



Étude des effets de la supplémentation en graines de chanvre entières sur l'axe endocannabinoïdome-microbiome et ses implications sur l'obésité induite par la diète

Thèse

Rim Ben Necib

Doctorat en médecine moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Rim Ben Necib, 2021

**Étude des effets de la supplémentation en graines
de chanvre entières sur l'axe endocannabinoïdome-
microbiome et ses implications sur
l'obésité induite par la diète**

Thèse de doctorat en médecine moléculaire

Rim BEN NECIB

Sous la direction de:

Pr Cristoforo SILVESTRI, directeur de recherche
Pr Vincenzo DI MARZO, codirecteur de recherche

Résumé

Le passage d'un mode de vie traditionnel à un mode de vie moderne a entraîné des changements concomitants dans tous les aspects de la vie, notamment l'introduction et la consommation croissante d'aliments industrialisés en masse. Ce changement a modifié, parmi d'autres, l'équilibre entre les acides gras oméga-3 et oméga-6, une balance qui peut être associée à une mauvaise santé cardiométabolique. Plusieurs études confirment les bienfaits des oméga-3 pour la santé, notamment les acides gras à longue chaîne tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ces acides gras peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en modulant, en partie, l'endocannabinoïdome ainsi que le microbiome intestinal, qui sont tous les deux des régulateurs clés de plusieurs aspects de la santé cardiométabolique et de l'obésité. D'où l'intérêt d'incorporer des aliments riches en oméga-3 : qui sont accessibles, abordables et consommables par toute personne y compris les véganes, afin de corriger ce déséquilibre et de prévenir les complications métaboliques.

Les graines de chanvre (*Cannabis sativa*) entières ont une valeur nutritionnelle exceptionnelle, étant très riches en acides gras essentiels (AGE) ainsi que les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont les oméga-3. Il est aussi intéressant de noter que les graines de chanvre sont également une source riche d'acide stéaridonique (SDA), qui peut être converti en EPA. De plus, ces graines contiennent presque autant de protéines de qualité que le soja et elles sont également riches en vitamine E, en minéraux et en fibres.

Cette thèse avait donc comme objectif d'évaluer, par rapport à une graine largement utilisée pour la prévention de la dyslipidémie « la graine de lin », les effets d'une supplémentation alimentaire en graines de chanvre entières sur le développement de l'obésité et des complications métaboliques dans un modèle de souris souffrant d'obésité induite par le régime alimentaire et de déterminer ses effets sur l'axe microbiome-endocannabinoïdome. L'hypothèse générale est que « les graines de chanvre améliorent les paramètres métaboliques chez les souris obèses en corrélation avec des niveaux circulants et tissulaires

normalisés de médiateurs lipidiques de l'eCBome ainsi que des changements dans la composition du microbiote intestinal ».

Dans un premier temps, et vu que notre partenaire industriel avait deux variétés de chanvre, nous avons étudié la composition nutritionnelle et cannabinoïde des graines Finola et X59 afin de choisir la meilleure variété, en point de vue nutritionnel, pour notre expérimentation *in vivo*. Les résultats démontrent que la variété Finola possède une meilleure composition qualitative en macro et micronutriments, par rapport à la variété X59, dont la plus importante est la composition en oméga-3. De ce fait, nous avons choisi les graines Finola pour la suite du projet. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les effets de la supplémentation en graines de Finola mixées avec une diète High Fat High Sucrose (HFHS) dans une étude de 8 semaines chez des souris C57BL/6J, dont les groupes de contrôle étaient : HFHS, HFHS mixée avec les graines de Lin et Low Fat Low Sucrose (LFLS). Les résultats démontrent que la supplémentation en grains de chanvre produit une légère amélioration du profil métabolique et inflammatoire par rapport aux graines de lin et en comparaison avec le contrôle LFLS. En revanche, les deux graines changent sensiblement l'eCBome avec une augmentation des médiateurs oméga-3 (dont les précurseurs sont des acides gras oméga-3) et une diminution des médiateurs oméga-6, surtout dans le tissu adipeux, par rapport aux LFLS et HFHS. Exceptionnellement, le SDA et ses médiateurs ont augmenté considérablement dans le groupe des graines de chanvre. Dans un troisième temps, nous avons étudié la capacité des préadipocytes et des adipocytes 3T3-L1 traités avec des acides gras oméga-3 ou des huiles de chanvre et de lin à produire leurs médiateurs eCBome respectifs. Les résultats démontrent que les préadipocytes et les adipocytes 3T3-L1 traités avec des acides gras oméga-3 étaient capables à produire leurs médiateurs eCBome respectifs et que le SDA était capable de se convertir en EPA ainsi que leurs médiateurs. Par conséquent, les modifications de l'endocannabinoïdome dans le tissu adipeux des souris observées dans le cadre du protocole *in vivo* sont probablement, au moins en partie, le résultat direct des graisses alimentaires sur ces types de cellules spécifiquement. Cette thèse a donc montré que les graines de chanvre, riche en SDA, pourraient provoquer des changements bénéfiques dans le métabolisme en altérant l'endocannabinoïdome.

Abstract

The shift from a traditional to a modern lifestyle has resulted in concomitant changes in all aspects of life, including the introduction and increasing consumption of mass-produced foods. This change has altered, among other things, the balance between omega-3 and omega-6 fatty acids (FAs), a balance that may be associated with poor cardiometabolic health. Several studies confirm the health benefits of omega-3 FAs, including long-chain fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). These FAs may have health benefits by, among other things, modulating the endocannabinoidome as well as the gut microbiome, both of which are key regulators of several aspects of cardiometabolic health and obesity. Hence the value of incorporating omega-3 rich foods that are: accessible, affordable and consumable by anyone including vegans to correct this imbalance and prevent metabolic complications.

Whole hemp seeds (*Cannabis sativa*) have exceptional nutritional value, being very rich in essential fatty acids (EFAs) and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) including omega-3 FAs. It is also interesting to note that hemp seeds are also a rich source of stearidonic acid (SDA), which can be converted into EPA. In addition, these seeds contain almost as much quality protein as soybeans and are also rich in vitamin E, minerals and fiber.

Therefore, the objective of this thesis was to evaluate, in comparison to a widely used seed for the prevention of dyslipidemia «flaxseed», the effects of dietary supplementation with whole hempseed on the development of obesity and related complications in a mouse model of diet-induced obesity and to determine its effects on the microbiome-endocannabinoidome axis. The overall hypothesis is that «hemp seeds improve metabolic parameters in obese mice in correlation with normalized circulating and tissue levels of eCBome lipid mediators as well as changes in gut microbiota composition. »

As a first step, and since our industrial partner had two varieties of hemp, we studied the nutritional and cannabinoid composition of Finola and X59 hemp seeds in order to choose the best variety, from a nutritional point of view, for our in vivo experiment. The results show that the Finola variety has a better qualitative composition in macro and micronutrient, compared to the X59 variety, the most important of which is the omega-3 composition. Therefore, we chose Finola seeds for the rest of the project. In a second step, we evaluated

the effects of Finola seeds mixed with a High Fat High Sucrose (HFHS) diet in an 8-week study in C57BL/6J mice, where the control groups were: HFHS, HFHS mixed with flaxseed and Low Fat Low Sucrose (LFLS). The results show that hemp seed supplementation produced a slight improvement in the metabolic and inflammatory profile compared to flax seed and the LFLS control. In contrast, both seeds significantly changed the eCBome by an increase in omega-3 mediators (whose precursors are omega-3 fatty acids) and a decrease in omega-6 mediators, especially in adipose tissue, compared with LFLS and HFHS. Exceptionally, SDA and its mediators were significantly increased in the hemp seed group. In a third step, we investigated the ability of 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes treated with omega-3 fatty acids or hemp seed and flax seed oils to produce their respective eCBome mediators. The results show that preadipocytes and 3T3-L1 adipocytes treated with omega-3 fatty acids were able to produce their respective eCBome mediators and that SDA was able to convert to EPA as well as their mediators. Therefore, the endocannabinoidome changes in the adipose tissue of mice observed within the *in vivo* protocol is likely, at least in part, a direct result of dietary fats on these cell types specifically. This thesis therefore showed that hemp seeds, rich in SDA, could induce beneficial changes in metabolism by altering the endocannabinoidome.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
REMERCIEMENTS	XVI
AVANT-PROPOS	XVII
INTRODUCTION.....	1
I. LA MALNUTRITION EST UN PROBLÈME MAJEUR DE SANTÉ PUBLIQUE	1
1) Définition et prévalence	1
2) La malnutrition la plus répandue : la suralimentation.....	2
3) Le déséquilibre du ratio oméga-6/oméga-3 est un facteur clé dans la suralimentation (obésité)....	3
II. L'IMPORTANCE DES OMEGA-3 DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DES MALADIES CHRONIQUES	6
1) L'effet des oméga -3 sur la vie périnatale	6
2) L'effet des oméga-3 sur la démence et fonction cognitive	7
3) L'effet des oméga -3 sur le cancer.....	7
4) L'effet des oméga -3 sur l'inflammation chronique	8
5) L'effet des oméga -3 sur la stéatose hépatique non alcoolique.....	10
6) L'effet des oméga -3 sur les maladies cardiovasculaires	11
7) L'effet des oméga -3 sur le syndrome métabolique	12
III. LE MECANISME PROTECTEUR DES OMEGA-3 PEUT S'EXPLIQUER PAR LA MODULATION DE L'ENDOCANNABINOÏDE ET LE MICROBIOME	14
1) L'Endocannabinoïde	14
2) Le Microbiote intestinal.....	22
3) Les oméga-3 modulent l'eCBome.....	24
4) Les Omega-3 modulent le microbiome	27
5) L'interaction microbiome — endocannbinoïde.....	28
IV. LES LIMITES DE LA CONSOMMATION DES OMEGA-3	29
1) L'industrie agroalimentaire	29
2) Coût élevé et manque de disponibilité des produits marins	30
3) Développement des allergies contre les produits marins.....	30
4) Véganisme.....	30
V. LES GRAINES DE CHANVRE UNE SOURCE ALTERNATIVE DE QUALITE DES OMEGA-3	31
1) Les graines de chanvre	31
2) La composition nutritionnelle riche des graines de chanvre ainsi que leur effet sur la santé métabolique	31
VI. PROBLEMATIQUE, OBJECTIF ET HYPOTHESE DE RECHERCHE	32
1) Problématique.....	32
2) Objectif.....	32
3) Hypothèse.....	32
CHAPITRE 1 THE NUTRITIONAL AND CANNABINOID COMPOSITION OF FINOLA AND X59 HEMP SEEDS....	34
RÉSUMÉ.....	34
ABSTRACT	35
I. INTRODUCTION.....	36

II. METHODS	38
III. RESULTS AND DISCUSSION.....	40
IV. CONCLUSION	48
CHAPITRE 2 HEMP SEEDS SUPPLEMENTATION IN MICE UNDER A HIGH FAT HIGH SUCROSE DIET PRODUCES A SLIGHTLY DIFFERENT PATTERN OF BENEFICIAL METABOLIC EFFECTS AS COMPARED TO LIN SEEDS, WITH A STRONGER REDUCTION OF ADIPOSE TISSUE INFLAMMATORY PROFILE: ROLE OF THE ENDOCANNABINOIDOME	49
RÉSUMÉ.....	49
ABSTRACT	50
I. INTRODUCTION.....	51
II. MATERIALS AND METHODS	56
III. RESULTS	60
IV. DISCUSSION.....	80
V. CONCLUSIONS	85
CHAPITRE 3 OMEGA-3 FATTY ACID SUPPLEMENTATION <i>IN VITRO</i> RESULTS IN THE PRODUCTION OF RELATED ENDOCANNABINOIDOME MEDIATORS IN 3T3-L1 ADIPOCYTES.....	86
RÉSUMÉ	86
ABSTRACT	87
I. INTRODUCTION.....	88
II. METHODS	91
III. RESULTS AND DISCUSSION	93
IV. CONCLUSIONS.....	100
DISCUSSION GÉNÉRALE	101
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	110
BIBLIOGRAPHIE	111
ANNEXES	139

Liste des figures

Figure 1 : Le métabolisme et source des AGs oméga-6 et oméga-3.....	4
Figure 2 : Comparaison des 2 principales définitions consensuelles utilisées pour le syndrome métabolique.....	13
Figure 3 : L'Endocannabinoidome (eCBome).....	18
Figure 4 : Classification du microbiote intestinal des mammifères.....	23
Figure 5 : La modulation théorique du système endocannabinoïde par les AGs oméga-6 et oméga-3.....	26
Figure 6 : Le microbiote intestinal module l'Endocannbinoidome.....	29
Figure 7 : (A) Body composition changes (delta difference) between week 0 and week 8.(B) Weight gain in g. (C) Daily food consumption in Kcal.....	62
Figure 8 : OGTT test after 8 weeks of diet.....	64
Figure 9 : Intestinal permeability test at week 8 done during OGTT.....	65
Figure 10 : (A) Hepatic triglycerides (sacrifice done after 12 hours of fasting); (B) Liver weight.....	66
Figure 11 : Metabolic parameters after 12 hours of fasting.....	67
Figure 12 : (A) Inflammation state in Plasma. (B) Inflammation state in the different tissues.....	69
Figure 13 : eCBome receptors and enzymes expression in the different tissues: BAT, EP AT, SC AT, Hypothalamus, Liver, Muscle and Plasma.....	71
Figure 14 : eCBome mediators in the different tissues: BAT, EP AT, SC AT, Hypothalamus, Liver, muscle and plasma.....	76
Figure 15 : SDA profile in all the tissues and Plasma.....	78
Figure 16 : 1.2 SDG profile in the tissues.....	79
Figure 17 : SDA metabolism and sources	88
Figure 18 : Fatty acids profile in 3T3-L1 cells undifferentiated (d0) and differentiated (d8).....	95

Figure 19 : *N*-acylethanolamines profile in 3T3-L1 cells undifferentiated (d0) and differentiated (d8).....97

Figure 20 : Monoacilglycerol profile in 3T3-L1 cells undifferentiated (d0) and differentiated (d8).....99

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition du syndrome métabolique selon l’OMS.....	12
Tableau 2 : Définition du syndrome métabolique selon NECP.....	13
Table 3 : Phytocannabinoid profile.....	42
Table 4 : Food Chemistry.....	44
Table 5 : Detailed Fatty Acid Profile (g/100g of whole hemp seeds) of X59 and Finola...	45

Liste des abréviations

1.2-AG	d5-Mono-arachidonoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-DHG	docosahexaenoyl-glycerol
1.2-DPG (n-3)	d5-Mono-docosapentaenoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-EPG	d5-Mono-eicosapentaenoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-LG	d5-Mono-linoleoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-OG	Mono-2-oleoyl-glycerol
1.2-PG	Palmitoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-SDG	Stearidonoyl-glycerol
AA	Arachidonic acid
Abhd12	Abhydrolase domain containing 12
Abhd16a	Abhydrolase domain containing 16
Abhd4	Abhydrolase domain containing 4
Abhd6	Abhydrolase domain containing 6
Adgrf1	Adhesion G protein coupled receptor F1
AEA	Anandamide
AG	Acides gras
Agk	Acylglycerol kinase
Akr1b3	Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)
Alox12	Arachidonate 12-lipoxygenase
Alox15	Arachidonate 15-lipoxygenase
BAT	Brown adipose tissue
Cacna1b	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1B subunit
Cacna1h	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit
CB1	Cannabinoid receptors of type 1

CB2	Cannabinoid receptors of type 2
Ces1d	Carboxylesterase 1D
Ces2h	Carboxylesterase 2H
Cnr1	Cannabinoid receptor 1 gene
Cnr2	Cannabinoid receptor 2 gene
CoA	Co-enzyme A
Comt	Catechol-O-methyltransferase
Dagla	Diacylglycerol lipase, alpha
Daglb	Diacylglycerol lipase, beta
Dgke	Diacylglycerol kinase, epsilon
DHA	Docosahexaenoic acid
DHEA	Docosahexaenoyl-ethanolamine
DPA	Docosapentaenoic acid
DPEA	Docosapentaenoyl ethanolamide
DT2	Diabète de type 2
eCBome	Endocannabinoidome
eCBs	Endocannabinoids
ECS	Endocannabinoid system
Enpp2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
EPA	Eicosapentaenoic acid
EPAT	Epididymal adipose tissue
EPEA	Eicosapentaenoyl-ethanolamine
Faah	Fatty acid amide hydrolase
Fam213b	Family with sequence similarity 213, member B
FA	Fatty acid

