégies préventives par voie nutritionnelle visant à retarder les effets délétères du vieillissement.

Références bibliographiques

A

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.
- Aid S, Bosetti F. 2007. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. *Brain Res Bull* 73: 108-113.
- Aid S, Vancassel S, Linard A, Laviaille M, Guesnet P. 2005. Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *J Nutr* 135: 1008-1013.
- Aid S, Vancassel S, Poumes-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Laviaille M. 2003. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 44: 1545-1551.
- Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY. 2005. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10858-10863.
- Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. 2013. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and non-genomic effects. *J Lipid Res*.
- Aleshin S, Reiser G. 2013. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)-alpha, beta/delta and gamma triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain. *Biol Chem*.
- Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPAR alpha- and PPAR gamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochemistry International* 63: 322-330.
- Alessandri J-M, Extier A, Astorg P, Laviaille M, Simon N, Guesnet P. 2009. Gender-related differences in omega-3 metabolism. *Nutrition Clinique Et Metabolisme* 23: 55-66.
- Ali R, Campos B, Dyckhoff G, Haefeli WE, Herold-Mende C, Burhenne J. 2012. Quantification of retinoid concentrations in human serum and brain tumor tissues. *Analytica Chimica Acta* 725: 57-66.
- Amate L, Gil A, Ramirez M. 2002. Dietary long-chain PUFA in the form of TAG or phospholipids influence lymph lipoprotein size and composition in piglets. *Lipids* 37: 975-980.
- Anderson GJ, Tso PS, Connor WE. 1994. Incorporation of chylomicron fatty acids into the developing rat brain. *J Clin Invest* 93: 2764-2767.
- Aoe S, Yamamura J, Matsuyama H, Hase M, Shiota M, Miura S. 1997. The positional distribution of dioleoyl-palmitoyl glycerol influences lymph chylomicron transport, composition and size in rats. *J Nutr* 127: 1269-1273.
- Aoyama T, Fukui K, Taniguchi K, Nagaoka S, Yamamoto T, Hashimoto Y. 1996. Absorption and metabolism of lipids in rats depend on fatty acid isomeric position. *Journal of Nutrition* 126: 225-231.
- Arfaoui A, Lobo MVT, Boulbaroud S, Ouichou A, Mesfioui A, Arenas MI. 2013. Expression of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in normal and vitamin A deficient adult rat brain. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 195: 111-121.
- Arranz L, Naudi A, De la Fuente M, Pamplona R. 2013. Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age (Dordr)* 35: 621-635.
- Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noisette N, Galan P, Hercberg S. 2004. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39: 527-535.

- Avramovic N, Dragutinovic V, Krstic D, Colovic M, Trbovic A, de Luka S, Milovanovic I, Popovic T. 2012. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. *Hippokratia* 16: 241-245.
- Azais-Braesco V, Dodeman I, Delpal S, Alexandre-Gouabau MC, Partier A, Borel P, Grolier P. 1995. Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1259: 271-276.

B

- Babenko NA, Semenova YA. 2010. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats. *Exp Gerontol* 45: 375-380.
- Balmer JE, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-1808.
- Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research* 48: 355-374.
- Barcelo-Coblijn G, Hogyes E, Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L, Jr., Nyakas C, Penke Z, Farkas T. 2003. Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11321-11326.
- Bastien J, Rochette-Egly C. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16.
- Bazan NG. 2007. Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid - The proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 4866-4881.
- Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. 2011. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr* 31: 321-351.
- Belayev L, Marcheselli VL, Khoutorova L, de Turco EBR, Busto R, Ginsberg MD, Bazan NG. 2005. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke* 36: 118-123.
- Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S. 2003. Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Mol Aspects Med* 24: 411-420.
- Benani A, Kremarik-Bouillaud P, Bianchi A, Netter P, Minn A, Dauca M. 2003. Evidence for the presence of both peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta in the rat spinal cord. *J Chem Neuroanat* 25: 29-38.
- Beracochea D, Philippin JN, Meunier S, Morain P, Bernard K. 2007. Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. *Psychopharmacology (Berl)* 193: 63-73.
- Bernoud N, Fenart L, Benistant C, Pageaux JF, Dehouck MP, Moliere P, Lagarde M, Cecchelli R, Lecerf J. 1998. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res* 39: 1816-1824.
- Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. 2011. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 4340-4345.
- Bershad SV. 2001. The modern age of acne therapy: A review of current treatment options. *Mount Sinai Journal of Medicine* 68: 279-286.
- Bézar J, Blond JP, Bernard A, Clouet P. 1994. The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod Nutr Dev* 34: 539-568.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23: 3807-3819.

- Blanchard H, Pedrono F, Boulier-Monthean N, Catheline D, Rioux V, Legrand P. 2013. Comparative effects of well-balanced diets enriched in alpha-linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88: 383-389.
- Blomhoff R. 1994. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 52: S13-23.
- Blondeau N, et al. 2009. Subchronic Alpha-Linolenic Acid Treatment Enhances Brain Plasticity and Exerts an Antidepressant Effect: A Versatile Potential Therapy for Stroke. *Neuropsychopharmacology* 34: 2548-2559.
- Bonnet E, Touyarot K, Alfos S, Pallet V, Higuieret P, Abrous DN. 2008. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 3: e3487.
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126: 789-799.
- Bordoni A, Di Nunzio M, Danesi F, Biagi PL. 2006. Polyunsaturated fatty acids: from diet to binding to ppar and other nuclear receptors. *Genes and Nutrition* 1: 95-106.
- Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufriere B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V. 1998. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53: B133-140.
- Boucheron C, Alfos S, Enderlin V, Husson M, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. 2006. Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging* 27: 1326-1334.
- Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. 2000. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 5: 289-298.
- Bourre JM, Piciotti M. 1992. Delta-6 desaturation of alpha-linolenic acid in brain and liver during development and aging in the mouse. *Neurosci Lett* 141: 65-68.
- Bourre JM, Piciotti M, Dumont O. 1990. Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. *Lipids* 25: 354-356.
- Bourre JM, Durand G, Pascal G, Youyou A. 1989. Brain cell and tissue recovery in rats made deficient in n-3 fatty acids by alteration of dietary fat. *J Nutr* 119: 15-22.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366.
- Brossard N, Croset M, Normand S, Pousin J, Lecerf J, Laville M, Tayot JL, Lagarde M. 1997. Human plasma albumin transports [13C]docosahexaenoic acid in two lipid forms to blood cells. *J Lipid Res* 38: 1571-1582.
- Brtko J, et al. 2007. Age-related change in the retinoid X receptor beta gene expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers: Effect of 13-cis retinoic acid supplementation. *Mech Ageing Dev* 128: 594-600.
- Buaud B, Esterle L, Vaysse C, Alfos S, Combe N, Higuieret P, Pallet V. 2010. A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr* 103: 1720-1729.
- Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA. 2003. Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr* 90: 311-321.
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7: 30-40.
- Burr GO, Burr MM. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* 82: 345-367.
- Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, Lundasen T, Hughes T, Kojetin DJ. 2013. Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews* 65: 710-778.