Gde1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
Gdpd1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
Glyat13	Glycine-N-acyltransferase-like 3
Gpr119	G protein-coupled receptor 119
Gpr18	G protein-coupled receptor 18
Gpr55	G protein-coupled receptor 55
HDL	High-density lipoproteins
HDL	Lipoprotéines de haute densité (High density lipoprotein)
HFHS	High fat high sucrose
HOMA-IR	Évaluation du modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline (Homeostatic model assessment of insulin resistance)
Hras15	HRAS-like suppressor family, member 5
IL	Interleukin
IMC	Indice de masse corporelle
Inpp5d	Inositol polyphosphate-5-phosphatase D
LA	Linoleic acid
LDL	Lipoprotéines de basse densité (Low density lipoproteins)
LEA	Linoleoyl-ethanolamine
LFLS	Low fat low sucrose
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	Monoacylglycerol
MCV	Maladies cardiovasculaires
MetS	Syndrome métabolique
Mgll	Monoglyceride lipase

Mogat1	Monoacylglycerol O-acyltransferase 1
MUFA	Monounsaturated fatty acids
Naaa	N-acylethanolamine acid amidase
NAE	N-acylethanolamines
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver diseases
Napepld enzyme	N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D-like
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
OEA	Oleoyl-ethanolamine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor
Pam	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
PEA	Palmitoyl-ethanolamine
PL	Phospholipides
Pla1a	Phospholipase A1 member A
Pla2g10	Phospholipase A2, group X
Pla2g4e	Phospholipase A2, group IVE
Pla2g5	Phospholipase A2, group V
Plcb1	Phospholipase C, beta 1
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Ptges	Prostaglandin E synthase
Ptgfr	Prostaglandin F receptor
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Ptpn22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)

PUFA	Polyunsaturated fatty acids
SCAT/ SAT	Subcutaneous adipose tissue
SDA	Stearidonic acid
SEA	Stearoyl ethanolamide
TA	Tissu adipeux
TG	Triglycerides
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
Trpa1	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
Trpm8	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8
Trpv1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
Trpv2	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2
Trpv4	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4
UCP	Uncoupling protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WAT	White adipose tissue
Δ 9-THC	Δ 9-tetrahydrocannabinol

Remerciements

Avant de commencer la présentation de ce travail, je profite de l'occasion pour remercier l'Université Laval ainsi que la responsable du programme de doctorat en médecine moléculaire, Madame la Professeure **Francine Durocher** pour m'avoir permis de réaliser mes études doctorales.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et toutes mes pensées de gratitude à mes encadrants de recherche, Professeur **Cristoforo Silvestri** et professeur **Vincenzo Di Marzo**, qui m'ont accompagnée de près durant tout ce travail, pour leur responsabilité, pour la confiance qu'ils ont su m'accorder, les conseils précieux qu'ils m'ont prodigués tout au long de la réalisation de ce projet et d'avoir accepté de m'encadrer pour mon stage de doctorat. Mes remerciements vont également à notre partenaire industriel **Nature's decision** ainsi que **Mitacs**.

Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements pour ma famille du laboratoire, **Claudia, Armita, Melissa, Besma, Giada, Francesco et Tommaso** ainsi que mes chères amies **Ghada, Yosra, Rihana, Manal et Charifa** pour leur soutien, leurs remarques pertinentes et leur encouragement.

Mes remerciements vont aussi à tous les personnels de l'équipe IUCPQ, et toutes les personnes qui m'ont soutenue jusqu'au bout, et qui n'ont pas cessé de me former et de me donner des conseils très importants, particulièrement **tous les professionnels de recherche et les étudiants au laboratoire du Professeur André Marette**.

Enfin, je ne trouve vraiment pas les mots pour remercier mon pays, ma belle **Tunisie**, et ma famille : mon père **Mohamed Salah**, ma mère **Saida**, toutes mes sœurs, mes neveux ainsi que mes beaux-frères. Vous êtes la raison de mon existence et de ma réussite, vous êtes ma source d'inspiration et de force... bref vous êtes toute ma VIE !

Avant-propos

Cette thèse de doctorat synthétise les travaux que j'ai effectués sous la direction du Dr Cristoforo Silvestri et la codirection du Dr Vincenzo Di Marzo à l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec. Elle porte sur les effets de la supplémentation en graines de chanvre entières sur l'axe endocannabinoïdome-microbiome et ses implications sur l'obésité induite par la diète. Une partie de la thèse a été réalisée en collaboration avec Nature's Decision et financée par Mitacs. Le Chapitre 1 à 3 présentent une partie des travaux réalisés au cours de mon doctorat sous forme d'articles originaux rédigés en anglais. Les articles présentés sont listés ci-dessous et sont accompagnés d'une description de ma contribution et celle des co-auteurs.

Chapitre 1 : Rim Ben Necib, Vincenzo Di Marzo, Cristoforo Silvestri. The nutritional and Cannabinoid composition of Finola and X59 hemp seeds. En révision finale pour être soumis. Les dosages ont été effectués par la compagnie AGAT. Cependant, j'ai fait un test de dosage des macro-nutriments avec l'aide de Mme Nancy Bolduc au laboratoire du pavillon Comtois de l'université Laval. J'ai également réalisé un test d'extraction et de dosage des polyphénols de 13 variétés différentes de chanvre dans le laboratoire du Dr Yves Desjardins à l'INAF. J'ai rédigé le manuscrit qui a été révisé par le Dr Cristoforo Silvestri et le Dr Vincenzo Di Marzo.

Chapitre 2 : Rim Ben Necib, Claudia Manca, Sébastien Lacroix, Cyril Martin, Vincenzo Di Marzo, Cristoforo Silvestri. Hemp seeds supplementation in mice under a high fat high sucrose diet produces a slight different pattern of beneficial metabolic effects as compared to Lin seeds, with a stronger reduction of adipose tissue inflammatory profile: role of the endocannabinoidome. En révision finale pour être soumis.

Dans cette étude, j'ai élaboré le protocole expérimental, réalisé le protocole animal et les expériences (manipulations animales, OGTT, le test de la perméabilité intestinale, les sacrifices, extraction d'ADN et d'ARN, ELISA, Bioplex, qPCR, PCR, 16S séquençage, extractions des AGs et préparations des échantillons lipidiques pour LCMS, extraction et

dosage des TG), effectué les analyses statistiques et analysé les données. La Dre Claudia Manca a contribué durant les sacrifices. Le Dr Sébastien Lacroix a effectué l'analyse bioinformatique du microbiote et les Heatmaps. Mr Cyril Martin a injecté les échantillons dans LCMS et exporté le fichier Excel. J'ai rédigé le manuscrit qui a été révisé par le Dr Cristoforo Silvestri et le Dr Vincenzo Di Marzo.

Chapitre 3 : Rim Ben Necib, Fadil Dahhani, Vincenzo Di Marzo, Cristoforo Silvestri. Omega-3 fatty acid supplementation *in vitro* results in the production of related endocannabinoidome mediators in 3T3-L1 adipocytes. En élaboration pour être complété et soumis.

Dans cette étude, j'ai élaboré le protocole expérimental, réalisé les expériences (manipulation des cellules, extractions des AGs et préparations des échantillons pour LCMS), effectué les analyses statistiques et analysé les données. Mr Fadil Dahhani a injecté les échantillons dans LCMS et exporté le fichier Excel. Je vais rédiger le manuscrit qui sera révisé par le Dr Cristoforo Silvestri et le Dr Vincenzo Di Marzo.

Au sein de l'équipe du Dr Cristoforo Silvestri, j'ai notamment contribué à l'avancement de plusieurs projets de mes collègues.

En collaboration avec l'équipe du Dr André Marette, j'ai également effectué plusieurs extractions des AGs et préparations des échantillons pour LCMS.

Introduction

I. La malnutrition est un problème majeur de santé publique

1) Définition et prévalence

La malnutrition est un problème majeur de santé publique dans le monde entier, tant chez les enfants que chez les adultes (1). Elle touche toutes les tranches d'âge, tous les genres ainsi que tous les niveaux socio-économiques. Il s'agit non seulement d'un problème de santé, mais aussi d'un obstacle à l'éradication de la pauvreté, à la productivité et à la croissance économique dans le monde dont les conséquences sont graves et durables sur les individus, leurs familles et les communautés (1).

Le terme « malnutrition » est utilisé pour décrire une carence, un excès ou un déséquilibre d'un large éventail de micro et macronutriments, entraînant un effet négatif mesurable sur la composition corporelle, la fonction et l'examen clinique (2). Il existe plusieurs formes de malnutrition, dont deux grandes catégories : **la dénutrition et la suralimentation**.

La dénutrition se manifeste par une malnutrition chronique qui se représente sous un retard de croissance ou une taille insuffisante par rapport à l'âge, et une malnutrition aiguë qui se représente sous un poids insuffisant par rapport à la taille ou un poids insuffisant par rapport à l'âge, ainsi que des carences de minéraux et de vitamines.

La suralimentation comprend le surpoids, l'obésité et les maladies non transmissibles (MNT) liées à l'alimentation, telle que les maladies cardiaques, le diabète type 2, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et certaines formes de cancer (1).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 462 millions d'adultes présentent une insuffisance pondérale, tandis que 1,9 milliard d'adultes sont en surpoids ou obèses. Chez les enfants de moins de 5 ans, 155 millions souffrent d'un retard de croissance, 52 millions sont amaigris, 17 millions sont sévèrement maigres et 41 millions sont en surpoids ou obèses (1).

2) La malnutrition la plus répandue : la suralimentation

Certes que les maladies infectieuses et la sous-nutrition sont des facteurs importants de mortalité et de mauvaise santé, mais le surpoids et l'obésité sont apparus comme le problème nutritionnel mondial le plus répandu au cours des deux dernières décennies. Les scientifiques estiment à 1,9 milliard le nombre d'adultes en surpoids dans le monde, dont 155 millions sont des enfants (4). Les problèmes de santé liés à l'obésité apparaissent dès les premières années de la vie et progressent à l'âge adulte (5). L'obésité résulte d'un déséquilibre entre l'apport énergétique et la dépense énergétique, et elle est mesurée par l'indice de masse corporelle (IMC). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), un $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ est défini comme une surcharge pondérale, et un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ est défini comme une obésité (6).

Sur le plan cellulaire, l'obésité se définit par une augmentation des cellules graisseuses ou de la taille des adipocytes individuels. La taille des adipocytes augmente (hypertrophie) en raison d'un stockage accru de triacylglycérols provenant de sources alimentaires ou de voies lipogénèse endogène. Le nombre d'adipocytes augmente (hyperplasie) en raison d'une prolifération et d'une différenciation accrues (7). L'hypertrophie représente la forme la plus dangereuse vu qu'elle provoque l'infiltration des adipocytes par les macrophages et l'installation d'une inflammation chronique. Par conséquent, l'obésité est considérée comme une maladie inflammatoire chronique de bas grade (8). Plusieurs maladies chroniques sont associées à l'obésité comme le diabète, les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension artérielle, les cancers et les maladies cardiaques (9).

En apparence, les personnes souffrant d'obésité semblent bien nourries et ayant une surcharge en macro et micronutriments alors qu'ils sont souvent dénutris et souffrent de plusieurs carences vues que leur alimentation est basée sur la quantité et non la qualité (10,11). Les deux carences nutritionnelles les plus diagnostiquées cliniquement et biologiquement sont la carence protéino-énergétique et la carence en fer.

La carence protéino-énergétique chez les individus obèses est masquée par le surpoids et peut aller jusqu'au la sarcopénie qui se définit par une perte de masse musculaire associée à une altération fonctionnelle des muscles. La sarcopénie chez les personnes obèses augmente le

risque des maladies cardiovasculaires et la mort subite, d'où la mise en place des différentes techniques de dépistage afin d'avoir un traitement rapide et efficace (12).

La carence en fer est très fréquente chez les personnes obèses et dont la majorité sont des femmes (13). L'anémie chez la femme enceinte obèse est encore plus accentuée vu l'augmentation de ses besoins biologique en fer. Les conséquences de l'anémie durant la grossesse sont plus graves non seulement pour la mère, mais aussi pour le fœtus comme le retard de croissance intra-utérin et des séquelles neurologiques permanentes (14). De ce fait, la santé publique a mis des mesures préventives comme la supplémentation systématique des femmes enceintes en fer et vitamine B9 (15). Cependant, il existe d'autres carences aussi fréquentes qui sont méconnues et insuffisamment traitées comme la carence en oméga-3. Le déséquilibre du ratio oméga-6/oméga-3 est un facteur de risque important chez les individus obèses qui semble malheureusement peu investigué.

3) Le déséquilibre du ratio oméga-6/oméga-3 est un facteur clé dans la suralimentation (obésité)

a. Le ratio oméga-6/omega-3

Les acides gras oméga-6 et oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés (AGPI), ce qui signifie qu'ils contiennent plus d'une double liaison. Leur identification se fait par la détermination de l'emplacement de la première double liaison, en comptant à partir de l'extrémité méthyle de la molécule (16). Les oméga-6 sont les plus abondants dans la nature et se trouvent dans la plupart des graines et leurs huiles comme l'huile de tournesol, l'huile de maïs, l'huile de soja et l'huile de citrouille, et ils se représentent par l'acide linoléique (LA) (18:2 ω -6). Concernant les oméga-3, ils se trouvent dans les chloroplastes des légumes à feuilles vertes, ainsi que dans les graines de lin, de chanvre, de colza, de chia, et les noix, et ils se représentent sous l'acide alpha-linolénique (ALA) (18:3 ω -3) (17).

L'acide linoléique (LA) et l'acide alpha-linolénique (ALA) sont des acides gras essentiels qui ne peuvent pas être produits par le corps humain ou d'autres organismes mammifères en raison de l'absence d'enzymes endogènes. Ils doivent donc être fournis par l'alimentation.

En même temps, les oméga-6 ne peuvent pas être convertis en oméga-3, car le corps ne possède pas l'enzyme de conversion, l'oméga-3 désaturase. (18,19). Théoriquement, le corps peut synthétiser des acides gras oméga-6 plus longs comme l'acide arachidonique (AA), et

des oméga-3 plus longs comme l'acide stéaridonique (SDA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), à partir de LA et ALA, respectivement, par une série de réactions de désaturation (ajout d'une double liaison entre deux atomes de carbone) et d'élongation (ajout de deux atomes de carbone) (Figure 1). Néanmoins, l'enzyme initiale $\Delta 6$ désaturase dans la conversion de l'ALA en SDA est à taux limité chez l'homme, d'où la faible conversion d'ALA en SDA, EPA ainsi que DHA (20). Pour cela les meilleures sources des oméga-3, avec une meilleure biodisponibilité, sont les poissons gras tels que le saumon, le hareng, le maquereau, les sardines et les fruits de mer ainsi que leurs huiles qui sont une source immédiate de SDA, EPA et DHA (21).

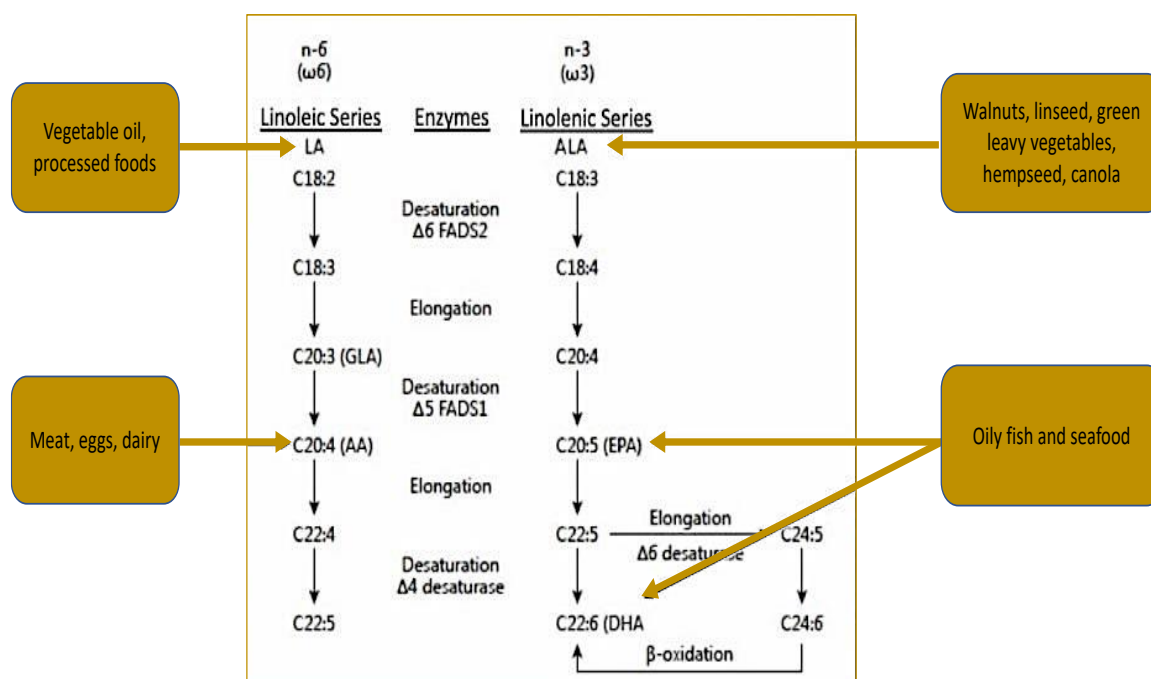


Figure 1 : Le métabolisme et source des AGs oméga-6 et oméga-3 (inspirée de Simopoulos et al, 2006)

Durant l'évolution humaine, on présume que le rapport oméga-6/oméga-3 était proche de 1 alors qu'il est passé aujourd'hui à 20 : 1 dans les régimes occidentaux. Les régimes occidentaux sont pauvres en oméga-3 et très riches en oméga-6, ce qui désaccorde avec le régime sur lequel les êtres humains ont évolué et leurs programmations génétiques se sont

établis (16,17). De nos jours, l'évaluation de cet apport se fait par le test de l'indice oméga-3 qui se fait par la mesure de la quantité d'EPA et de DHA dans le sang (24). Malheureusement le déséquilibre de ratio oméga-6/ oméga-3 ne représente pas seulement un trouble nutritionnel, mais plutôt un problème de santé grave vu l'implication de ces acides gras dans le fonctionnement de l'organisme comme la fonction membranaire et cellulaire, la vision, le système nerveux central, le système immunitaire ainsi que la prévention ou la provocation de plusieurs maladies ainsi que des troubles métaboliques (25).

b. Le ratio oméga-6/oméga-3 et la suralimentation (l'obésité)

Plusieurs études nutritionnelles montrent que les rapports oméga-6/oméga-3 élevés ont un lien direct à « l'épidémie d'obésité » (26,27). Différentes études cliniques prouvent la présence d'un effet positif des oméga-3 sur la réduction du poids (28), la composition corporelle (29) ainsi que la diminution de la faim et l'augmentation de la satiété (30). D'autres études ont montré que la supplémentation en oméga-3 réduisait le poids corporel chez les individus maigres (31), en surpoids (20, 22, 24) et obèses (33). De même, dans les études fondamentales, l'utilisation d'un modèle de souris transgénique fat-1 qui porte un gène codant pour une désaturase des acides gras oméga-3, donnent des résultats semblables. Cette enzyme peut convertir les oméga-6 en oméga-3 en ajoutant une double liaison à la position oméga-3. En fait, l'expression de ce gène n'augmente pas uniquement les niveaux oméga-3, mais diminue également de manière concomitante les oméga-6 ainsi que le rapport oméga-6/oméga-3 (34). Ces études montrent que lorsque ces souris transgéniques sont soumises à un régime riche en graisses, elles résistent à l'obésité, à l'hypercholestérolémie, à la stéatose hépatique et au diabète grâce à une augmentation de leur dépense énergétique (34). Ces résultats, ensemble, viennent confirmer un rôle potentiel des oméga-3 dans la régulation du métabolisme ainsi que la dépense énergétique chez l'être humain et les animaux. D'ailleurs, le déséquilibre du ratio oméga-3/oméga-6 favorise de nombreuses maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer et les maladies inflammatoires et auto-immunes (35). Néanmoins, la consommation régulière et suffisante en oméga-3, comme chez les populations autochtones d'Alaska, a été associée à une faible incidence de ces maladies (36–38). Le rapport équilibré oméga-6/oméga-3 représente ainsi un facteur indispensable pour la prévention de l'obésité.

II. L'importance des Omega-3 dans la prévention et le traitement des maladies chroniques

1) L'effet des oméga -3 sur la vie périnatale

Au cours de la vie prénatale, nous savons que les modifications de l'environnement intra-utérin modifient le statut métabolique du fœtus (39). En fait, la nutrition prénatale et le stress sont les principaux facteurs qui peuvent altérer de manière permanente l'expression génique du ressort au moyen de mécanismes épigénétiques, altérant ainsi la fonction des cellules et des organes et conduisant à des anomalies métaboliques dans la vie postnatale. Les données épidémiologiques collectées de la famine hollandaise constituent la première preuve de la capacité d'un facteur environnemental (dénutrition maternelle ou insuffisance placentaire) à affecter le développement pré et postnatal et l'état de santé des adultes (40). Plus précisément, des études subséquentes ont montré que les personnes nées pendant cette famine étaient non seulement touchées par l'obésité à l'âge adulte, mais aussi par la dyslipidémie athérogène, la résistance à l'insuline, le diabète et les maladies cardiovasculaires (41).

De nouvelles données indiquent que les niveaux circulants d'acides gras essentiels chez la mère peuvent moduler la croissance et le développement du fœtus. En effet, la consommation de régimes dont le rapport oméga-6 oméga-3 est déséquilibré avant ou pendant la grossesse peut avoir des effets néfastes sur le développement du fœtus et influencer la santé globale de la progéniture à l'âge adulte. Les oméga -6 et les oméga -3 ainsi que leurs métabolites, sont transférés à travers le placenta et peuvent avoir des effets notables sur le développement du système nerveux central (SNC) vu leurs importances dans le développement des systèmes neurologique et immunitaire du fœtus (42,43).

Les oméga -3 sont importants pour la fonction de la membrane cellulaire et sont essentiels au développement sain du cerveau et de la rétine du fœtus (44), par contre un apport élevé en oméga -6 dans l'alimentation de la mère est associé négativement à certains aspects du développement neurologique de l'enfant, en particulier chez les enfants qui n'ont jamais été allaités (45). De plus, les régimes maternels riches en oméga -6 sont associés à l'origine précoce de l'obésité (46), alors qu'un régime riche en oméga -3 est associé avec des effets anti-inflammatoires et antithrombotiques (47). En parallèle, des études chez les souris transgéniques Fat-1 montrent que la diminution du ratio oméga-6/oméga-3 réduit

l'inflammation associée à l'obésité maternelle et protège contre l'accumulation de lipides placentaires et fœtaux induite par un régime riche en graisses, réduisant ainsi la programmation fœtale défavorable (48). De ce fait, les acides gras oméga -3 sont considérés comme un facteur important dans le bon développement du fœtus et la protection contre les complications métaboliques à l'âge adulte.

2) L'effet des oméga-3 sur la démence et fonction cognitive

La démence est un trouble neurocognitif grave qui se manifeste par une dégradation de la mémoire et trouble du comportement accompagné par une difficulté à réaliser les activités quotidiennes (49). Actuellement, la démence est la cause de mortalité la plus fréquente dans les pays développés (50), et malgré toutes les recherches et les études cliniques, il n'existe aucun traitement qui peut améliorer efficacement les symptômes (51). Plusieurs facteurs reliés au milieu de vie pouvant augmenter le risque de développer une démence comme le tabagisme, la sédentarité, la dépression, l'hypertension, le diabète et l'obésité (52).

Des études récentes incriminent aussi d'autres facteurs comme le déséquilibre du ratio oméga-6/oméga-3. En fait, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des taux sériques d'oméga -3 plus faibles que les personnes en bonne santé cognitive (53,54). Les taux d'oméga -3 plus faibles sont également associés à une accumulation de dépôts de protéines, appelés amyloïdes cérébrales, plus importante chez les adultes âgés en bonne santé, tandis qu'un taux d'oméga -3 plus élevé est corrélé à la préservation du volume cérébral (55). Ces résultats sont soutenus par certaines études d'observation indiquant que les régimes riches en oméga-3 sont associés à un risque réduit de déclin cognitif, de maladie d'Alzheimer et de démence (56,57). En effet, les chercheurs supposent que les oméga-3 pourraient protéger les fonctions cognitives en contribuant à maintenir les fonctions neuronales et l'intégrité des membranes cellulaires dans le cerveau vu qu'ils sont une composante essentielle des phospholipides des membranes cellulaires du cerveau (57).

3) L'effet des oméga -3 sur le cancer

La multiplication cellulaire est un phénomène physiologique normal dans le corps. Le cancer s'identifie par une multiplication incontrôlée de cellules échappant le contrôle de l'organisme pour former une masse qu'on appelle tumeur maligne. En absence de diagnostic et traitement

efficace, cette tumeur maligne va migrer et envahir les tissus voisins pour former d'autres tumeurs et atteindre le stade final « la métastase » qui se poursuit par la mort (58).

Selon un rapport récent des États-Unis, publié en 2014, il y a près de 1, 655, 540 nouveaux cas de cancer et d'environ 585, 720 décès par an (59). De nos jours, il existe plusieurs traitements pour le cancer notamment la chirurgie, la chimiothérapie, la photothérapie et la radiothérapie, mais à cause de l'indisponibilité et du faible rapport coût-efficacité de ces stratégies, il est important de favoriser la prévention ainsi que le diagnostic précoce (60–63).

Le cancer est une maladie multifactorielle dont les principaux facteurs sont la génétique, notant les altérations et les mutations génétiques ainsi que l'épigénétique (64). Cependant, d'autres facteurs environnementaux sont aussi importants comme la consommation d'alcool, le tabagisme, les changements hormonaux et la pollution (65–67). Une attention de plus en plus grande est accordée au ratio oméga-6/oméga-3 vu qu'il peut moduler considérablement le risque du cancer. En effet, la consommation élevée d'oméga-6 est corrélée à l'incidence de plusieurs types de cancers comme le cancer du sein et du pancréas (68), en partie, par l'augmentation de la Prostaglandine E2 qui favorise leur formation (69). Alors qu'une consommation élevée en oméga-3 est inversement proportionnelle à l'incidence de ces cancers (70–74) en rendant les membranes des cellules tumorales plus riches en AG insaturés, et plus faibles en AG saturés, de façon que les cellules deviennent plus sensibles, moins rigides et plus vulnérables au traitement (75). D'ailleurs, plusieurs études cliniques ont prouvé le rôle thérapeutique des aliments d'origine marine dans le traitement du cancer par l'administration diététique de l'huile de poisson ou ses principaux composants actifs, les acides gras oméga-3 (76–79). De plus, les oméga-3 peuvent améliorer l'efficacité et la tolérance des traitements usuels comme la chimiothérapie et la radiothérapie (80). Une autre fois, les oméga -3 semblent très importants dans la prévention et le traitement du cancer.

4) L'effet des oméga -3 sur l'inflammation chronique

L'inflammation physiologique est un élément central dans l'immunité innée. L'immunité innée est un mécanisme de défense qui protège l'hôte contre les infections et les agents pathogènes. C'est une activité essentielle pour initier les processus de destruction des bactéries et des virus suivis de la réparation des tissus afin de restaurer l'homéostasie tissulaire.

Certes, les réponses inflammatoires sont indispensables pour protéger le corps, mais si elles ne sont pas bien régulées, elles peuvent provoquer des dommages aux tissus comme dans le cas de l'inflammation chronique (73). L'inflammation chronique est une phase anormale de l'inflammation, caractérisée par sa persistance dans le temps ainsi que le développement des maladies chroniques (81).

Il est important de noter que l'inflammation chronique de bas grade, favorisée par la libération de nombreux médiateurs inflammatoires par le tissu adipeux et, surtout, par les macrophages infiltrés, est un élément présent dans l'obésité. Notant aussi que les personnes obèses présentent des concentrations circulantes plus élevées de nombreux marqueurs inflammatoires que les personnes minces. En outre, un grand nombre d'essais ont montré que l'excès de graisse corporelle à l'âge adulte est associé à des niveaux élevés de marqueurs inflammatoires comme la leptine, la CRP et l'IL-6 (82-84).

Plusieurs facteurs favorisent cette inflammation, notamment le déséquilibre du ratio oméga-6/oméga-3. D'ailleurs, les métabolites dérivés des oméga-6 et des oméga-3 ont d'importantes fonctions dans la régulation immunitaire. Ces métabolites sont généralement connus sous le nom de médiateurs pro-résolution et peuvent être classés en différentes familles : prostaglandines, thromboxanes, protectines, leucotriènes, marésines et résolvines. Leur synthèse est harmonisée par les enzymes lipoxygénase, cyclooxygénase ou cytochrome P450 (85). Les substrats oméga-3 et oméga-6 sont en compétition pour ces enzymes (86). Par conséquent, en présence d'acides gras oméga-3, la concurrence pour les enzymes réduit la synthèse des métabolites dérivés des oméga-6, qui donne un niveau supplémentaire d'immunorégulation par les acides gras oméga-3. En effet, les oméga-6 ont un rôle pro-inflammatoire critique, car ils sont convertis en prostaglandines oméga-6 et en leucotriènes oméga-6 eicosanoïdes au cours de la cascade inflammatoire, tandis que les oméga-3 sont des précurseurs d'eicosanoïdes aux propriétés anti-inflammatoires (87). De plus, d'autres études ont montré qu'une supplémentation suffisante et efficace des oméga-3 est capable de diminuer significativement les marqueurs inflammatoires (88).

Autrement investigué, les concentrations plus élevées en oméga-3 dans la membrane plasmique favorisent la production de médiateurs, tels que les résolvines, les marésines et les

protectines, qui sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et la guérison (89–91). En conclusion, il est indispensable d'avoir un ratio oméga-6/oméga-3 équilibré afin de prévenir et traiter l'inflammation chronique.

5) L'effet des oméga -3 sur la stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est une maladie grave qui peut conduire, asymptomatiquement, à des lésions hépatiques progressives, une fibrose hépatique puis une cirrhose qui finit par un cancer du foie (92). La NAFLD se caractérise par l'accumulation de lipides à plus de 5 % du poids total du foie, sans lien avec la consommation d'alcool (93). Cette dernière est la maladie chronique du foie la plus courante dans les pays développés et qui touche les adultes comme les enfants (94). Les quatre principaux facteurs de risque de la NAFLD sont la dyslipidémie, l'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique (95).

La NAFLD se développe principalement à cause d'un métabolisme anormal des graisses entraînant l'accumulation hépatique de lipides, suite à un dysfonctionnement qui touche plusieurs mécanismes comme la lipogénèse de novo, l'absorption des graisses de la circulation et leur assimilation dans les lipides ainsi que l'oxydation des acides gras (95). Les oméga-3 régulent, en partie, toutes ces voies, en contrôlant l'activité des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces mécanismes (95,96). Les oméga -3 sont des régulateurs négatifs de la lipogénèse hépatique et de l'accumulation du gras ectopique (97,98). D'ailleurs, la NAFLD est associée à un déséquilibre du rapport oméga-6/oméga-3 avec un excès d'acides gras polyinsaturés oméga -6 et à une carence en oméga-3 dans l'alimentation (99,100). De plus, plusieurs études cliniques ont indiqué que les patients atteints de NAFLD ont, effectivement, un rapport oméga-6/oméga-3 plus élevé (101,102). Cependant, une supplémentation de 0,25 à 1,3 g par jour en oméga-3 (DHA) durant 6 à 12 mois, était capable d'améliorer la stéatose hépatique ainsi que la dyslipidémie chez les patients (103). En effet, de nombreux essais cliniques ont prouvé que la supplémentation en oméga -3 est une thérapie préventive et curative pour combattre la NAFLD (104). De même, les études précliniques ont donné des résultats similaires, où une supplémentation en oméga -3 avec un régime gras, chez des souris obèses présentant une NASH préexistante, était capable de diminuer la graisse hépatique,

l'inflammation et d'atténuer la progression de la NASH (105). Tous ces résultats suggèrent que les effets des suppléments d'oméga-3 puissent réduire l'accumulation de lipides au foie.