C

- Calder PC. 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 197-202.
- Calder PC. 2011. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1: S50-58.
- Calder PC, Grimble RF. 2002. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S14-19.
- Calderon F, Kim HY. 2004. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 90: 979-988.
- Calderon F. 2007. Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77: 227-232.
- Calon F, Lim GP, Morihara T, Yang F, Ubeda O, Salem N, Jr., Frautschy SA, Cole GM. 2005. 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. *Eur J Neurosci* 22: 617-626.
- Calon F, et al. 2004. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43: 633-645.
- Campbell LW, Hao SY, Thibault O, Blalock EM, Landfield PW. 1996. Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 16: 6286-6295.
- Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A. 2004. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5583-5592.
- Cao D, Kevala K, Kim J, Moon H-S, Jun SB, Lovinger D, Kim H-Y. 2009. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *Journal of Neurochemistry* 111: 510-521.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28: 436-445.
- Carnielli VP, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D, Sauer PJJ. 1998. Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 97-103.
- Carrié I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM. 2000a. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* 41: 465-472.
- Carrié I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM. 2000b. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* 41: 473-480.
- Carver JD, Benford VJ, Han B, Cantor AB. 2001. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Research Bulletin* 56: 79-85.
- Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Fattoretti P, Solazzi M, Bertoni-Freddari C. 2001. Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 122: 1723-1738.
- Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y. 2012. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron* 76: 70-81.
- Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10: 940-954.
- Chauveau F, Celerier A, Ognard R, Pierard C, Beracochea D. 2005. Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. *Behav Brain Res* 156: 215-223.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294: 1866-1870.
- Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP. 2008. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79: 85-91.

- Chen J, Kelly PT. 1996. Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J Neurosci* 16: 5704-5714.
- Chen N, Napoli JL. 2008. All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J* 22: 236-245.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM. 1998. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21: 1353-1361.
- Christiansen EN, Lund JS, Rortveit T, Rustan AC. 1991. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1082: 57-62.
- Chung H, Nettleton JA, Lemaitre RN, Barr RG, Tsai MY, Tracy RP, Siscovick DS. 2008. Frequency and Type of Seafood Consumed Influence Plasma (n-3) Fatty Acid Concentrations. *Journal of Nutrition* 138: 2422-2427.
- Clandinin MT. 1999. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. *Lipids* 34: 131-137.
- Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW. 1980. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4: 121-129.
- Clouet P, Niot I, Bezard J. 1989. Pathway of alpha-linolenic acid through the mitochondrial outer-membrane in the rat-liver and influence on the rate of oxidation - comparison with linoleic and oleic acids. *Biochemical Journal* 263: 867-873.
- Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F. 2002. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115: 475-482.
- Combe N, Boué C. 2001. Apports alimentaires en acides linoléique et alpha-linolénique d'une population d'Aquitaine. *OCL* 8: 118-121.
- Comstock GW, Menkes MS, Schober SE, Vuilleumier JP, Helsing KJ. 1988. Serum levels of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in older adults. *Am J Epidemiol* 127: 114-123.
- Connor MJ, Sidell N. 1997. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Molecular and Chemical Neuropathology* 30: 239-252.
- Connor SA, Maity S, Roy B, Ali DW, Nguyen PV. 2012. Conversion of short-term potentiation to long-term potentiation in mouse CA1 by coactivation of beta-adrenergic and muscarinic receptors. *Learning & Memory* 19: 535-542.
- Costello DA, O'Leary DM, Herron CE. 2005. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor- γ attenuate the A β -mediated impairment of LTP in the hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* 49: 359-366.
- Crandall J, Sakai Y, Zhang JH, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, McCaffery P. 2004. 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5111-5116.
- Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S. 2013. n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem* 20: 2953-2963.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. 1998. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70: 1366-1375.
- Cunnane SC. 2004. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70: 237-241.
- Cunnane SC, Francescutti V, Brenna JT, Crawford MA. 2000. Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. *Lipids* 35: 105-111.

- Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Begin M, Feart C, Barberger-Gateau P. 2009. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res* 48: 239-256.
- Cunnane SC, Williams SC, Bell JD, Brookes S, Craig K, Iles RA, Crawford MA. 1994. Utilization of uniformly labeled ¹³C-polyunsaturated fatty acids in the synthesis of long-chain fatty acids and cholesterol accumulating in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 62: 2429-2436.

D

- D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3: 63-103.
- Dawson HD, Yamamoto Y, Zolfaghari R, Rosales FJ, Dietz J, Shimada T, Li N, Ross AC. 2000. Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutr* 130: 1280-1286.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjoval J, Perlmann T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290: 2140-2144.
- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138: 877-889.
- DeMar JC, Jr., Ma K, Bell JM, Rapoport SI. 2004. Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* 91: 1125-1137.
- DeMar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. 2005. alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. *J Neurochem* 94: 1063-1076.
- Denis I, Potier B, Vancassel S, Heberden C, Lavielle M. 2013. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. *Ageing Res Rev* 12: 579-594.
- Dev S, Adler AJ, Edwards RB. 1993. Adult-rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Research* 632: 325-328.
- Diau GY, Hsieh AT, Sarkadi-Nagy EA, Wijendran V, Nathanielsz PW, Brenna JT. 2005. The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *BMC Med* 23: 3-11.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. 2007. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* 6: 275-284.
- Dinh TK, Bourre JM, Durand G. 1993. Effect of age and alpha-linolenic acid deficiency on delta 6 desaturase activity and liver lipids in rats. *Lipids* 28: 517-523.
- Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morrisskay G, Chambon P. 1990. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding-proteins .1. a systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110: 1133-1151.
- Drapeau E, Mayo W, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14385-14390.
- Drozdowski L, Thomson AB. 2006. Aging and the intestine. *World J Gastroenterol* 12: 7578-7584.
- Duester G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134: 921-931.
- Duong V, Rochette-Egly C. 2011. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1812: 1023-1031.
- Dyall SC, Michael-Titus AT. 2008. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med* 10: 219-235.
- Dyall SC, Michael GJ, Michael-Titus AT. 2010. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 88: 2091-2102.
- Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT. 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 28: 424-439.

E

- Edmond J. 2001. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci* 16: 181-193; discussion 215-121.
- Ehrmann J, Jr., Vavrusova N, Collan Y, Kolar Z. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 146: 11-14.
- Enderlin V, Alfos S, Pallet V, Garcin H, Azais-Braesco V, Jaffard R, Higuieret P. 1997a. Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* 412: 629-632.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P. 1997b. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229: 125-129.
- Enderlin V, Higuieret D, Alfos S, Husson M, Jaffard R, Higuieret P, Pallet V. 2000. Vitamin A deficiency decreases the expression of RARbeta and RXRbeta/gamma in adult mouse brain: effect of RA administration. *Nutritional Neurosciences* 3: 173-181.
- Engler MM, Engler MB, Nguyen H. 1998. Age-related changes in plasma and tissue fatty acid composition in Fischer 344 rats. *Biochem Mol Biol Int* 46: 1117-1126.
- Erickson CA, Barnes CA. 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38: 61-69.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317.
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. 2001. Rat PPARs: Quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142: 4195-4202.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R. 2003. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145: 37-49.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21: 6423-6429.
- Evans RM. 2005. The nuclear receptor superfamily: A Rosetta Stone for physiology. *Molecular Endocrinology* 19: 1429-1438.

F

- Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA, Freysz L. 2004a. Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 179-195.
- Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA, Freysz L. 2004b. Retinoic acid-mediated phospholipase A(2) signaling in the nucleus. *Brain Research Reviews* 45: 179-195.
- Favreliere S, Perault MC, Huguet F, De Javel D, Bertrand N, Piriou A, Durand G. 2003. DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 24: 233-243.
- Favrelière S, Barrier L, Durand G, Chalon S, Tallineau C. 1998. Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum. *Lipids* 33: 401-407.
- Favrelière S, Stadelmann-Ingrand S, Huguet F, De Javel D, Piriou A, Tallineau C, Durand G. 2000. Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Aging* 21: 653-660.

- Feat C, Samieri C, Alles B, Barberger-Gateau P. 2013. Potential benefits of adherence to the Mediterranean diet on cognitive health. *Proc Nutr Soc* 72: 140-152.
- Feat C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfos S, Higuieret P, Pallet V. 2005a. Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26: 729-738.
- Feat C, Pallet V, Boucheron C, Higuieret D, Alfos S, Letenneur L, Dartigues JF, Higuieret P. 2005b. Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Endocrinol* 152: 449-458.
- Feat C, Samieri C, Rondeau V, Amieva H, Portet F, Dartigues JF, Scarmeas N, Barberger-Gateau P. 2009. Adherence to a Mediterranean diet, cognitive decline, and risk of dementia. *JAMA* 302: 638-648.
- Fedorova I, Salem N, Jr. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 271-289.
- Ferguson SA, Berry KJ. 2007. Oral Accutane (R) (1,3-cis-retinoic acid) has no effects on spatial learning and memory in male and female Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology* 29: 219-227.
- Forette F. 1996. Alzheimer's disease. A medical and social challenge. *Bulletin De L Academie Nationale De Medecine* 180: 1731-1746.
- Fortier M, Tremblay-Mercier J, Plourde M, Chouinard-Watkins R, Vandal M, Pifferi F, Freemantle E, Cunnane SC. 2010. Higher plasma n-3 fatty acid status in the moderately healthy elderly in southern Quebec: higher fish intake or aging-related change in n-3 fatty acid metabolism? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 277-280.
- Foster TC. 1999. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 236-249.
- Foster TC, Norris CM. 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7: 602-612.

G

- Gamoh S, Hashimoto M, Hossain S, Masumura S. 2001. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 266-270.
- Gao F, Kiesewetter D, Chang L, Rapoport SI, Igarashi M. 2010. Quantifying conversion of linoleic to arachidonic and other n-6 polyunsaturated fatty acids in unanesthetized rats. *J Lipid Res* 51: 2940-2946.
- Gao F, Taha AY, Ma K, Chang L, Kiesewetter D, Rapoport SI. 2013. Aging decreases rate of docosahexaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified alpha-linolenic acid by rat liver. *Age (Dordr)* 35: 597-608.
- Gawrisch K, Eldho NV, Holte LL. 2003. The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids* 38: 445-452.
- Georgiadi A, Kersten S. 2012. Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Advances in Nutrition* 3: 127-134.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. 2006a. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacological Reviews* 58: 712-725.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. 2006b. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacological Reviews* 58: 760-772.
- Giese KP, Mizuno K. 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* 20: 540-552.

- Giordano E, Banni S, Quadro L. 2011. A single dose of c9,t11 or t10,c12 conjugated linoleic acid isomers perturbs vitamin A metabolism in mice. *Nutrition Research* 31: 855-862.
- Goncalves MBC, Boyle J, Webber DJ, Hall S, Minger SL, Corcoran JPT. 2005. Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Developmental Biology* 278: 60-70.
- Goodman T, Crandall JE, Nanescu SE, Quadro L, Shearer K, Ross A, McCaffery P. 2012. Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* 22: 2171-2183.
- Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23: 409-419.
- Graf BA, Duchateau GSMJE, Patterson AB, Mitchell ES, van Bruggen P, Koek JH, Melville S, Verkade HJ. 2010. Age dependent incorporation of C-14-DHA into rat brain and body tissues after dosing various C-14-DHA-esters. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 83: 89-96.
- Green CD, Han J-DJ. 2011. Epigenetic regulation by nuclear receptors. *Epigenomics* 3: 59-72.
- Green JT, Orr SK, Bazinet RP. 2008. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J Lipid Res* 49: 939-944.
- Green P, Yavin E. 1996. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids* 31: 859-865.
- Green P, Glozman S, Kamensky B, Yavin E. 1999. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 40: 960-966.
- Greiner RS, Catalan JN, Moriguchi T, Salem N, Jr. 2003. Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* 38: 431-435.
- Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, Bourguet W, van Dorsselaer A, Moras D, Renaud JP. 2002. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9: 303-313.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964.
- Guan Z, Wang Y, Cairns NJ, Lantos PL, Dallner G, Sindelar PJ. 1999. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 740-747.
- Gudas LJ. 2012. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821: 213-221.
- Guesnet P, Alessandri JM. 2011. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie* 93: 7-12.
- Guesnet P, Alessandri JM, Astorg P, Pifferi F, Lavielle M. 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL* 12: 333-343.
- Guillou H, Zdravec D, Martin PG, Jacobsson A. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49: 186-199.

H

- Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, Li TA, Ebrahimi M. 2012. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC Neurosci* 13: 109.
- Haller J, Weggemans RM, Lammi-Keefe CJ, Ferry M. 1996. Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. *SENECA Investigators. Eur J Clin Nutr* 50 Suppl 2: S32-46.
- Hamilton JA, Brunaldi K. 2007. A model for Fatty Acid transport into the brain. *J Mol Neurosci* 33: 12-17.