6) L'effet des oméga -3 sur les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont l'un des problèmes de santé publique les plus importants dans le monde. Elles sont généralement associées à une accumulation de dépôts graisseux dans les artères (athérosclérose) et à un risque accru de caillots sanguins responsables des accidents vasculaires cérébraux (thromboses) (106). Les MCV sont les maladies non transmissibles les plus courantes responsables d'environ 17,8 millions de décès en 2017 (107). Les facteurs de risques des MCV sont multiples, dont les principaux sont l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie, les anomalies lipidiques, l'obésité, le tabagisme et la sédentarité ainsi que le régime alimentaire (108). Plusieurs études ont trouvé que le déséquilibre alimentaire, comme des quantités excessives oméga-6 avec un rapport oméga-6/oméga-3 très élevé, favorise la pathogenèse de nombreuses maladies, notamment les maladies cardiovasculaires (109). D'ailleurs, plus le rapport entre les acides gras oméga-6/oméga-3 est élevé dans la membrane cellulaire, plus le taux de mortalité par maladie cardiovasculaire est élevé (110) ; alors que, un rapport de 4/1 a été associé à une diminution de 70 % de la mortalité totale causée par les maladies cardiovasculaires (35).

De grandes études de population ont montré que la consommation de poisson, dont le régime méditerranéen, est fortement associée à une réduction des MCV ainsi que leurs facteurs de risques (111–113). De plus, une consommation de poisson 1 à 2 portions par semaine, en particulier d'espèces plus riches en EPA et DHA, est associée à une réduction du risque de décès coronarien et de mortalité totale (114). De ce fait, *l'American Heart Association* recommande la consommation de poissons au moins deux fois par semaine (115). De même, la supplémentation en oméga -3 est efficace pour protéger contre les MCV. Par exemple, un essai réalisé en Italie a démontré que la supplémentation en oméga-3 à raison de 1g par jour réduisait de manière significative le critère principal combiné de décès, d'infarctus non fatal et d'accident vasculaire cérébral non fatal chez 2 836 patients sur une période de suivi de 42 mois (116). En effet, les acides gras oméga-3 présentent des propriétés antithrombotiques importantes. Il a été démontré qu'ils peuvent inhiber la synthèse de la thromboxane A₂, une prostaglandine qui provoque l'agrégation des plaquettes et la vasoconstriction, ainsi que la

formation de la plaque d'athérome (117,118). En nous basant sur toutes ces données, nous pouvons conclure que les oméga-3 jouent un rôle possible dans la prévention des complications des maladies cardiovasculaires.

7) L'effet des oméga -3 sur le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique a, à l'heure actuelle, deux définitions principales, celle de l'OMS (Tableau 1) publiée en 1998 puis amendée en 1999 et celle du National Cholesterol Education Program américain (NCEP-ATPIII) (Tableau 2), publiée en 2001.

Selon l'OMS, le syndrome métabolique se définit par la coexistence d'un trouble glycémique (diabète de type 2, intolérance au glucose ou hyperglycémie modérée à jeun) avec au moins 2 des 4 critères suivants : obésité, pression artérielle élevée, microprotéinurie élevée, hypertriglycéridémie et faible taux de HDL-cholestérol.

Tableau 1 : Définition du syndrome métabolique selon l'OMS

Résistance à l'insuline ou diabète de type 2 ou hyperglycémie modérée à jeun plus de 2 critères:	
Pression artérielle élevée	PA > 140/90 ou tt anti HTA
Triglycérides	TG > 150 mg/dL
HDL-C	HDL < 35mg/dL (homme); < 39mg/dL (femme)
Obésité	IMC > 30 et/ou T/H > 0,9 (homme); > 0,85 (femme)
Microprotéinurie	Albumine urinaire > 20mg/mn; Alb/Cr > 30mg/g

Pour le NCEP-ATPIII, le syndrome métabolique se caractérise par la présence d'au moins 3 des 5 critères suivants : obésité abdominale, hypertriglycéridémie, hypo- HDLémie, Hyperglycémie et hypertension artérielle.

Tableau 2 : Définition du syndrome métabolique selon NECP

Facteur de risque	Seuil de diagnostique
Obésité abdominal Périmètre abdominal :	
Homme	> 102 cm
Femme	> 88cm
Triglycérides	> 1,5 g/L
HDL-C :	
Homme	< 0,4 g/L
femme	< 0,5 g/L
PA	> 130/85 mmHg
Glycémie	> 1,1 g/L

Les deux séries de critères d'identification ont en commun la prise en compte d'une association de facteurs de risques : hypertension artérielle, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, obésité et troubles glycémiques (119) (Figure 2).

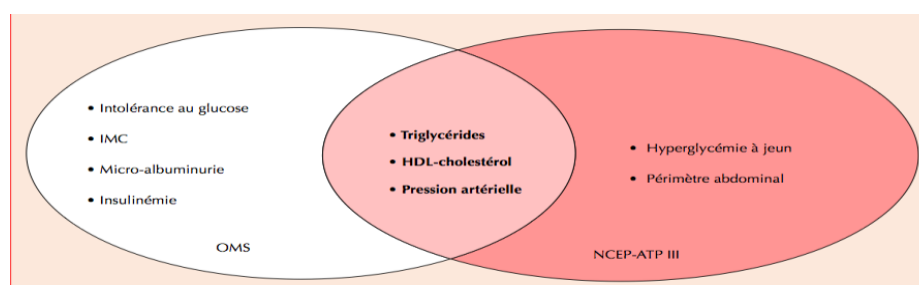


Figure 2 : Comparaison des 2 principales définitions consensuelles utilisées pour le syndrome métabolique.

La prévalence du syndrome métabolique (MetS) augmente de manière alarmante dans le monde. La fédération internationale du diabète (IDF) estime qu'environ 20 à 25 % de la population adulte mondiale souffre de ce syndrome (120). Ceci est d'autant plus grave que le MetS confère des risques accrus (5x et 2x respectivement) de développer un diabète de type 2 (DT2) ou une maladie cardiovasculaire (MCV) au cours des 5 à 10 prochaines années. Plus précisément, les patients atteints de MetS courent un risque 2 à 4 fois plus élevé d'accident vasculaire cérébral, un risque 3 à 4 fois plus élevé d'infarctus du myocarde (MI)

et 2 fois plus de risques de mourir d'un tel événement que ceux sans le syndrome indépendamment d'un antécédent d'événements cardiovasculaires. Enfin, le MetS est considéré comme un facteur de risque de premier ordre pour les complications athérotrombotiques (121).

La prise en charge du syndrome métabolique consiste à traiter, en premier lieu, les deux paramètres étiologiques importants favorisant le développement de ce syndrome qui sont respectivement l'obésité et la sédentarité. Une modification des habitudes de vie incluant une augmentation de l'activité physique d'intensité modérée, et une alimentation équilibrée avec un régime riche en oméga-3 constituent la base de la prise en charge. Il était déjà prouvé qu'un changement de mode de vie en faisant de l'exercice physique associé à un régime alimentaire sain peut réduire la prévalence de MetS de 24 % (122). Cependant, une supplémentation de 3 g d'huile de poisson pendant 20 semaines à ce mode de vie saine, a montré meilleurs résultats avec une diminution des valeurs du tour de taille, de triacylglycérol ainsi que la pression systolique et diastolique (123). En effet, les oméga-3 peuvent contribuer au traitement et à la prévention des comorbidités de l'obésité, ainsi que les composantes du syndrome métabolique (124,125). La supplémentation en oméga-3 empêche la prise de poids ainsi que la dyslipidémie induite par un régime riche en graisses (HF) (126-128), par la diminution de l'activité de récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ) qui régule la transcription de gènes importants pour le métabolisme des lipides. La diminution de son activité diminue les réserves lipidiques dans le tissu adipeux et agit sur le cerveau en provoquant une anorexie ; deux facteurs liés à la diminution de la graisse corporelle (129,130). De plus, la supplémentation en oméga-3 améliore l'homéostasie glycémique ainsi que l'insulino-résistance dépendamment (131) ou indépendamment de la perte du poids (132). Ces données confirment l'importance des oméga-3 dans la prévention et le traitement du MetS.

III. Le mécanisme protecteur des oméga-3 peut s'expliquer par la modulation de l'endocannabinoidome et le microbiome

1) L'Endocannabinoidome

a- Le système endocannabinoïde (ECS)

Le *Cannabis sativa* est une importante espèce herbacée originaire d'Asie centrale, qui est utilisée en médecine traditionnelle et comme source de fibres textiles depuis la plus lointaine des époques, avec des composés majeurs comme le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) (133). Le THC est une composante psychoactive présente à des teneurs très élevées dans la variété droguante de *Cannabis sativa* « la marijuana », et il est le seul cannabinoïde d'origine végétale connu pour être capable d'activer les récepteurs CB1 et CB2 de manière puissante et efficace (134). La découverte de ce composé a conduit à la découverte d'un important système : le système endocannabinoïde.

Le système endocannabinoïde (ECS) est un mécanisme de signalisation distribué dans tout le corps des mammifères, et présent également chez les vertébrés non-mammifères. Il se constitue des endocannabinoïdes (eCBs), qui activent les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, ainsi que les enzymes anabolisantes et catabolisantes pour le eCBs (135,136). Les eCBs sont des lipides de signalisation dérivés d'acides gras à longue chaîne, généralement produits à la demande à partir de précurseurs phospholipidiques (137). Les lipides dérivés de l'acide gras essentiel oméga-6 l'acide arachidonique (AA) : le *N*-arachidonoyléthanolamine (AEA ou anandamide) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), ont été identifiés et démontrés qu'ils étaient capables de se lier de manière très puissante aux récepteurs CB1 et CB2, stimulant ainsi leur activité (124,128). Ces molécules, AEA et 2-AG, ont été nommées, alors, eCBs (139).

Les eCBs ont leurs propres voies et enzymes anaboliques et cataboliques ainsi que leurs précurseurs biosynthétiques. 2-AG est produit à partir de l'hydrolyse des 1-acyl-sn-2-arachidonoyl-glycérols (AcArGs), catalysée par soit la diacylglycérol lipase alpha ou bêta (DAGL alpha ou DAGL bêta), tandis que AEA est biosynthétisée à partir de l'hydrolyse de *N*-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamines et catalysée par une enzyme de type phospholipase D spécifique du *N*-acyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE-PLD). Le 2-AG est hydrolysé en AA et glycérol par le monoacylglycérol lipase (MAGL) et l'AEA en AA et l'éthanolamine par l'amide hydrolase des acides gras (FAAH) (140–143). Il existe également différentes voies suggérées pour la synthèse et la dégradation du AEA et 2-AG qui sont en cours d'investigation.

Le système endocannabinoïde joue un rôle central et périphérique en diminuant le métabolisme de base et en augmentant le stockage d'énergie dans plusieurs organes. Sur le plan central, la fonction principale des récepteurs CB1 est de contrôler le comportement, comme, par exemple, les aspects homéostatiques, motivationnels, et sensoriels de l'alimentation (144–146) par le biais d'une multitude de voies neuronales dans plusieurs zones du cerveau, entraînant ainsi une augmentation de la prise alimentaire. Cela explique l'augmentation importante des niveaux hypothalamiques d'eCBs suite à un jeûne (147). Cette augmentation est dû, en partie, à une diminution de la signalisation de la leptine, qui réduit normalement les niveaux d'eCBs. Un dysfonctionnement de la signalisation de la leptine, de l'insuline et des glucocorticoïdes, contribuent ainsi à l'hyperphagie, au dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau et à l'inflammation suite à l'absence d'un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la sécrétion des eCBs (148,149).

Dans les tissus périphériques, les récepteurs CB1 contrôlent plusieurs tissus importants sur le plan métabolique, via le système nerveux sympathique ou des actions directes sur les hépatocytes, les adipocytes blancs et bruns, les cellules musculaires squelettiques, les cellules épithéliales entéroendocrines et les cellules β pancréatiques. La surstimulation de ces récepteurs entraîne ainsi plusieurs dysrégulations en cascade dans différents tissus et organes : dans le tissu adipeux brun, diminution de l'innervation sympathique et de la thermogénèse adaptative ; dans le tissu adipeux blanc, augmentation de la lipogénèse et de la résistance à l'insuline ; dans le foie, augmentation de la lipogénèse de novo et de la résistance à l'insuline ; dans le tube digestif, diminution de la satiété, de la motilité gastro-intestinale et dérèglement de la fonction du microbiote intestinal ; dans le pancréas, augmentation de la sécrétion d'insuline basale ; et dans le muscle diminution de l'absorption du glucose médiée par l'insuline (150).

Généralement, le dérèglement de l'ECS, plus spécifiquement l'hyperstimulation et l'hyperactivation de récepteur CB1, sont associées à une augmentation de l'adiposité, de la stéatose hépatique, de la dyslipidémie et de la résistance à l'insuline (151). Par conséquent, ce récepteur a attiré une attention particulière des chercheurs ainsi que l'industrie pharmaceutique comme une cible pour traiter l'obésité et les troubles métaboliques. Le Rimonabant est un antagoniste/agoniste inverse pharmacologique sélectif des

récepteurs CB1 (152) qui a démontré des effets bénéfiques sur l'obésité, l'arrêt du tabac et le syndrome métabolique. Les études fondamentales animales utilisant le Rimonabant ont montré des résultats positifs dans la réduction de la faim, de l'apport calorique et du poids corporel ; et dans les études cliniques, le Rimonabant semble être efficace pour le traitement de l'obésité et le sevrage tabagique (153,154). Malheureusement, ce progrès scientifique était décevant vu que le blocage sélectif des CB1 a provoqué l'angoisse et la dépression au point de promouvoir des effets suicidaires chez des patients traités avec la molécule (155). D'ailleurs, plusieurs études précliniques et cliniques ont prouvé, par la suite, que l'altération des récepteurs CB1 est impliquée dans plusieurs troubles neuropsychiatriques, notamment : l'anxiété (156) et la dépression (157). D'où la nécessité de trouver plutôt un moyen pour inhiber la synthèse de AEA et 2-AG sans bloquer les récepteurs CB1, ou de le bloquer sélectivement dans les tissus périphériques.

b- L'Endocannabinoidome (eCBome)

L'eCBome représente une expansion de l'ECS. Il se compose de eCBs ainsi que d'autres médiateurs, récepteurs et enzymes (Figure 3).

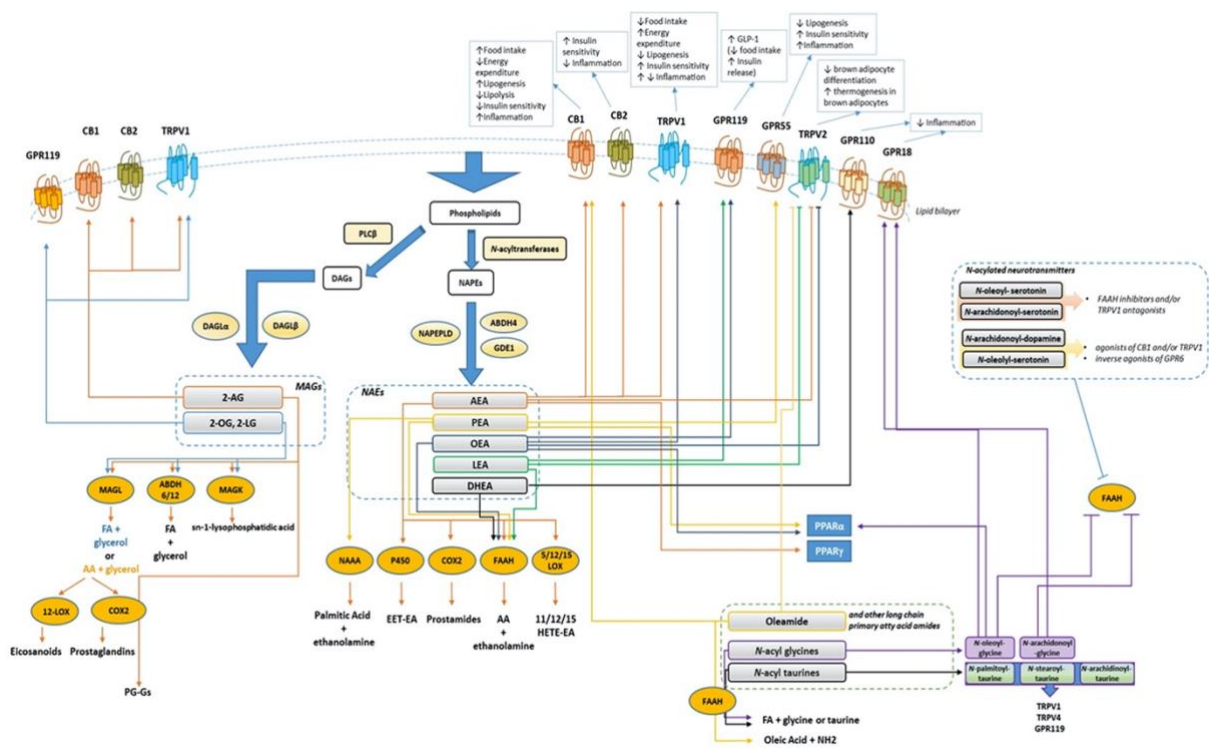


Figure 3 : L'Endocannabinome (eCBome) (Arturo Iannotti & Di Marzo 2021).