- Hansen JB, Olsen JO, Wilsgard L, Lyngmo V, Svensson B. 1993. Comparative effects of prolonged intake of highly purified fish oils as ethyl-ester or triglyceride on lipids, hemostasis and platelet-function in normolipemic men. *European Journal of Clinical Nutrition* 47: 497-507.
- He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX. 2009. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11370-11375.
- He J, Cheng Q, Xie W. 2010. Minireview: Nuclear receptor-controlled steroid hormone synthesis and metabolism. *Mol Endocrinol* 24: 11-21.
- Heneka MT, Landreth GE. 2007. PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1771: 1031-1045.
- Henke K. 2010. Memory systems - opinion A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nature Reviews Neuroscience* 11: 523-532.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, Potier de Courcy G, Cherouvrier F. 1994. Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vitam Nutr Res* 64: 220-232.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briancon S. 2004. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 164: 2335-2342.
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68: 397-406.
- Hiratsuka S, Koizumi K, Ooba T, Yokogoshi H. 2009. Effects of Dietary Docosahexaenoic Acid Connecting Phospholipids on the Learning Ability and Fatty Acid Composition of the Brain. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 55: 374-380.
- Hofacer R, Jandacek R, Rider T, Tso P, Magrisso IJ, Benoit SC, McNamara RK. 2011. Omega-3 fatty acid deficiency selectively up-regulates delta6-desaturase expression and activity indices in rat liver: prevention by normalization of omega-3 fatty acid status. *Nutr Res* 31: 715-722.
- Hollander D, Dadufalza V. 1990. Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp Gerontol* 25: 61-65.
- Hollander D, Dadufalza VD, Sletten EG. 1984. Does essential fatty acid absorption change with aging? *J Lipid Res* 25: 129-134.
- Horrocks LA, Faroqui AA. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: 361-372.
- Huang P, Chandra V, Rastinejad F. 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72: 247-272.
- Hulshof KF, et al. 1999. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *Eur J Clin Nutr* 53: 143-157.
- Huo T, Ferruzzi MG, Schwartz SJ, Failla ML. 2007. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55: 8950-8957.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Féart C, Higuieret P, Pallet V. 2003. Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *British Journal of Nutrition* 90: 191-198.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P. 2004. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res* 123: 7-17.
- Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuieret P. 2006. Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis* 23: 1-10.

I

- Igarashi M, Kim HW, Chang L, Ma K, Rapoport SI. 2012. Dietary n-6 polyunsaturated fatty acid deprivation increases docosahexaenoic acid metabolism in rat brain. *J Neurochem* 120: 985-997.
- Igarashi M, DeMar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. 2007a. Upregulated liver conversion of alpha-linolenic acid to docosahexaenoic acid in rats on a 15 week n-3 PUFA-deficient diet. *J Lipid Res* 48: 152-164.
- Igarashi M, DeMar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. 2007b. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation. *J Lipid Res* 48: 1150-1158.
- Ilincheta de Boschero MG, Roque ME, Salvador GA, Giusto NM. 2000. Alternative pathways for phospholipid synthesis in different brain areas during aging. *Experimental Gerontology* 35: 653-668.
- Izaki Y, Takita M, Akema T. 2008. Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. *Eur J Neurosci* 27: 3029-3034.

J

- Jaffard R. 1994. Les systèmes de mémoire. *Journées internationales sur les sciences cognitives*.
- Jicha GA, Markesbery WR. 2010. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 5: 45-61.
- Joshi K, Lad S, Kale M, Patwardhan B, Mahadik SP, Patni B, Chaudhary A, Bhawe S, Pandit A. 2006. Supplementation with flax oil and vitamin C improves the outcome of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 74: 17-21.
- Jump DB. 2004. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 41-78.

K

- Kabuto H, Amakawa M, Mankura M, Yamanushi TT, Mori A. 2009. Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester Enhances 6-Hydroxydopamine-Induced Neuronal Damage by Induction of Lipid Peroxidation in Mouse Striatum. *Neurochemical Research* 34: 1299-1303.
- Kaduce TL, Chen Y, Hell JW, Spector AA. 2008. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*.
- Kamp F, Guo W, Souto R, Pilch PF, Corkey BE, Hamilton JA. 2003. Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* 278: 7988-7995.
- Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. 2005. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochemical Journal* 388: 363-369.
- Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kato S, Fujiki R. 2011. Transcriptional Controls by Nuclear Fat-Soluble Vitamin Receptors through Chromatin Reorganization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75: 410-413.
- Kato S, Mano H, Kumazawa T, Yoshizawa Y, Kojima R, Masushige S. 1992. Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J* 286 (Pt 3): 755-760.
- Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315: 820-825.

- Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. 2006. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* 139: 991-997.
- Kawashima A, Harada T, Kami H, Yano T, Imada K, Mizuguchi K. 2010. Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J Nutr Biochem* 21: 268-277.
- Kelly L, Grehan B, Chiesa AD, O'Mara SM, Downer E, Sahyoun G, Massey KA, Nicolaou A, Lynch MA. 2011. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol Aging* 32: 2318 e2311-2315.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447-452.
- Khorasanizadeh S, Rastinejad F. 2001. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 384-390.
- Kim MH, Min SH, Ferracane J, Lee IB. 2010. Initial dynamic viscoelasticity change of composites during light curing. *Dent Mater* 26: 463-470.
- Kirkham TC, Tucci SA. 2006. Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity. *CNS & neurological disorders drug targets* 5: 272-292.
- Kishimoto M, Fujiki R, Takezawa S, Sasaki Y, Nakamura T, Yamaoka K, Kitagawa H, Kato S. 2006. Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocr J* 53: 157-172.
- Kitaoka K, Shimizu N, Ono K, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Ishimura K, Sei H, Yoshizaki K. 2013. The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice. *Neuropharmacology* 72: 58-65.
- Kitson AP, Stark KD, Duncan RE. 2012. Enzymes in brain phospholipid docosahexaenoic acid accretion: A PL-ethora of potential PL-ayers. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 87: 1-10.
- Kliwer SA, et al. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4318-4323.
- Kodas E, Vancassel S, Lejeune B, Guilloteau D, Chalon S. 2002. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J Lipid Res* 43: 1209-1219.
- Kodas E, Galineau L, Bodard S, Vancassel S, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. 2004. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J Neurochem* 89: 695-702.
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51: 85-94.
- Kremarik-Bouillaud P, Schohn H, Dauca M. 2000. Regional distribution of PPARbeta in the cerebellum of the rat. *J Chem Neuroanat* 19: 225-232.
- Kremmyda, L.S, Tvrzicka E, Stankova B, Zak, A. 2011. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease: a review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*: 195-218.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P. 1999. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89: 1291-1300.
- Krokan HE, Bjerve KS, Mork E. 1993. The enteral bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is as good from ethyl-esters as from glyceryl esters in spite of lower hydrolytic rates by pancreatic lipase invitro. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1168: 59-67.
- Kumar VB, Vyas K, Buddhiraju M, Alshaher M, Flood JF, Morley JE. 1999. Changes in membrane fatty acids and delta-9 desaturase in senescence accelerated (SAMP8) mouse hippocampus with aging. *Life Sci* 65: 1657-1662.