Certes, AEA (un N-acylethanolamine [NAE]) et le 2-AG (un 2-monoacylglycérol [2 -MAG]) sont les membres de l'eCBome les plus étudiés, mais d'autres N-acylethanolamines (NAEs) et 2-monoacylglycerols (2-MAGs) ont été identifiés, qui ont des fonctions biologiques différentes ainsi que des récepteurs différents de ceux d'AEA et 2-AG (158). Les eCBs sont une NAE et un-MAG (respectivement) contenant de l'AA (AA (AEA, 2-AG)), mais les autres molécules similaires contiennent d'autres acides gras, notamment l'acide oléique (OA (OEA, 2-OG)), l'acide palmitique (PA (PEA, 2-PG)), l'acide linoléique (LA (PEA, 2-PG)), l'acide stéarique (SA (SEA, 2-SG)), l'acide docosahexaénoïque (DHA (DHEA, 2-DHG)), l'acide eicosapentaénoïque (EPA (EPEA, 2-EPG)) et l'acide stéaridonique (SDA (SDEA, 2-SDG)). Ces molécules ne peuvent pas généralement activer les récepteurs cannabinoïdes, mais ciblent d'autres récepteurs comme les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), certains G-protein coupled receptors (GPCRs) et les transient receptor potential (TRP) channels sensibles à la température, comme le TRPV1,

TRPV2, TRPV4, TRPA1 et TRPM8. Cependant, les voies de synthèse et de dégradation et les enzymes de ces molécules sont communes à celles des eCBs (159,160).

b.1 Les récepteurs PPARs, GPCRs et TRPs :

Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs)

Les PPARs sont un groupe de récepteurs nucléaires dont trois formes sont actuellement identifiées : PPAR- α , PPAR - β/δ et PPAR- γ et qui sont codés par des gènes différents. Ces récepteurs contrôlent l'expression des gènes en agissant comme des facteurs de transcription régulés par des ligands. Les PPAR occupent un rôle physiologique important dans la fonction métabolique et l'homéostasie énergétique (161). Une multitude d'acides gras saturés et insaturés, tels que l'acide palmitique, l'acide linoléique, l'acide arachidonique, l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide eicosapentaénoïque ainsi que leurs dérivés tels que plusieurs molécules d'eCBome sont considérés comme des ligands naturels pour les PPAR (162,163). PPAR- α régule l'oxydation ainsi que le transport des acides gras et il est principalement exprimé dans le foie et le tissu adipeux brun (BAT), les reins, les muscles et le cœur. Pour l'expression de PPAR- β , elle est observée dans de nombreux tissus, mais son rôle n'est pas encore parfaitement défini. Concernant l'isoforme PPAR- γ , il est essentiellement exprimé dans le tissu adipeux blanc (WAT), où il est une composante indispensable du processus de différenciation des adipocytes et dans les macrophages en modulant la production des cytokines (164).

Récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs)

Les GPR18, GPR55 et GPR119, sont connus comme des membres de l'endocannabinoidome (165). GPR18 est localisé dans la moelle osseuse, le thymus, la rate, les poumons, le tissu cérébelleux et les cellules endométriales. Après son activation par ses agonistes la *N*-arachidonoyl glycine (NAGly) et le Δ^9 -THC, il stimule ainsi l'activité MAPK, augmente le calcium intracellulaire et la phosphorylation ERK1/2 intracellulaire et la phosphorylation de ERK1/2 (166). Le GPR55 peut aussi être activé par le Δ^9 -THC et certains cannabinoïdes synthétiques de faibles concentrations ainsi que par PEA, AEA, et 2-AG. Il est lié à différentes cascades de signalisation moléculaire, notamment la libération de Ca^{2+} et facteur

nucléaire des cellules T activées (167). Le récepteur GPR119 peut être activé par les médiateurs d'endocannabinoïdome qui comprennent l'OEA, le LEA et le 2-OG. Son activation joue un rôle important dans la sécrétion d'hormones métaboliques comme les incréтины suite à une prise alimentaire (168). Parmi les voies de signalisation médiées par le GPR119 se trouvent les canaux K⁺ sensibles à l'ATP et les canaux Ca²⁺ dépendants du voltage (169)

Transient receptor potential channel (TRPs)

Les TRPs est un groupe de protéines membranaires y compris TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 et TRPM8 qui ont été reconnus comme de récepteurs cannabinoïdes ionotropiques (170). Le récepteur TRPV1 semble le plus documenté ; il est activé par le vanilloïde capsaïcine (dont la « V »), la chaleur (>43 °C), un pH bas, le voltage, divers lipides (171) et les médiateurs eCBome (172). L'activation du TRPV1 active une série de voies de signalisation dans la cellule en autorisant le Ca²⁺ de passer du côté extracellulaire de la membrane au côté intracellulaire, augmentant ainsi le calcium intracellulaire (173). En effet son activation peut affecter l'homéostasie énergétique, soit dans le contrôle de l'apport alimentaire, soit dans la dépense énergétique, en contrôlant l'appétit et en produisant de la chaleur, respectivement (174).

b.2 Les NAEs non-endocannabinoïdes

Les seuils tissulaires des NAEs non endocannabinoïdes (SEA, OEA, PEA et LEA) sont habituellement de l'ordre de la picomole par gramme de tissu, et généralement dans l'ordre quantitatif suivant : SEA = PEA > OEA > LEA, sauf dans l'intestin grêle, où le LEA peut atteindre le niveau le plus élevé (175–177).

Dans les expérimentations animales, l'administration orale ou l'injection intrapéritonéale de ces NAEs a démontré différents effets, notamment l'inhibition de la prise alimentaire (OEA, PEA, LEA) (177–179), l'inhibition de la douleur (OEA, PEA) (180–182), l'inhibition de l'athérosclérose (OEA) (183), l'inhibition de l'inflammation (PEA) (184–189) ainsi que des effets anticonvulsifs (PEA) (190) et neuroprotecteurs (PEA, OEA) (191–195). Il n'est pas certain que l'OEA, la PEA et la LEA endogènes aient également tous les effets

susmentionnés, bien qu'il soit reconnu que ces lipides de signalisation augmentent en cas de lésion tissulaire et d'inflammation, potentiellement comme mécanisme de protection. (196,197).

Les NAEs des oméga -3, les DHEA et EPEA sont des ligands relativement peu efficaces des récepteurs CB2, et ils sont reconnus par leurs effets bénéfiques. La DHEA et l'EPEA entraînent une réduction de la libération des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que le contrôle de l'inflammation au cours d'une maladie ou à la suite de lésions tissulaires (198). Il a été démontré aussi que la DHEA et l'EPEA possèdent des propriétés antitumorales potentielles sur des lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate (199,200). De plus, la DHEA est importante pour le développement du cerveau et le maintien de son fonctionnement, et joue un rôle dans la neurogenèse et la neuroprotection médié par le récepteur GPR110 (201-204).

b.3 Les 2-MAGs non-endocannabinoïdes

Physiologiquement, les 2-MAGs sont normalement formés pendant la digestion des graisses alimentaires (205,206), l'hydrolyse des triacylglycerols (TAG) par la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipolyse des TAG stockés dans les tissus (207). Ces voies sont distinctes de la principale voie de biosynthèse du 2-AG, qui passe par les diacylglycérols dérivés du renouvellement des phosphoinositides (196). Récemment, des études ont montré que les 2-MAGs peuvent activer le GPR119 et la libération ainsi de l'hormone incrétine GLP-1 (205,208), et peuvent également servir de médiateur à la sécrétion d'insuline dans le pancréas. D'ailleurs, GPR119 est déjà une cible médicamenteuse pour le traitement potentiel du diabète de type 2 (205,209). Les 2-MAGs insaturés peuvent aussi activer le canal TRPV1. En conclusion, l'eCBome est un système de signalisation retrouvé chez plusieurs espèces animales, indiquant un rôle essentiel dans les fonctions vitales ; et il est impliqué dans divers aspects physiologiques et pathologiques de l'organisme d'où il peut être la cible de nombreux médicaments (210,211). Il contient également d'autres amides d'acides gras à longue chaîne, qui n'ont pas été discutés ici, car ils ne sont pas pertinents pour le présent travail de thèse. Il est important de noter que les médiateurs eCBome dérivés de l'acide arachidonique (c'est-à-dire les eCBs, AEA et 2-AG), en activant les récepteurs CB1, peuvent jouer un rôle bénéfique

dans le cerveau, mais ils contribuent aux troubles métaboliques dans les tissus périphériques. Cependant, les médiateurs eCBome dérivés d'autres acides gras (saturés, monoinsaturés et oméga-3) ont, au contraire, un rôle bénéfique dans la plupart des tissus et également dans le dysmétabolisme.

2) Le Microbiote intestinal

En préambule, il faut rappeler que le tractus intestinal humain est colonisé avec environ autant de cellules bactériennes que les cellules du corps humain et contient environ 150 fois plus de gènes microbiens que le génome humain. L'ensemble de ces bactéries constitue le microbiote intestinal. La majorité des bactéries constitutives de ce microbiote sont apparentées à quatre phyla : les Actinobactéries (avec des *genres* comme *Bifidobacterium* et *Colinsella*), les Bacteroidetes (avec des *genres* comme *Bacteroides* et *Prevotella*), les Firmicutes (avec des *genres* comme *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium* et *Ruminococcus*) et les Protéobactéries. (par exemple *Enterobacter* sp) (Figure 4) (212).

En conditions physiologiques, le microbiote intestinal coexiste dans une relation homéostatique avec l'hôte. Cette relation hôte-microbiote est maintenue de manière bidirectionnelle en particulier grâce au système immunitaire. Le microbiote intestinal bénéficie d'un environnement stable et de nutriments fournis dans le tractus intestinal, tandis que l'hôte tire profit des nombreuses fonctions exercées par le microbiote parmi lesquelles la production des acides gras à courte chaîne (AGCC) issus de la fermentation microbienne des composants non digestibles de l'hôte (en particulier, des fibres alimentaires) qui contribueraient à environ 10 % de nos besoins en énergie. Parmi les autres fonctions du microbiote, figurent notamment la production de vitamines K et B12 et la protection contre les pathogènes potentiels grâce à l'exclusion compétitive (213).

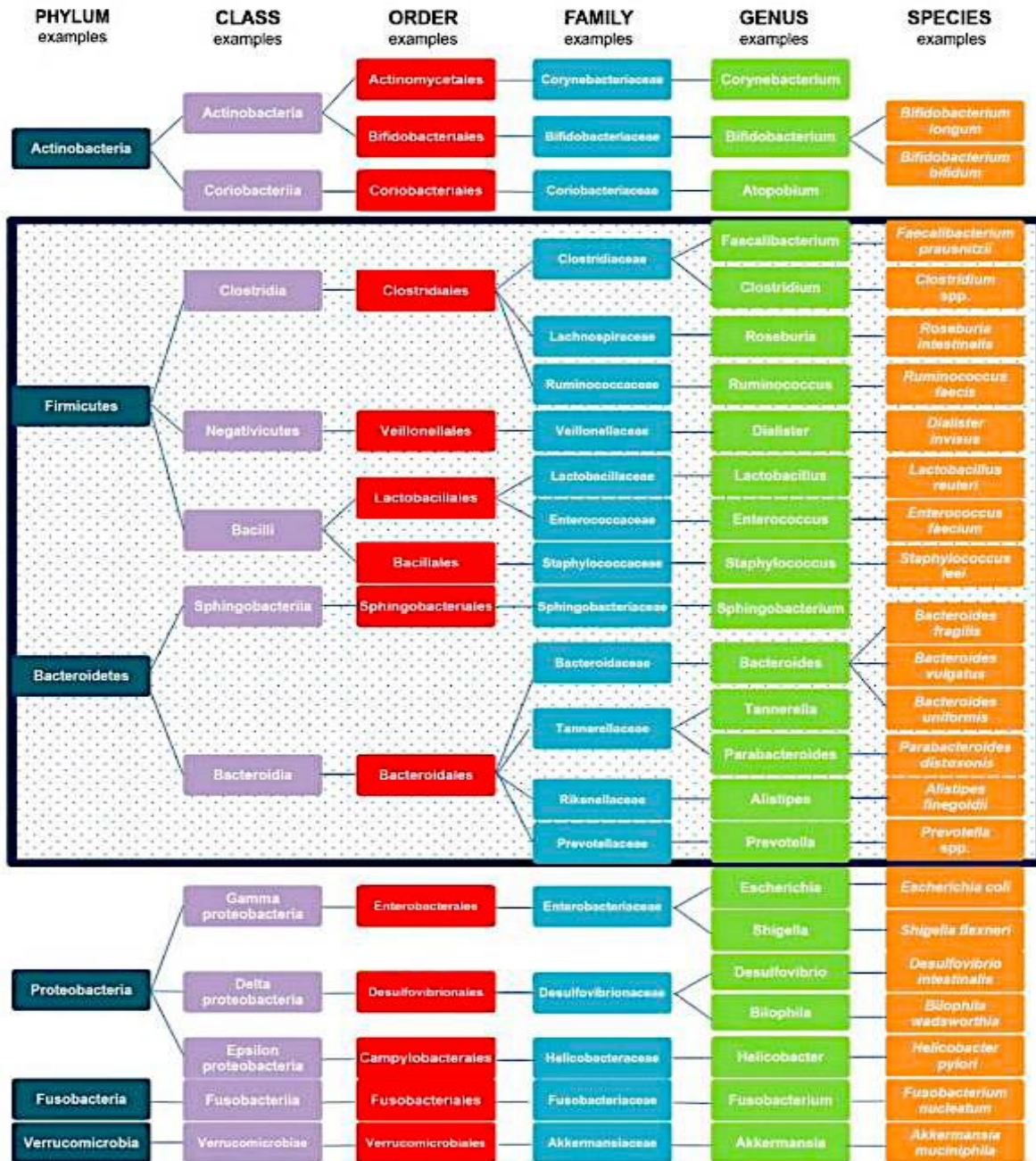


Figure 4 : classification du microbiote intestinal des mammifères (Rinninella et al., 2019).

La composition du microbiote change substantiellement à deux stades au début de la vie : de la naissance au sevrage et du sevrage à l'âge adulte en raison d'une plus grande diversification de l'alimentation.

Le génotype de l'hôte, l'âge gestationnel, les pratiques médicales (par exemple l'utilisation d'antibiotiques), le mode d'accouchement (césarienne vs accouchement vaginal), l'origine géographique, les traditions culturelles, en particulier en ce qui concerne l'alimentation, sont des facteurs qui influencent profondément le développement du microbiote (212).

Le microbiome est directement modulé par les changements de régime alimentaire (214), où le régime obésogène peut installer un état physiopathologique liée à la dysbiose et à une diminution de la diversité bactérienne. La dysbiose se manifeste par un déséquilibre entre les espèces protectrices et nuisibles, qui mène à une réduction des bénéfiques du microbiote intestinal voir même la provocation des maladies, particulièrement l'obésité et le syndrome métabolique (215–218). En fait, ce déséquilibre est connu d'avoir affecté majoritairement les deux phyla de Bacteroidetes et Firmicutes qui sont les bactéries dominantes dans l'intestin humain avec plus de 90 % d'abondance par rapport à la communauté totale (219). Le déséquilibre du ratio Bacteroidetes et Firmicutes avec une élévation de l'abondance des Firmicutes est supposé avoir un impact sur le fonctionnement physiologique notamment le métabolisme énergétique total de l'hôte comme l'obésité, le diabète de type 2 et l'athérosclérose (220). Dans les modèles murins, l'obésité induite par le régime alimentaire résulte en l'augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes en association avec une dégradation de la muqueuse de l'iléon, une endotoxémie et une diminution des niveaux d'*Akkermansia muciniphila* qui est généralement bénéfique (221). En guise de conclusion, un régime alimentaire déséquilibré est responsable de la modulation du microbiote intestinal qui à son tour peut modifier l'équilibre métabolique de l'hôte et constituer un facteur important dans le développement de certaines pathologies.