- Kuo YT, So PW, Parkinson JR, Yu WS, Hankir M, Herlihy AH, Goldstone AP, Frost GS, Wasserfall C, Bell JD. 2010. The combined effects on neuronal activation and blood-brain barrier permeability of time and n-3 polyunsaturated fatty acids in mice, as measured in vivo using MEMRI. *Neuroimage* 50: 1384-1391.
- Kuperstein F, Yakubov E, Dinerman P, Gil S, Eylam R, Salem N, Yavin E. 2005. Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *Journal of Neurochemistry* 95: 1550-1562.
- Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. 1995. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17850-17857.

L

- Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Gregoire S, Bretillon L, Laye S. 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7: e36861.
- Lafourcade M, et al. 2011. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience* 14: 345-350.
- Lalonde J, Chaudhuri A. 2002. Task-dependent transfer of perceptual to memory representations during delayed spatial frequency discrimination. *Vision Res* 42: 1759-1769.
- Lands B. 2012. Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* 4: 1338-1357.
- Lane MA, Bailey SJ. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75: 275-293.
- Laroche S, Davis S, Jay TM. 2000. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10: 438-446.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 935-945.
- Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, Hennebelle M, Lavielle M, Dutar P, Potier B, Billard JM, Vancassel S, Denis I. 2013. Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging Cell* 12: 76-84.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40: 1-94.
- Laye S. 2010. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 295-303.
- Le Doze F, Debruyne D, Albessard F, Barre L, Defer GL. 2000. Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. *Drug Metab Dispos* 28: 205-208.
- Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. 2003. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 107: 2646-2652.
- Lee E, Son H. 2009. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *Bmb Reports* 42: 239-244.
- Legrand. 2007. Les acides gras: structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés. *Cah.Nutr.Diet.*, 42 Hors série 1, 7-12
- Lemaitre-Delaunay D, Pachiaudi C, Laville M, Pousin J, Armstrong M, Lagarde M. 1999. Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 40: 1867-1874.
- Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, Willson TM, Sjoval J, Perlmann T, Griffiths WJ. 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 3: 692-703.
- Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR. 2013. Alternative Sources of Omega-3 Fats: Can We Find a Sustainable Substitute for Fish? *Nutrients* 5: 1301-1315.

- Levant B, Ozias MK, Carlson SE. 2007. Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J Nutr* 137: 130-134.
- Levin AA, et al. 1992. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355: 359-361.
- Lim S-Y, Suzuki H. 2000. Intakes of Dietary Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Egg Phosphatidylcholine Improve Maze-Learning Ability in Young and Old Mice. *J Nutr* 130: 1629-1632.
- Lim SY, Hoshiba J, Salem N, Jr. 2005. 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. *J Neurochem* 95: 848-857.
- Linney E, Donerly S, Mackey L, Dobbs-McAuliffe B. 2011. The negative side of retinoic acid receptors. *Neurotoxicology and Teratology* 33: 631-640.
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175-190.
- Little SJ, Lynch MA, Manku M, Nicolaou A. 2007. Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77: 155-162.
- Lopez GH, Ilincheta de Boscherio MG, Castagnet PI, Giusto NM. 1995. Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112: 331-343.

M

- Ma D, Zhang M, Mori Y, Yao C, Larsen CP, Yamashima T, Zhou L. 2010. Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia. *Hippocampus* 20: 811-819.
- Maden M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3: 843-853.
- Maden M, Ong DE, Summerbell D, Chytil F. 1988. Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature* 335: 733-735.
- Magnusson KR, Scruggs B, Zhao X, Hammersmark R. 2007. Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci* 8: 43.
- Magnusson KR, Scruggs B, Aniya J, Wright KC, Ontl T, Xing Y, Bai L. 2003. Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav Neurosci* 117: 485-495.
- Malapaka RR, et al. 2012. Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 287: 183-195.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345: 224-229.
- Marszalek JR, Lodish HE. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: Breastmilk and fish are good for you. Pages 633-657. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 21.
- Martin A. 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris: Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation, Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Martinez M. 1992. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120: S129-138.
- Martinez M. 1994. Polyunsaturated fatty acids in the developing human brain, red cells and plasma: influence of nutrition and peroxisomal disease. *World Rev Nutr Diet* 75: 70-78.

- Martinez M, Mougan I. 1998. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J Neurochem* 71: 2528-2533.
- Martinez SE, Vaglenova J, Sabria J, Martinez MC, Farres J, Pares X. 2001. Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268: 5045-5056.
- Maskrey BH, Megson IL, Rossi AG, Whitfield PD. 2013. Emerging importance of omega-3 fatty acids in the innate immune response: molecular mechanisms and lipidomic strategies for their analysis. *Mol Nutr Food Res* 57: 1390-1400.
- Mathews SA, Oliver WT, Phillips OT, Odle J, Diersen-Schade DA, Harrell RJ. 2002. Comparison of triglycerides and phospholipids as supplemental sources of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in piglets. *J Nutr* 132: 3081-3089.
- Mathieu G, Denis S, Lavalie M, Vancassel S. 2008. Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78: 391-401.
- McCaffery P, Drager UC. 1994. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7772-7776.
- McNamara RK, Carlson SE. 2006. 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* 75: 329-349.
- McNamara RK, Able J, Jandacek R, Rider T, Tso P. 2009. Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. *Psychoneuroendocrinology* 34: 532-539.
- Mey J, McCaffery P. 2004. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* 10: 409-421.
- Miller CW, Waters KM, Ntambi JM. 1997. Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231: 206-210.
- Mingaud F, et al. 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28: 279-291.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM. 2001. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11714-11719.
- Mitchell RW, Hatch GM. 2011. Fatty acid transport into the brain: Of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85: 293-302.
- Moore SA. 2001. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci* 16: 195-200.
- Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem* 56: 518-524.
- Moras D, Gronemeyer H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 384-391.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123: 131-145.
- Moriguchi T, Salem N, Jr. 2003. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem* 87: 297-309.
- Moriguchi T, Greiner RS, Salem N, Jr. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75: 2563-2573.
- Moriguchi T, Loewke J, Garrison M, Catalan JN, Salem N, Jr. 2001. Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum. *J Lipid Res* 42: 419-427.