3) Les oméga-3 modulent l'eCBome

L'ECS diminue généralement la dépense énergétique et augmente le stockage d'énergie dans plusieurs organes par l'augmentation des niveaux d'AEA et/ou de 2-AG et l'activation des récepteurs CB1 (222). Cependant, l'ECS est maintenant considéré comme une partie d'un système de signalisation beaucoup plus vaste, l'eCBome, qui, avec ses plus de 100 médiateurs lipidiques et environ 13 cibles moléculaires (y compris les PPAR, les canaux TRP thermosensibles tels que TRPV1, et les GPCR orphelins tels que GPR119) est également profondément impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique, mais aussi de manière

opposée à la signalisation endocannabinoïde/CB1(223). Les médiateurs dont les précurseurs ultimes sont les AG oméga-3 comme l'eicosapentaénoylethanolamide (EPEA) et le docosahexaénoylethanolamide (DHEA) (224), et leurs cibles font également l'objet de recherches actives dans le cadre de l'inflammation (223). En fait, il existe une concurrence entre les précurseurs des acides gras oméga-6 et oméga-3 dans la production des médiateurs de l'eCBome correspondants, tels que les NAE et les 2-MAG, puisque tous les composants de ces deux familles de lipides partagent les mêmes enzymes anaboliques. Par conséquent, plus la consommation d'AG oméga-6 et de leurs précurseurs tels que les LA est élevée, plus ces AG seront estérifiés en phospholipides à partir desquels les NAE et les 2-MAG sont biosynthétisés, et il est de même pour les AG oméga-3 alimentaires et leurs précurseurs tels que les ALA (225) (Figure 5).

Autrement dit, un régime obésogène, riche en oméga-6 et pauvre en oméga-3, augmente les niveaux des médiateurs AEA et/ou de 2-AG (226–229). L'augmentation de ces médiateurs peut être aussi associée avec une augmentation de l'expression des enzymes anaboliques de l'AEA et du 2-AG (respectivement NAPE-PLD et DAGL) et d'une diminution des enzymes cataboliques de l'AEA et du 2-AG (respectivement FAAH et MAGL) (230–233) ainsi qu'une augmentation de la signalisation de CB1 (234). En fait, la suractivation du système endocannabinoïde par l'augmentation excessive des niveaux d'AEA et de 2-AG peut stimuler l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux et d'autres organes et réduire la dépense énergétique (235). De plus, cette suractivation est positivement corrélée avec l'Indice de masse corporelle (IMC), en particulier avec l'obésité abdominale (230,231,236). Cependant la supplémentation en AG oméga-3 à un régime riche en oméga-6 inverse ces changements (228) ; par exemple, l'administration d'huile de graines de lin riche en oméga-3 avec un régime à base de lard à de jeunes souris a permis de réduire de manière significative les niveaux d'AEA dans le foie et d'améliorer l'homéostasie du glucose (237).

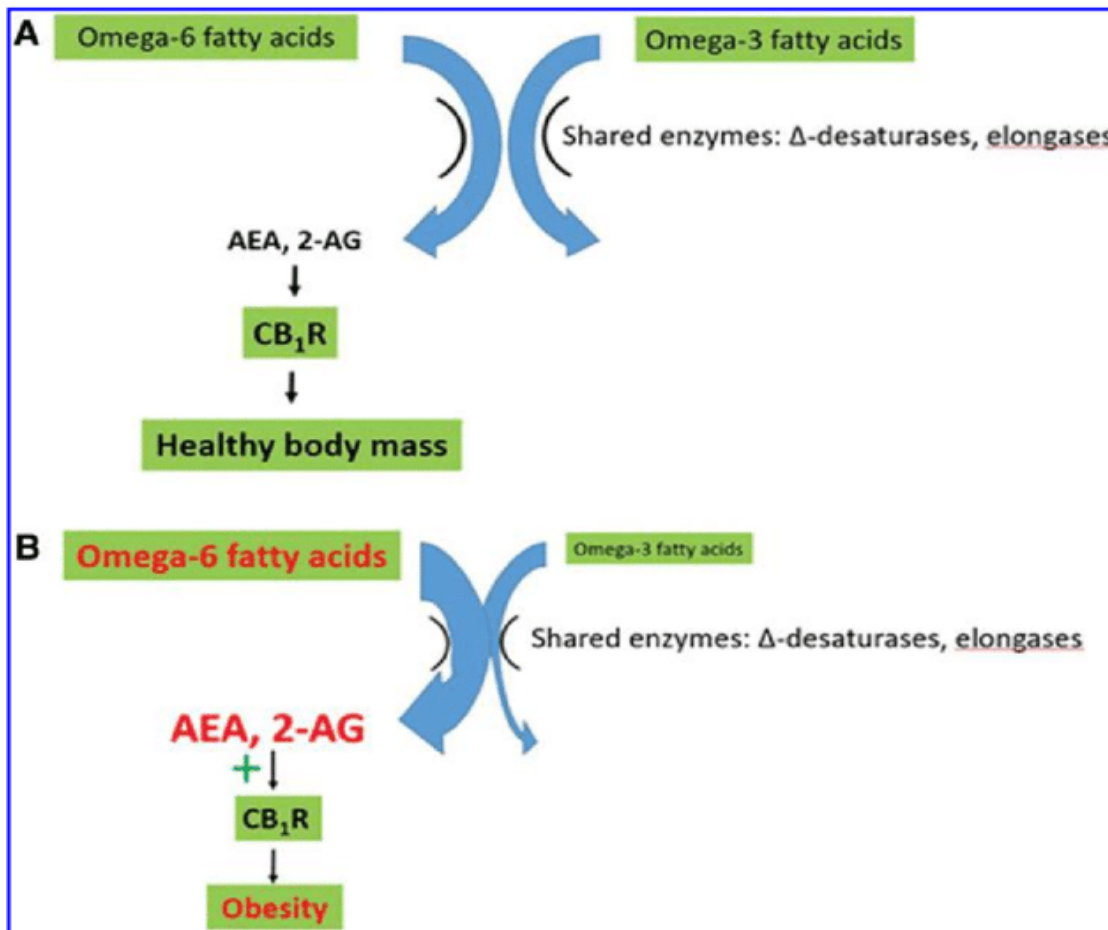


Figure 5 : La modulation théorique du système endocannabinoïde par les AGs oméga-6 et oméga-3 (Thomas Clark et al, 2018)

Comme mentionné ci-dessus, DHEA et EPEA sont les dérivés des acides gras oméga-3 DHA et EPA, et qui ont été identifiés comme médiateurs de l'eCBome (238). L'EPEA et la DHEA sont présents dans le cerveau à des concentrations environ deux fois supérieures à celles de l'AEA (239), mais leur affinité de liaison pour les récepteurs CB1 et CB2 est beaucoup plus faible (238,240). L'EPEA et la DHEA partagent les mêmes voies de production et de dégradation que l'AEA, ce qui entraîne une compétition entre l'EPEA, le DHEA et l'AEA ; cette compétition peut être affectée en modifiant le rapport alimentaire oméga-6/oméga-3, modulant ainsi la proportion d'éthanolamides dérivés des AG oméga-6 et oméga-3 (223,241,242). Il faut aussi noter qu'il y a la même compétition entre 2-EPG, 2-DHG et 2-AG par contre il n'y a pas de compétition entre les NAEs et les 2-MAGs, car ils ne partagent

pas les mêmes voies enzymatiques. De plus, l'exposition aux AG oméga-3 à un jeune âge peut diminuer les niveaux d'endocannabinoïdes dans les tissus et prévenir les troubles métaboliques induits par un régime alimentaire riche en graisses (243). De même l'huile de poisson et l'huile de crustacés riche en EPA et en DHA étaient toutes deux capables de diminuer les niveaux d'endocannabinoïdes tissulaires chez les rats obèses (244) et souris (245). Également, la supplémentation avec 2 g/jour d'huile de crustacés ou 4 g/jour de poudre de crustacés chez des sujets obèses a diminué de manière significative la circulation du 2-AG (246) et AEA (247) respectivement. Ces études nous ont amenés à proposer que les effets positifs des AG oméga-3 à longue chaîne sur la santé découlent, au moins en partie, de la modulation de l'endocannabinoidome, et en particulier de la réduction des concentrations tissulaires de l'AEA et du 2-AG (248,249).

4) Les Omega-3 modulent le microbiome

Comme l'Endocannabinoidome, le microbiome intestinal peut être modifié par les acides gras alimentaires. En fait, en modifiant le régime alimentaire par une supplémentation en AG oméga-3 provenant de l'huile de poisson et de l'huile de crustacés, la composition du microbiote intestinal peut être restaurée (250–252) à l'échelle des genres (253).

En réalité, les études fondamentales (254) ont montré que les souris nourries à l'huile de poisson présentaient une abondance relative accrue d'*Akkermansia muciniphila*, une bactérie Gram négative dégradant les mucines et inversement corrélée au surpoids, à l'obésité et au diabète, tant chez les souris (255) que chez les humains (256). En outre, l'étude de Pu S. et de ses collègues a montré que les taux sériques de lipopolysaccharide (LPS), qui est une endotoxine pro-inflammatoire sécrétée par les bactéries (257), étaient plus élevés chez les souris nourries au lard que chez celles nourries à l'huile de poisson, ce qui indique que des facteurs microbiens sont présents à la périphérie et qu'ils peuvent provoquer une inflammation du tissu adipeux blanc (258). En conclusion, les acides gras oméga-3 ont un rôle positif notable sur l'équilibre et le bon fonctionnement du microbiote. En effet, ces acides gras polyinsaturés favorisent le développement de bactéries avantageuses pour la flore intestinale, et en diminuant ainsi l'inflammation et améliorant le métabolisme du glucose.

5) L'interaction microbiome — endocannabinoidome

Récemment, une interaction bidirectionnelle entre le microbiome intestinal et l'endocannabinoidome a été mise en évidence avec pertinence pour la santé métabolique (259). Les modifications de l'eCBome dues à un régime obésogène, comme l'augmentation de l'expression de CB1 et du niveau de 2-AG, sont associées à un microbiome altéré (260,261). En outre, la perfusion chronique d'agonistes CB1 chez des souris augmente la perméabilité intestinale, tandis que le traitement de souris obèses par des antagonistes CB1 entraîne une réduction des taux plasmatiques de LPS et une diminution de la perméabilité intestinale (262). Autrement examiné, le blocage pharmacologique de l'activité des récepteurs CB1 chez des souris obèses soumises à un régime alimentaire a permis de réduire la perméabilité intestinale et les niveaux de circulation du LPS, tout en inhibant le développement de l'obésité (263).

De la même manière, les modifications du microbiome dans le cadre d'un régime obésogène augmentent la perméabilité de la barrière intestinale, ce qui accroît le niveau circulant de LPS qui module l'eCBome (264) ; alors que la réduction de l'endotoxémie métabolique (induite par LPS), en utilisant les prébiotiques, est corrélée à une diminution de l'expression de CB1 et des niveaux d'AEA dans le colon avec une augmentation de l'expression de l'enzyme FAAH (catabolisant d'AEA) (265). Autrement dit, la modification de la composition microbienne intestinale par l'utilisation de prébiotiques modifie les niveaux de récepteurs CB1 chez les souris obèses (262) (Figure 6).

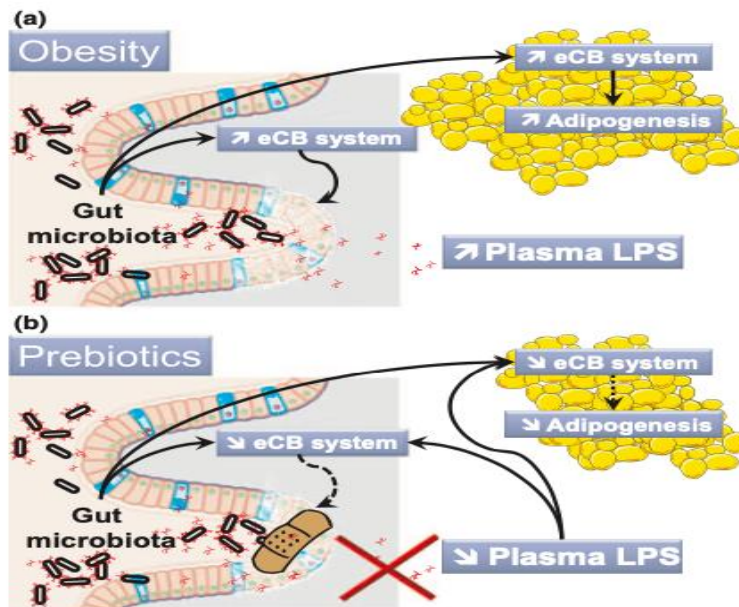


Figure 6 : Le microbiote intestinal module l'Endocannbinoidome (Cani PD, 2012)

De même, le transfert du microbiome fécal de souris donneuses conventionnelles à des souris sans germes a montré que les altérations de l'eCBome de l'iléon et du jéjunum pouvaient être inversées par réintroduction du microbiote intestinal (266). De plus, les souris traitées avec *A. muciniphila*, une espèce appartenant au genre *Akkermansia*, augmentent les niveaux de 2-MAG, y compris le 2-AG, le 2-OG et le 2-PG, dans la voie intestinale, ce qui confirme le lien entre le microbiote intestinal et l'eCBome (267). Ces données suggèrent que l'interaction entre le microbiome intestinal et l'eCBome est effectivement bidirectionnelle.

IV. Les limites de la consommation des oméga-3

1) L'industrie agroalimentaire

Le passage d'un mode de vie traditionnel à un mode de vie moderne a entraîné des changements concomitants dans tous les aspects de la vie, notamment l'introduction et la consommation croissante d'aliments produits en masse riche en oméga-6 (268). L'industrie moderne est non seulement basée sur l'huile végétale qui est la première source d'oméga-6, mais elle applique l'hydrogénation qui sert à solidifier les huiles. L'hydrogénation sélective partielle des huiles réduit la teneur en oméga-3 (acide α -linoléique [ALA]) tout en laissant une concentration élevée en oméga-6 (d'acide linoléique [LA]) (269,270). Le processus d'hydrogénation et en particulier la formation d'acides gras trans a un effet néfaste directe

sur la santé en favorisant la dyslipidémie et les troubles cardiométaboliques (99 100). L'OMS a mis en place plusieurs mesures pour combattre ce phénomène fatal (273), mais malgré tout, l'industrie continue à en produire pour des raisons financières.

2) Coût élevé et manque de disponibilité des produits marins

Les études écologiques montrent que les prix des produits de la mer révèlent l'impact d'une perturbation écologique majeure qui entraîne une diminution de la quantité de produits de la mer et une augmentation de leur prix (274). Cela explique la préoccupation quant à la capacité de l'industrie des produits de la mer à répondre à une demande accrue en suivant les recommandations diététiques visant à augmenter la consommation de produits de la mer (275,276). Les préoccupations générales concernant la pression exercée sur les stocks limités de poissons sauvages (275,277,278) et les impacts de l'aquaculture (279) de façon que la consommation de fruits de mer en général semble non durable et qu'il faudrait rechercher d'autres sources d'acides gras oméga -3 (276).

3) Développement des allergies contre les produits marins

Les allergies aux produits de la mer ont augmenté leur présence au cours des deux dernières décennies. Le poisson et les crustacés peuvent provoquer de graves réactions indésirables médiées par les anticorps de l'immunoglobuline E (IgE) chez les personnes sensibles. Les manifestations cliniques les plus fréquentes de l'allergie aux fruits de mer sont les symptômes gastro-intestinaux, le syndrome d'allergie orale, l'urticaire, œdème et la forme la plus extrême de réaction, qui est l'anaphylaxie potentiellement mortelle (280). En outre, l'allergie aux fruits de mer est une cause courante d'anaphylaxie d'origine alimentaire dans certaines parties de l'Europe (281,282), aux États-Unis et au Canada (283,284), et en particulier en Australie (285) et dans les pays d'Asie du Sud-Est (286,287). En général, il est conseillé aux patients allergiques aux poissons et aux crustacés d'éviter d'en consommer ce qui crée en contrepartie des carences en oméga-3.

4) Véganisme

En parallèle, la consommation des oméga-3 a diminué considérablement avec le véganisme qui est une forme stricte de végétarisme. Les véganes ne consomment aucun aliment dérivé entièrement ou partiellement d'animaux ; avec un mode de vie qui exclut l'exploitation animale pour tout intérêt : vêtements, chaussures, cosmétiques... (288). Ce régime

alimentaire crée un risque de carence alimentaire, notamment la carence en iode qui est considérée comme l'un des plus grands problèmes de santé publique du 20^e siècle et qui se manifeste par l'hypothyroïdie accompagnée par un retard de croissance et de développement (289). Certes que la supplémentation du sel de la table en iode peut corriger cette carence, mais la carence en oméga -3 semble non traitable. De ce fait, il est important d'augmenter les apports alimentaires en acides gras oméga-3 en consommant un « super aliment » riche en oméga-3, disponible, peu coûteux et consommable même par les végétariens et les personnes souffrant d'allergies aux fruits de mer.

V. Les graines de chanvre une source alternative de qualité des oméga-3

1) Les graines de chanvre

Le chanvre (*cannabis sativa*) est une ancienne culture asiatique qui est cultivée depuis environ 10 000 ans. (290). Le *Cannabis sativa* peut être classé principalement en deux phénotypes : le type drogue (marijuana) et le type non-drogue (chanvre). Au cours des 20 dernières années, l'Australie, le Canada et plus récemment les États-Unis ont légalisé la culture de graines de chanvre à faible teneur en 9-tétrahydrocannabinol (THC) (<0,3 %) (291).

2) La composition nutritionnelle riche des graines de chanvre ainsi que leur effet sur la santé métabolique

Les graines de chanvre représentent une culture potentiellement importante pour les populations nordiques et, en particulier, les personnes ayant un faible taux de consommation d'acides gras oméga-3 et de fibres pourraient tirer des bénéfices sains de cette source alimentaire. Les graines de chanvre entières sont très riches en acides gras essentiels (AGE) et autres acides gras polyinsaturés (AGPI) (292,293).

En se basant sur les études d'intervention chez l'humain, il semble qu'une supplémentation quotidienne de 30 ml d'huile de chanvre soit capable de produire des effets cardiométaboliques favorables (294), ce qui peut être dû en partie à ses niveaux élevés d'acide gras oméga-3, l'ALA, que l'on considère comme idéal pour un régime alimentaire sain et représentatif des régimes humains paléolithiques (295). Il est également intéressant de noter que les graines de chanvre sont aussi une source riche d'acide stéaridonique (SDA), qui est formé en bas du métabolisme de l'ALA par la Δ 6-desaturase, contournant ainsi cette

étape limitante et permettant la conversion du SDA en EPA. D'ailleurs cette conversion pourrait expliquer pourquoi le SDA a une plus grande activité anti-inflammatoire que l'ALA (296). Les graines de chanvre contiennent des protéines de haute qualité (297), et elles sont réputées pour leur digestibilité et leur richesse en neuf acides aminés essentiels qui doivent être intégrés par l'humain : l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine (293). Les graines de chanvre sont également riches en polyphénols. La capacité anti-oxidative de ces composés est mise en évidence par plusieurs études (298–300). En fait, les phénols et les polyphénols, dont la production est strictement liée aux mécanismes de défense des plantes, ont fait l'objet d'une grande attention en raison de leur utilisation potentielle comme agents prophylactiques et thérapeutiques dans de nombreuses maladies (301). Finalement, les graines de chanvre alimentaires peuvent être en mesure de modifier le microbiome intestinal ainsi que l'eCBome en raison de leurs niveaux élevés d'oméga-3 ALA et SDA. De plus, étant donné les effets positifs sur la santé des fibres alimentaires associées à des changements dans le microbiome intestinal, les niveaux élevés de fibres dans les graines de chanvre entières peuvent également contribuer à une modulation positive du microbiome intestinal.

VI. Problématique, objectif et hypothèse de recherche

1) Problématique

La supplémentation en graines de chanvre limite-t-elle le développement de l'obésité et les désordres métaboliques associés à une diète riche en graisse et en glucides, en modulant l'axe endocannabinoïdome-microbiome ?

2) Objectif

Notre objectif est d'étudier les effets des graines de chanvre entières sur le développement de l'obésité, de la résistance à l'insuline et de divers paramètres métaboliques dans un modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisses et en glucides, et de corrélérer ces changements aux modifications de l'eCBome et du microbiote intestinal.

3) Hypothèse

Nous supposons que les graines de chanvre amélioreront l'adiposité, les niveaux de glucose, d'acides gras, d'adipokines circulants et la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses en corrélation avec des niveaux circulants et tissulaires normalisés de médiateurs lipidiques de

l'écobome ainsi que des changements drastiques dans la composition du microbiote intestinal.

Chapitre 1 The nutritional and Cannabinoid composition of Finola and X59 hemp seeds

Résumé

Contexte : Le chanvre est une ancienne culture asiatique qui est cultivée et exploitée depuis environ 10 000 ans, cependant, la qualité nutritionnelle de ses graines a récemment commencé à attirer l'attention des chercheurs scientifiques ainsi que des consommateurs. Les graines de chanvre sont aujourd'hui considérées comme l'une des sources alimentaires les plus complètes en raison de ses caractéristiques nutritionnelles élevées. Au Canada, environ 51 variétés sont approuvées pour la culture, mais le contenu nutritionnel de la majorité d'entre elles reste peu connu. **Objectifs** : Le but était d'étudier la composition nutritionnelle et cannabinoïde des deux variétés de chanvre cultivées en Alberta Canada : Finola et X59. **Méthodes** : Les analyses étaient réalisées par la compagnie AGAT pour doser la composition en macro- et micronutriments. **Résultats** : Les résultats de cette étude montrent qu'aucune des deux graines n'avait des niveaux détectables de cannabinoïdes . De plus, les graines Finola et X59 ont une composition similaire en macro et micronutriments, cependant, les graines Finola ont plus d'acides gras oméga-3 qui sont les composants clés de notre projet in vivo.

Abstract

Background: Hemp is an ancient Asian crop that has been cultivated and exploited for about 10,000 years, however, the nutritional quality of its seeds has recently begun to attract the attention of scientific researchers as well as consumers. Hemp seeds are now considered one of the most complete food sources because of its high nutritional characteristics. In Canada, about 51 varieties are approved for cultivation, but the nutritional content of many of them remains poorly known. **Objectives:** The aim was to study the nutritional and cannabinoid composition of two hemp varieties grown in Alberta Canada: Finola and X59. **Methods:** The analyses were carried out by AGAT to determine the composition of macro- and micronutrients. **Results:** The results of this study showed that neither seed had detectable levels of cannabinoids. In addition, the Finola and X59 seeds have a similar macro and micronutrient composition, however, Finola seeds have more omega-3 fatty acids, which are the key components of our *in vivo* project presented in chapter 2.

I. Introduction

Hemp (*cannabis sativa*) is an ancient Asian crop that has been cultivated and exploited for about 10,000 years (302). Hemp varieties are classified into two groups: industrial and drug varieties, generally based on the levels of the psychoactive cannabinoid tetrahydrocannabinol (THC) and the non-psychoactive cannabinoid cannabidiol (CBD), that are high variability among hemp varieties (303,304). In the last 20 years, hemp was cultivated not only in Asian countries, but also in America, Europe and Africa, with Canada being the first western country to legalize this crop with low THC content (<0.3%) (305), followed by Europe and the United States (306). On a global scale, the majority of hemp cultivation remains in China, which produces half of the hemp fiber on the market (307). Canada is also an important competitor in the production of industrial hemp in the global market. In 2011, Canada issued 340 cultivation licenses to farmers who grew more than 39,000 acres of industrial hemp (308,309), while in 2018 the amount grown has increased significantly with more than 77,000 acres used for hemp production (310).

Hemp cultivation is sustainable, has low environmental impact and is versatile, being useful in several application areas such as food and feed, cosmetics, construction as well as producing pharmaceutically relevant compounds (311). Traditionally, hemp has been grown primarily as a fiber crop for textile production as well as animal feed (306). However, hemp seeds are also known for their medicinal benefits. They were used to treat functional constipation in traditional Chinese medicine (312).

Recently, the nutritional window of these seeds is attracting more and more attention from scientific researchers as well as from consumers, and they are often labelled as a “superfood” thanks to their qualitative and quantitative richness in macro and micronutrients (313). Hemp seed is often considered one of the most nutritionally complete food sources due to its high nutritional characteristics. Hemp generally contains 25-35% lipids with a unique and well-balanced composition of fatty acids (FA), 20-25% easily digestible proteins rich in essential amino acids and 20-30% carbohydrates, a large part of which consists of dietary fiber, mainly insoluble; as well as vitamins and minerals (306). The fatty acid composition of hemp seeds appears to be very attractive with high levels of alpha-linolenic acid (ALA), an omega-3 fatty acid, in a ratio of approximately 3:1 (omega 6: omega 3) which is considered ideal for a

healthy diet and representative of paleolithic human diets (314,315). Moreover, the oil content of hemp seeds contributes to their health benefits. Clinical studies show that a daily supplementation of 30 ml of hemp oil per day is able to produce positive cardiometabolic effects by measuring total cholesterol:HDL cholesterol ratio (316). In addition, hemp oil supplementation improves the phospholipid composition of red blood cells as measured by the omega-3 index, which is correlated with good health (317). Thus, hemp seeds represent a potentially important food crop for populations and, in particular, individuals with low omega-3 fatty acid and fiber intake may derive health benefits from hemp seed consumption. Nevertheless, the choice of these seeds seems unclear in view of the many varieties that exist. In the literature, several studies show that the nutritional composition of hemp seeds differs from one country to another (318,319), or even between samples from the same country (320–322). For example, in Turkey, a study of twenty-one different hemp samples obtained from seven provinces showed that the oil contents of the hemp seed samples were different, ranging from 29.61 to 36.47%, with an average of 32.13% where the highest oil content was measured in the samples received from the city of Gümüş, hacıköy, which is characterized by a cold winter and a hot summer (323).

In Canada, about 51 varieties are approved for cultivation (324), but the nutritional content of the majority remains poorly understood.

In this article, we report on the nutritional composition whole seeds of the two hemp varieties: Finola and X59, which were grown in Alberta, Canada. We also measured on their content of several cannabinoids.

Problematic

Which variety has the best nutritional composition in omega-3 fatty acids: Finola or X59?
Do they have traces of cannabinoids: THC or CBD?

Objective

To evaluate the nutritional and cannabinoid composition of Finola and X59 hemp seeds in order to choose the best variety in omega-3 fatty acids composition for our *in vivo* project.

Hypothesis

Both varieties will have an important nutritional composition with slight differences.

II. Methods

Cannabinoids

One gram of hemp seeds was ground with homogenizer beads on a vortex in acetonitrile containing 1% acetic acid for 10 minutes. The sample was extracted twice, and the supernatants resulting from centrifugation were combined. The extract was diluted, and cannabinoid content was measured using UHPLC (Agilent 1290) UV-MS (Agilent 6470). Multiple reaction monitoring transitions were also acquired to positively identify the cannabinoids.

Total Fat and Fatty Acid Profile

Hemp seeds were hydrolyzed with concentrated hydrochloric acid and the fat extracted with ethyl ether and petroleum ether (1:1). The organic phase was decanted into a beaker, the solvent evaporated, and the fat weighed. The fatty acids were produced by the hydrolysis of the ester bonds of triglycerides in a 100 °C water bath and evaporated dry. To prevent degradation of the fatty acids, during the analysis pyrogallic acid was added at the beginning of the analysis. After hydrolysis, the fatty acids were extracted into ether and a methylation reaction with boron trifluoride (BF₃) in methanol was used to convert the fatty acids into methyl esters (FAME). Using a GC-FID, the methyl esters of the FAME fatty acids were determined and calculated individually in relation to the total amount of FAME found and the percentage of fat in each sample.

Cholesterol Profile

Lipids were extracted as above and saponified at 40 °C temperature with an ethanolic KOH solution. The un-saponifiable fraction containing cholesterol and other sterols was extracted with benzene. Sterols are derivatised with trimethylchlorosilane (TMCS) and

hexamethyldisilazane (HMDS) to methyl esters and quantitatively determined by gas chromatography.

Proteins

Hemp seeds were digested in concentrated H₂SO₄ to convert the protein nitrogen to (NH₄)₂SO₄ at boiling point in the presence of catalysts (K₂SO₄ and CuSO₄) in an aluminum block digester. Water was added to prevent solidification and to avoid direct mixing with the subsequent addition of a strong base to neutralize the acid and alkalize the digest. NH₃ was released by distillation and captured in boric acid in the presence of a colour indicator. The distillate was titrated with a volumetric solution of 0.1 N HCl to the turning point. The amount of protein was calculated by multiplying the calculated N% by 6.25 as a general conversion factor.

Sugars

The concentration of glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose and lactose was determined with a liquid chromatographic system (Agilent 1100 HPLC) with a equipped with a refractive index detector (RID) and a refractometer and Polaris 3 NH₂ column. Prior to sample analysis, Carrez clarification and filtration were performed. The concentration of the samples was determined by interpolation using the area of the samples and a calibration curve.

Fiber

Samples were hydrolyzed with amylase at 100 °C for 15 minutes, then with protease and amilogucosidase at 60 °C in a shaking water bath for 30 min using a total dietary fibre assay kit (Sigma). After hydrolysis, four volumes of 95% alcohol were added to precipitate the soluble fibres. The residue obtained after filtration is washed with 78% alcohol and acetone, dried at 100 °C and weighed. Duplicate residues are analyzed to calculate the percentage of protein and ash at 525 °C. Total dietary fibre = average weight of residue at 100 °C - weight (protein + ash) - blank.

Calories and Carbohydrates

Carbohydrates were determined by the difference between the total (100%) and the sum of the remaining major components (moisture, protein, fat and ash). Total carbohydrates calculated using this method include sugars, starch, dietary fibre, polyalcohols, glycerol and polydextrose. From the main constituents and the specific energy factors for each group, the caloric and energy value of a food product was calculated, using the Atwater system (325).

Ash and Moisture Content

The sample was burnt at 550 °C in a pyrolysis oven overnight (12-16 hours). The sample was weighed before and after incineration to calculate the ash value. Moisture was calculated using the gravimetric method by calculating the weight before and after evaporation of water in a desiccator at room temperature.

Calcium, Iron, Potassium, Sodium

Samples were reduced to ash (see above) in order to decompose the organic matter. The resulting inorganic residue was digested with a 3:1 mixture of concentrated HNO₃ and HCl and subsequently analyzed by for the determination of metals inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP- OES; Perkin Elmer ICP-OES 5300).

III. Results and Discussion

Cannabinoid Profile:

In this study we carried out a detailed analysis of the cannabinoid content and nutrient composition of Finola and X59 hemp seeds. These two grain-type hemp varieties of *cannabis sativa* initially developed in Finland and Russia respectively (326,327) and are characterized by having a shorter stature, greater seed production and very low levels of psychoactive (-)-delta-9-*trans*-tetrahydrocannabinol (THC), but may still produce significant levels of over 100 other phytocannabinoids with distinct pharmacological activities (328). Seeds are not a site of phytocannabinoid production, which occurs in other parts of the plant (especially flowers) that harbour secretory epidermal glands (trichomes), however, they may become contaminated with sticky, cannabinoid-rich resin (328). Excessive consumption of THC can

cause acute toxic symptoms like gastrointestinal disorders, psychological effects and sedation (329). As a consequence, several countries regulate the permitted THC levels in hemp seeds and hemp seeds products (329–333).

In Canada, only the hemp seeds that contain 10 µg/g THC or less are allowed to be imported, exported and sold (<https://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2018-145/page-1.html#h-839641>). A recent assessment (334) of 10 organic hemp seeds oils using UHPLC-HRMS/MS found low, but detectable levels of several phytocannabinoids, including not only the normally abundantly produced THC and CBD, but also other minor phytocannabinoids, with the acid forms of THC and CBD (THCA and CBDA, respectively) generally being the most prevalent.