- Moriguchi T, Lim SY, Greiner R, Lefkowitz W, Loewke J, Hoshiba J, Salem N, Jr. 2004. Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats. *J Lipid Res* 45: 1437-1445.
- Morinobu T, Murata T, Takaya R, Tamai H. 2002. Nutritional status of beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol in obese children. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 72: 119-123.
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS. 2005. Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arch Neurol* 62: 1849-1853.
- Morrison JH, Baxter MG. 2012. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* 13: 240-250.
- Mouille VSF, Cansell C, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C. 2012. The multiple roles of fatty acid handling proteins in brain. *Frontiers in physiology* 3: 385-385.
- Mu HL, Hoy CE. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 43: 105-133.
- Muldoon MF, Ryan CM, Sheu L, Yao JK, Conklin SM, Manuck SB. 2010. Serum Phospholipid Docosahexaenoic Acid Is Associated with Cognitive Functioning during Middle Adulthood. *Journal of Nutrition* 140: 848-853.
- Muller M, Kersten S. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nature Reviews Genetics* 4: 315-322.
- Murakami K, Ide T, Suzuki M, Mochizuki T, Kadowaki T. 1999. Evidence for direct binding of fatty acids and eicosanoids to human peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 609-613.
- Murray EA, Baxter MG, Gaffan D. 1998. Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behav Neurosci* 112: 1291-1303.
- Muskiet FA, Fokkema MR, Schaafsma A, Boersma ER, Crawford MA. 2004. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *J Nutr* 134: 183-186.

N

- Nagpal S, Saunders M, Kastner P, Durand B, Nakshatri H, Chambon P. 1992. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* 70: 1007-1019.
- Nakamura MT, Nara TY. 2004. Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu Rev Nutr* 24: 345-376.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. 2004. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 361-372.
- Newman J, Grace AA. 1999. Binding across time: The selective gating of frontal and hippocampal systems modulating working memory and attentional states. *Consciousness and Cognition* 8: 196-212.
- Nikolakopoulou Z, Shaikh MH, Dehlawi H, Michael-Titus AT, Parkinson EK. 2013. The induction of apoptosis in pre-malignant keratinocytes by omega-3 polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) is inhibited by albumin. *Toxicology Letters* 218: 150-158.
- Niu SL, Mitchell DC, Lim SY, Wen ZM, Kim HY, Salem N, Litman BJ. 2004. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 279: 31098-31104.
- Nomoto M, et al. 2012. Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol Brain* 5: 8.
- Nordoy A, Barstad L, Connor WE, Hatcher L. 1991. Absorption of the n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as ethyl-esters and triglycerides by humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 53: 1185-1190.

Norheim F, et al. 2012. Molecular Nutrition Research-The Modern Way Of Performing Nutritional Science. *Nutrients* 4: 1898-1944.

O

Olefsky JM. 2001. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276: 36863-36864.

Olson CR, Mello CV. 2010. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res* 54: 489-495.

Omalley B. 1990. The steroid-receptor superfamily - more excitement predicted for the future. *Molecular Endocrinology* 4: 363-369.

Ong DE, Davis JT, O'Day WT, Bok D. 1994. Synthesis and secretion of retinol-binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium. *Biochemistry* 33: 1835-1842.

Ormerod AD, Thind CK, Rice SA, Reid IC, Williams JHG, McCaffery PJA. 2012. Influence of isotretinoin on hippocampal-based learning in human subjects. *Psychopharmacology* 221: 667-674.

Otsuka R, Kato Y, Imai T, Ando F, Shimokata H. 2013. Higher serum EPA or DHA, and lower ARA compositions with age independent fatty acid intake in Japanese aged 40 to 79. *Lipids* 48: 719-727.

Ouellet M, Emond V, Chen CT, Julien C, Bourasset F, Oddo S, LaFerla F, Bazinet RP, Calon F. 2009. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochemistry International* 55: 476-482.

P

Pallet V, Azais-Braesco V, Enderlin V, Grolier P, Noel-Suberville C, Garcin H, Higuere P. 1997. Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. *Mech Ageing Dev* 99: 123-136.

Pares X, Farres J, Kedishvili N, Duester G. 2008. Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3936-3949.

Park DC, Reuter-Lorenz P. 2009. The Adaptive Brain: Aging and Neurocognitive Scaffolding. Pages 173-196. *Annual Review of Psychology*, vol. 60.

Pawlosky RJ, Ward G, Salem N, Jr. 1996. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. *Lipids* 31 Suppl: S103-S107.

Perusek L, Maeda T. 2013. Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients* 5: 2646-2666.

Plourde M, Cunnane SC. 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme* 32: 619-634.

Polozova A, Salem N, Jr. 2007. Role of liver and plasma lipoproteins in selective transport of n-3 fatty acids to tissues: a comparative study of 14C-DHA and 3H-oleic acid tracers. *J Mol Neurosci* 33: 56-66.

Porte Y, Buhot MC, Mons N. 2008. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiol Aging* 29: 1533-1546.

Q

Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL. 2001. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11668-11673.

R

- Rao JS, Ertley RN, DeMar JC, Jr., Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. 2007. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 12: 151-157.
- Rapoport SI. 2001. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. *J Mol Neurosci* 16: 243-261.
- Rapoport SI. 2013. Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88: 79-85.
- Rapoport SI, Igarashi M. 2009. Can the rat liver maintain normal brain DHA metabolism in the absence of dietary DHA? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81: 119-123.
- Rapoport SI, Chang MC, Spector AA. 2001. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res* 42: 678-685.
- Rapoport SI, Igarashi M, Gao F. 2010. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 273-276.
- Rastinejad F. 2001. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 33-38.
- Razanamahefa L, Lafay L, Oseredczuk M, Thiebaut A, Laloux L, Gerber M, Astorg P, Berta JL. 2005. Dietary fat consumption of the French population and quality of the data on the composition of the major food groups. *Bull Cancer* 92: 647-657.
- Rhinn M, Dolle P. 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139: 843-858.
- Roberts LJ, 2nd, Fessel JP, Davies SS. 2005. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathol* 15: 143-148.
- Robson LG, Dyall S, Sidloff D, Michael-Titus AT. 2010. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging* 31: 678-687.
- Rosenthal A, Chan SY, Henzel W, Haskell C, Kuang WJ, Chen E, Wilcox JN, Ullrich A, Goeddel DV, Routtenberg A. 1987. Primary structure and mRNA localization of protein F1, a growth-related protein kinase C substrate associated with synaptic plasticity. *Embo J* 6: 3641-3646.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69: 143-179.
- Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J. 2001. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol* 17: 184-192.
- Ross AC, Russell RM, Miller SA, Munro IC, Rodricks JV, Yetley EA, Julien E. 2009. Application of a Key Events Dose-Response Analysis to Nutrients: A Case Study with Vitamin A (Retinol). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49: 708-717.
- Ryan KK, Li B, Grayson BE, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. 2011. A role for central nervous system PPAR-gamma in the regulation of energy balance. *Nature Medicine* 17: 623-U145.

S

- Sakai Y, Crandall JE, Brodsky J, McCaffery P. 2004. 13-cis Retinoic acid (accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice. *Ann N Y Acad Sci* 1021: 436-440.
- Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ. 2007. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Research* 1182: 50-59.
- Salem N, Jr., Moriguchi T, Greiner RS, McBride K, Ahmad A, Catalan JN, Slotnick B. 2001. Alterations in brain function after loss of docosahexaenoate due to dietary restriction of n-3 fatty acids. *J Mol Neurosci* 16: 299-307; discussion 317-221.

- Sanderson LM, de Groot PJ, Hooiveld GJEJ, Koppen A, Kalkhoven E, Mueller M, Kersten S. 2008. Effect of Synthetic Dietary Triglycerides: A Novel Research Paradigm for Nutrigenomics. *Plos One* 3.
- Sani BP, Allen RD, Moorer CM, McGee BW. 1987. Interference of retinoic acid binding to its binding-protein by omega-6 fatty-acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 147: 25-30.
- Sarruf DA, Yu F, Nguyen HT, Williams DL, Printz RL, Niswender KD, Schwartz MW. 2009. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma in Key Neuronal Subsets Regulating Glucose Metabolism and Energy Homeostasis. *Endocrinology* 150: 707-712.
- Sastry PS. 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24: 69-176.
- Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA. 2006. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 63: 1545-1550.
- Scheibe RJ, Wagner JA. 1992. Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem* 267: 17611-17616.
- Schiefermeier M, Yavin E. 2002. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. *J Lipid Res* 43: 124-131.
- Schmitz G, Ecker J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47: 147-155.
- Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129: 723-733.
- Sei H. 2008. Vitamin A and sleep regulation. *The journal of medical investigation : JMI* 55: 1-8.
- Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 73: 155-172.
- Shah GN, Mooradian AD. 1997. Age-related changes in the blood-brain barrier. *Exp Gerontol* 32: 501-519.
- Shaw N, Elholm M, Noy N. 2003. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41589-41592.
- Shearer KD, Fragoso YD, Clagett-Dame M, McCaffery PJ. 2012. Astrocytes as a regulated source of retinoic acid for the brain. *Glia* 60: 1964-1976.
- Shearer KD, Goodman TH, Ross AW, Reilly L, Morgan PJ, McCaffery PJ. 2010. Photoperiodic regulation of retinoic acid signaling in the hypothalamus. *Journal of Neurochemistry* 112: 246-257.
- Shrivastava R, Vincent B, Gobron S, Cucuat N, John GW. 2005. Evidence for growth-promoting effects of omega n - 3 fatty acids alone and in combination with a specific vitamin and mineral complex in rat neuroblastoma cells. *Nutr Neurosci* 8: 317-321.
- Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 31-39.
- Simonyi A, Murch K, Sun GY. 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 mRNA expression in the rat brain during aging. *Neurochem Res* 28: 1375-1378.
- Simopoulos AP. 2001. Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 88: 18-27.
- Simopoulos AP. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60: 502-507.
- Simopoulos AP. 2011. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology* 44: 203-215.
- Simopoulos AP, Salem N, Jr. 1986. Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids. *N Engl J Med* 315: 833.
- Simpson PB, Bacha JL, Palfreyman EL, Woollacott AJ, McKernan RM, Kerby J. 2001. Retinoic acid-evoked differentiation of neuroblastoma cells predominates over growth factor stimulation: An automated image capture and quantitation approach to neuritogenesis. *Analytical Biochemistry* 298: 163-169.

- Smink W. 2012. Fatty acid digestion, synthesis and metabolism in broiler chickens and pigs. Pages 142 pp.-142 pp. Fatty acid digestion, synthesis and metabolism in broiler chickens and pigs.
- Snider NT, Walker VJ, Hollenberg PF. 2010. Oxidation of the Endogenous Cannabinoid Arachidonoyl Ethanolamide by the Cytochrome P450 Monooxygenases: Physiological and Pharmacological Implications. *Pharmacological Reviews* 62: 136-154.
- Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. 1991. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26: 421-425.
- Sommer KM, Chen LI, Treuting PM, Smith LT, Swisshelm K. 1999. Elevated retinoic acid receptor beta(4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8651-8656.
- Spector AA. 2001. Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci* 16: 159-165; discussion 215-121.
- Sprecher H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486: 219-231.
- Squire LR. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177.
- Staels B. 2001. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45: S158-S167.
- Stillwell W, Wassall SR. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* 126: 1-27.
- Stoelzel CR, Stavnezer AJ, Denenberg VH, Ward M, Markus EJ. 2002. The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and nonspatial comparable versions of the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 78: 217-233.
- Stonehouse W, Conlon CA, Podd J, Hill SR, Minihane AM, Haskell C, Kennedy D. 2013. DHA supplementation improved both memory and reaction time in healthy young adults: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 97: 1134-1143.
- Storch J, Corsico B. 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. Pages 73-95. *Annual Review of Nutrition*, vol. 28.
- Su HM. 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21: 364-373.
- Sullivan EV, Adalsteinsson E, Hedehus M, Ju C, Moseley M, Lim KO, Pfefferbaum A. 2001. Equivalent disruption of regional white matter microstructure in ageing healthy men and women. *Neuroreport* 12: 99-104.
- Sundararajan S, Jiang Q, Heneka M, Landreth G. 2006. PPAR γ as a therapeutic target in central nervous system diseases. *Neurochemistry International* 49: 136-144.
- Sundboom J, Olson JA. 1984. Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp Gerontol* 19: 257-265.
- Suzuki H, Manabe S, Wada O, Crawford MA. 1997. Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 272-278.
- Szanto A, et al. 2004. Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages. *Molecular and Cellular Biology* 24: 8154-8166.

T

- Tafti M, Ghyselincq NB. 2007. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64: 1706-1711.
- Tanabe Y, Hashimoto M, Sugioka K, Maruyama M, Fujii Y, Hagiwara R, Hara T, Hossain SM, Shido O. 2004. Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with

- an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31: 700-703.
- Tanaka Y, Ohkubo T, Fukuda N, Hibino H. 2003. Effect of molecular forms on distribution of docosahexaenoic acid into organs in mice. *Journal of Oleo Science* 52: 89-97.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27: 3252-3259.
- Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. 2010. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 67: 1423-1445.
- Thibault O, Landfield PW. 1996. Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272: 1017-1020.
- Thomson AB, Keelan M, Garg ML, Clandinin MT. 1989. Influence of dietary fat composition on intestinal absorption in the rat. *Lipids* 24: 494-501.
- Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW. 2004. Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27: 614-620.
- Topic B, Willuhn I, Palomero-Gallagher N, Zilles K, Huston JP, Hasenohrl RU. 2007. Impaired maze performance in aged rats is accompanied by increased density of NMDA, 5-HT_{1A}, and alpha-adrenoceptor binding in hippocampus. *Hippocampus* 17: 68-77.
- Touyarot K, Bonhomme D, Roux P, Alfos S, Lafenetre P, Richard E, Higuieret P, Pallet V. 2013. A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS One* 8: e72101.
- Touzani K, Marighetto A, Jaffard R. 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci* 17: 628-640.
- Tronche C, Lestage P, Louis C, Carrie I, Beracochea D. 2010. Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res* 215: 255-260.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5919-5924.
- Tulving E. 1995. Organisation of memory: quo vadis ? (Gazzaniga MS, ed). *The cognitive neurosciences.*: 839-847.

V

- Valenzuela A, Nieto S, Sanhueza J, Nunez MJ, Ferrer C. 2005. Tissue accretion and milk content of docosahexaenoic acid in female rats after supplementation with different docosahexaenoic acid sources. *Annals of Nutrition and Metabolism* 49: 325-332.
- van Bilsen M, van der Vusse GJ, Gilde AJ, Lindhout M, van der Lee KA. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol Cell Biochem* 239: 131-138.
- van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF. 2004. Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 26-30.
- van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130: 503-506.
- Vandesquille M, Krazem A, Louis C, Lestage P, Beracochea D. 2011. S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl)* 215: 709-720.
- Vega VA, Anzulovich AC, Varas SM, Bonomi MR, Gimenez MS, Oliveros LB. 2009. Effect of nutritional vitamin A deficiency on lipid metabolism in the rat heart: Its relation to PPAR gene expression. *Nutrition* 25: 828-838.

Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34: 199-211.

W

- Wallis JG, Watts JL, Browse J. 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* 27: 467.
- Wang L, Bai J, Hu Y. 2008. Identification of the RA response element and transcriptional silencer in human alphaCaMKII promoter. *Mol Biol Rep* 35: 37-44.
- Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. 2006. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148: 147-153.
- Wassall SR, Brzustowicz MR, Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W. 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids - The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chemistry and Physics of Lipids* 132: 79-88.
- Weeber EJ, Sweatt JD. 2002. Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron* 33: 845-848.
- Weiss K, Mihaly J, Liebisch G, Marosvoelgyi T, Schmitz G, Decsi T, Ruehl R. 2011. Effect of Synthetic Ligands of PPAR alpha, beta/delta, gamma, RAR, RXR and LXR on the Fatty Acid Composition of Phospholipids in Mice. *Lipids* 46: 1013-1020.
- Werner A, Havinga R, Kuipers F, Verkade HJ. 2004. Treatment of EFA deficiency with dietary triglycerides or phospholipids in a murine model of extrahepatic cholestasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286: G822-G832.
- Werner EA, DeLuca HF. 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282: E672-E678.
- Wietzych-Schindler M, Szyszka-Niagolov M, Ohta K, Endo Y, Perez E, de Lera AR, Chambon P, Krezel W. 2011a. Retinoid x receptor gamma is implicated in docosahexaenoic acid modulation of despair behaviors and working memory in mice. *Biol Psychiatry* 69: 788-794.
- Wietzych-Schindler M, Szyszka-Niagolov M, Ohta K, Endo Y, Perez E, de Lera AR, Chambon P, Krezel W. 2011b. Retinoid X Receptor Gamma Is Implicated in Docosahexaenoic Acid Modulation of Despair Behaviors and Working Memory in Mice. *Biological Psychiatry* 69: 788-794.
- Wietzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W. 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12: 318-326.
- Wijendran V, Huang MC, Diao GY, Boehm G, Nathanielsz PW, Brenna JT. 2002. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr Res* 51: 265-272.
- Williard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Spector AA. 2002. Comparison of 20-, 22-, and 24-carbon n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid utilization in differentiated rat brain astrocytes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids* 67: 99-104.
- Williard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, Robbins ME, Spector AA. 2001. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res* 42: 1368-1376.
- Willson TM, Moore JT. 2002. Genomics versus orphan nuclear receptors--a half-time report. *Mol Endocrinol* 16: 1135-1144.
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. 2006. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16: 296-304.
- Woods JW, Tanen M, Figueroa DJ, Biswas C, Zycband E, Moller DE, Austin CP, Berger JP. 2003. Localization of PPARdelta in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Res* 975: 10-21.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2004. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21: 1457-1467.

- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2011. The salutary effects of DHA dietary supplementation on cognition, neuroplasticity, and membrane homeostasis after brain trauma. *J Neurotrauma* 28: 2113-2122.
- Wu H, Ichikawa S, Tani C, Zhu B, Tada M, Shimoishi Y, Murata Y, Nakamura Y. 2009. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791: 8-16.

X

- Xia Z, Storm DR. 2012. Role of signal transduction crosstalk between adenylyl cyclase and MAP kinase in hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 19: 369-374.
- Xiao Y, Huang Y, Chen ZY. 2005. Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr* 94: 544-550.
- Xing G, Zhang L, Zhang L, Heynen T, Yoshikawa T, Smith M, Weiss S, Detera-Wadleigh S. 1995. Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1015-1025.
- Xu HE, et al. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular Cell* 3: 397-403.

Y

- Yamagata T, Momoi T, Kumagai H, Yanagisawa M, Momoi M. 1993. Distribution of retinoic acid receptor β in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed Res* 14: 183-190.
- Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. 2000. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J* 14: 2119-2127.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. 2005. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1: 98-102.
- Yetimler B, Ulusoy G, Celik T, Jakubowska-Dogru E. 2012. Differential effect of age on the brain fatty acid levels and their correlation with animal cognitive status in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 103: 53-59.

Z

- Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C, Cassinat B. 2012. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal* 24: 2369-2377.
- Zetterstrom RH, Simon A, Giacobini MM, Eriksson U, Olson L. 1994. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62: 899-918.
- Zetterstrom RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L. 1999. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11: 407-416.
- Ziouzenkova O, Plutzky J. 2008. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 582: 32-38.
- Zolfaghari R, Ross AC. 2003. Recent advances in molecular cloning of fatty acid desaturase genes and the regulation of their expression by dietary vitamin A and retinoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 171-179.

Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross AC. 2001. Fatty acid delta(5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. Arch Biochem Biophys 391: 8-15.