We therefore measured the levels of several phytocannabinoids, including THC, CBD and their acid forms within the Finola and X59 hemp seeds (table 3). As expected, for these non-drug type varieties, the levels of THC were below the detection limit (<0.001%). Finola and X59 are generally considered to produce relatively high levels of CBD, and Finola has recently been shown to produce many other phytocannabinoids (335). Despite this all of the phytocannabinoids assessed were below our detection limits, suggesting that, even though we assessed whole hemp seeds with their pericaps, when these varieties are grown for seed production and harvested accordingly, there is insignificant contamination of the seeds with phytocannabinoids.

Table 3: Phytocannabinoid profile

	Unit	RDL	X59	Finola
Delta 9 THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol)	%	0.001	<0.001	<0.001
Delta 8 THC (Delta-8-Tetrahydrocannabinol)	%	0.001	<0.001	<0.001
THCA (Delta-9-Tetrahydrocannabinolic Acid)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBD (Cannabidiol)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBDA (Cannabidiolic Acid)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBN (Cannabinol)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBG (Cannabigerol)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBGA (Cannabigerolic Acid)	%	0.001	<0.001	<0.001
CBC (Cannabichromene)	%	0.001	<0.001	<0.001
THCV (Tetrahydrocannabivarin)	%	0.001	<0.001	<0.001
Total THC	%	0.001	<0.001	<0.001
Total CBD	%	0.001	<0.001	<0.001

RDL - Reported Detection Limit

Food Chemistry:

We also evaluated the macro- and micronutrient content of the two hemp seed varieties (Table 4). Hemp oil represents the most important component of these seeds, especially from a nutritional and industrial point of view, however, other components of the seeds also have significant nutritional value.

Several studies have shown that the oil content of hemp seeds varies from 25 to 35% (336–341) where this variation is mainly due to the genotype (311,337). In addition, many

researchers have also observed that environmental conditions such as geography, climate and local agronomic factors have an effect on the total oil content (342,343). Hemp oil is characterized by a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and a low amount of saturated fatty acids (SFA) (315,344). More specifically, hemp oil contains up to 90% unsaturated fatty acids, 70% to more than 80% of which are composed of PUFAs (14).

Hemp oil represents a particularly rich source of Essential Fatty Acids (EFAs), including linoleic acid (LA) an omega-6 and alpha-linolenic acid (ALA) an omega-3, as they cannot be synthesized by mammals and must therefore be acquired through diet for the maintenance of a healthy human life. According to the European Food Safety Authority (EFSA), the ratio of omega-6 to omega-3 must be strictly less than 5 (345). In addition, hemp seeds have high levels of omega-3 ALA which are proposed as ideal for a healthy diet and representative of paleolithic human diets (346). Several studies have found that Finola is the hemp variety with the highest ALA content compared to other varieties (311,336,337) and can reach 22% (340). Hemp seeds also contain monounsaturated fatty acids (MUFA), the main one being oleic acid (OA), an omega-9, which can reach 18.78% of total fatty acids (338). In general, the amount of OA in hemp oil is comparable to that present in flax seed (15%) (347) and higher than that found in chia seed (7%) (348).

Our food chemistry analyses show that the oil content in our samples was 31.5g/100g for Finola and 29.1g/100g for X59. Finola and X59 seeds are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with Finola having a higher content (24.6g/100g) of PUFAs than X59 (21.9g/100g). These values are in agreement with other studies (336) for Finola seeds to the best of our knowledge, this is the first quantification of the oil content of the X59 variety of hemp seeds.

The differences in fatty acid content between the hemp seed varieties did not have a strong effect on the omega-6, omega-3 ratio (Table 5), but it was lower in Finola seeds (3.23) than in X59 seeds (4.24), mostly due to the fact that Finola hemp seeds have 25% more total omega 3 fatty acid than X59. However, X59 seeds have more omega-9 oleic acid (3.42g/100g) than Finola seeds (2.94g/100g). The current study shows that the PUFA content of these varieties is similar, with Finola having higher levels of omega-3 fatty acids, suggesting that this variety of hemp can be useful to contribute to a healthy diet thanks to the high amount of ALA that decreases the mortality due to coronary diseases (349).

Table 4: Food Chemistry

Parameter	Unit	RDL	X59	Finola
Moisture content	g/100g	0.10	3.83	3.72
Fat by Acid Hydrolysis	g/100g	0.25	29.1	31.5
Protein	g/100g	0.10	26.5	29.9
Ash	g/100g	0.10	4.90	5.13
Carbohydrates	g/100g	0.5	35.7	29.8
Calories	kcal/100g	2	511	522
Saturated Fatty Acids	g/100g	0.10	2.43	2.45
Mono-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	3.42	2.94
Poly-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	21.9	24.6
Trans Mono-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
Trans Poly-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
Cholesterol	mg/100g	1	<1	<1
Calcium (Food)	mg/100g	5	106	107
Iron (Food)	mg/100g	0.10	9.58	11.3
Sodium (Food)	mg/100g	3	<3	<3
Potassium (Food)	mg/100g	9	712	776
Sugars	g/100g	0.10	1.36	1.12

RDL - Reported Detection Limit

Table 5: Detailed Fatty Acid Profile (g/100g of whole hemp seeds) of X59 and Finola

Parameter	Unit	RDL	X59	Finola
C4:0 Butyric Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C6:0 Caproic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C8:0 Caprylic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C10:0 Capric Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C11:0 Undecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C12:0 Lauric Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C13:0 Tridecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C14:0 Myristic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C14:1 Myristoleic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C15:0 Pentadecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C15:1 cis-10 Pentadecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C16:0 Palmitic Acid	g/100g	0.10	1.70	1.70
C16:1 Palmitoleic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C17:0 Heptadecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C17:1 cis-10 Heptadecanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C18:0 Stearic Acid	g/100g	0.10	0.72	0.75
C18:1n9c Oleic Acid	g/100g	0.10	3.42	2.94
C18:1n9t Elaidic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C18:2n6c Linoleic Acid	g/100g	0.10	16.5	17.9
C18:2n6t Linolelaidic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C18:3n3c Linolenic Acid	g/100g	0.10	3.89	5.53
C18:3n6c gamma-Linolenic Acid	g/100g	0.10	1.43	1.17

Continued on next page

Table5: Detailed Fatty Acid Profile (g/100g of whole hemp seeds) of X59 and Finola (continued)

C20:0 Arachidic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20:1n9c Eicosenoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20:2 cis-11,14 Eicosadienoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20 :3n3 cis-11,14,17 Eicosatrienoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20 :3n6c cis-8,11,14 Eicosatrienoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20:4n6c Arachidonic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C20 :5n3c cis-5,8,11,14,17 Eicosapentanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C21:0 Heneicosanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C22 6n3c cis-4,7,10,13,16,19 Docosahexanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C22:0 Behenic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C22:1n9c Erucic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C22:2 cis-13,16 Docosadienoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C23:0 Tricosanoic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C24 1n9c Nervonic Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10
C24:0 Lignoceric Acid	g/100g	0.10	<0.10	<0.10

RDL - Reported Detection Limit

With respect to protein content, hemp seeds are also rich in protein and contain almost as much high-quality protein as soybeans. Recent proteomic characterization of hemp seeds has highlighted the fact that hemp seeds are underutilized non-leguminous protein-rich seeds with desirable nutritional characteristics (350). Hemp seeds protein is well known for its

digestibility and richness in nine essential amino acids required by humans (344). Among the amino acids, arginine is found at surprisingly high levels. This primary metabolite, as a precursor to nitric oxide (NO) production, acts as a pivotal signalling messenger in the cardiovascular system by participating in the control of hemostasis, fibrinolysis, platelet and leukocyte interactions with the arterial wall, regulation of vascular tone, vascular smooth muscle cell proliferation, and blood pressure homeostasis (351). The protein content of whole hemp seed ranges from 20% to 25% and may further increase in some processed hemp products (339,341,352). Overall, hemp seed is considered as a high protein source containing a higher amount of protein than other protein-rich products such as flax seed (20.9%) (353), chia seed (18.2-19.7%) (354) and quinoa (13.0%) (353). Our analysis shows that Finola seeds contain more proteins (29.9 g/100 g) than X59 seeds (26.5 g/100 g).

The total carbohydrate content of hemp seed may be between 20 and 30%, of which the major part is fiber with 27.6 g/100 g total dietary fiber (TDF) (Typical nutritional content of hemp seeds) (340). Insoluble dietary fiber (IDF) is the most abundant with a value of 25.49 g/100 g while soluble dietary fiber (SDF) is 0.16 g/100 g (355). Therefore, hemp seed is one of the richest sources of IDF among several crops such as green pea (8.69 g/100 g), and bean (9.39 g/100 g) (355). Our results show that Finola seeds have 29.8 g of carbohydrates per 100g of and X59 have 35.7 g/100g, with 1.12g of sugar per 100g in Finola seeds and 1.36g/100g in X59 seeds, thus the TDF for Finola was calculated at 28.7 g/100g and 34.3g/100g TDF for X59.

The total mineral content of a food is indicated by the amount of ash in the sample. Minerals are considered micronutrients because their dietary requirements are relatively low; nevertheless, they are necessary with their essential physiological and structural roles to maintain optimal health. Again, hemp seeds represent a good source of minerals (4.9-6/100 g) (319,338-340) considering also other seeds like chia seeds (4.56-5.07 g/100 g) (354) and flax seeds (3.5 g/100 g) (356). Iron (Fe) is of particular importance because of its essential role in human health and because of its widespread dietary deficiency due to the changes in our diet caused by modern life. The Fe content of hemp seeds is exceptionally high compared to that of cereals (338), for this reason, hemp seeds could be used to enrich cereal-based food products, thus ameliorating iron deficiency. Our results showed that Finola seeds contain

more minerals, with 5.13 g/100g of ash, than X59 seeds with 4.90 g/100g. Moreover the analysis also shows that both varieties of hemp seeds are rich in iron, which is known to be the weak point of vegetables since most of them have traces of it, while 100g of Finola seeds providing almost the entire recommended daily intake of iron (8 mg for male and 18 mg for female aged between 19-50 years old (357)) as it they contain 11.3 mg/100g of seeds, while X59 provides 9.58 mg/100g, but the bioavailability of hemp seed iron still needs to be improved by vitamin C (358). It should also be mentioned that both varieties have a significant content of calcium with 106 mg/100g for X59 and 107 mg/100g for Finola knowing that recommended daily intake is 1000mg/day in men and women aged between 19-50 years since it is needed for vascular contraction and vasodilation, muscle function, nerve transmission, intracellular signaling and hormonal secretion (359).

IV. Conclusion

All varieties of hemp seeds are rich in macro and micronutrients in ideal and well-balanced proportions, so much so that they are often referred to as a "Superfood". However, these proportions vary considerably from one variety to another. Therefore, we must choose the right variety to use as needed, based on its nutritional composition, which increases the need to further explore the composition of the rest of the vast list of varieties so that we can do a better choice. Finola seeds seem to be more important from a nutritional point of view, thus we have chosen them for the rest of our study which is "Hemp seeds supplementation to mice under a high fat high sucrose diet produces a different pattern of beneficial metabolic effects as compared to linseed, with a stronger reduction of adipose tissue inflammatory profile: role of the endocannabinoidome".

Acknowledgement: special thanks to Nature's Decision company that provided us with the different seeds and AGAT laboratory that made the analysis.

Chapitre 2 Hemp seeds supplementation in mice under a high fat high sucrose diet produces a slightly different pattern of beneficial metabolic effects as compared to Lin seeds, with a stronger reduction of adipose tissue inflammatory profile: role of the endocannabinoidome

Résumé

Contexte : Plusieurs preuves soutiennent les avantages d'un régime riche en acides gras oméga-3 pour la santé cardiométabolique. Ces acides gras peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en modulant le système endocannabinoïde ainsi que le microbiome intestinal, qui sont tous les deux des régulateurs clés de plusieurs aspects de la santé cardiométabolique et de l'obésité. D'où l'intérêt d'incorporer des aliments riches en oméga-3 qui soient accessibles, abordables et consommables par tous pour corriger ce déséquilibre et prévenir les complications métaboliques. Les graines de chanvre entières (cannabis sativa) ont une valeur nutritionnelle exceptionnelle, étant très riches en acides gras essentiels (AGE) et autres acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide stéaridonique (SDA). **Objectifs :** Le but était d'évaluer les effets d'une supplémentation alimentaire en graines de chanvre et en graines de lin entières sur le développement de l'obésité et des complications associées dans un modèle de souris obèse induit par le régime alimentaire et déterminé ses effets sur l'axe microbiome-endocannabinoïde (eCBome). **Méthodes :** L'expression des gènes de l'eCBome et du profil lipidique a été mesurée dans les tissus par transcriptomique qPCR ciblée et lipidomique LC-MS/MS, tandis que la composition du microbiote fécal a été évaluée par séquençage de l'ADNr 16S. **Résultats :** Les résultats de cette étude suggèrent que les graines de chanvre pourraient être plus efficaces que les graines de lin pour prévenir certains troubles métaboliques causés par les régimes riches en graisses. Cependant, la modulation de l'eCBome-microbiome était similaire pour les deux régimes : avec une augmentation de l'eCBome n3-FA dérivé des lipides et des changements mineurs dans le microbiome.

Abstract

Background: Increasing evidence supports the cardiometabolic health benefits of a diet rich in omega-3 fatty acids. These fatty acids may impart their health benefits partly by modulating the endocannabinoid system as well as the gut microbiome, both of which are key regulators of several aspects of cardiometabolic health and obesity. Hence the interest in incorporating in the diet foods rich in omega-3, which are accessible, not expensive and consumable by everyone, in order to correct this imbalance and prevent metabolic complications. Whole Hemp seeds (*cannabis sativa*) are of exceptional nutritional value, being very rich in essential fatty acids (EFAs) and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) including stearidonic acid (SDA). **Objectives:** The goal was to assess the effects of dietary supplementation of whole Hemp seeds and whole flax seeds on the development of obesity and related complications in a diet-induced obesity mouse model and determine its effects on the gut microbiome-endocannabinoidome (eCBome) axis. **Methods:** The expression of eCBome genes and lipid profiles were measured in tissues using targeted qPCR transcriptomics and LC-MS/MS lipidomics, whereas the composition of the fecal microbiota was assessed by 16S rDNA sequencing. **Results:** The results of this study suggest that hemp seeds may be more effective than flax seeds in preventing some metabolic disorders caused by high-fat diets. However, the modulation of the eCBome-microbiome was similar with both diets: with an increase in the lipid-derived eCBome n3-FA and minor changes in the microbiome.

I. Introduction

Omega-6 (linoleic acid) and omega-3 (alpha-linolenic acid) are essential fatty acids (FAs) that cannot be manufactured in mammals due to the lack of endogenous enzymes, so they must come from the diet. At the same time, omega-6 FAs cannot be converted into omega-3 and *vice versa* by humans because the body does not possess the conversion enzyme, omega-3 desaturase (18,19).

Omega-6 FAs are the most abundant polyunsaturated fatty acids (PUFAs) found in nature, being produced by both animals and plants, indeed the oils from most seeds (sunflower oil, corn oil, soybean oil and pumpkin oil), and they are derived from elongation and desaturation of linoleic acid (LA) (18:2 ω -6). Concerning omega-3 FAs, they are found in seafood and in the chloroplasts of green leafy vegetables, as well as in lin seeds, rapeseed, chia seeds, hemp seeds and walnuts, and they are derived from elongation and desaturation of alpha-linolenic acid (ALA) (18:3 ω -3) (17). The best sources of long-chain omega-3 FAs, with a better bioavailability, are fatty fish such as salmon, herring, mackerel, sardines and seafood (e.g., krill) as well as marine mammals (e.g., seal) (21). During human evolution, the ratio of dietary omega-6 to omega-3 was close to 1, whereas today it has increased to 20:1 in Western diets, making it at odds with the diet on which human beings evolved (22). Indeed, several nutritional studies show that high omega-6/omega-3 ratio have a direct link to the “obesity epidemic” (26,27). Further, various clinical studies have documented the beneficial effects of omega-3 on weight reduction (28), body composition (29) as well as decreased hunger and increased in satiety (30). Other studies have shown that omega-3 supplementation reduces body weight in lean individuals (31), overweight people (32) and obese (33). The observed protection against various aspects of the metabolic syndrome observations are often linked to the potential anti-inflammatory and antioxidant activities of omega-3 FAs (360). An increasing number of studies support the cardiometabolic health benefits of a diet rich in omega-3 fatty acids, especially long chain fatty acids. Most studies focus on the omega-3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) derived from marine sources, and they show that eating fish rich in these FAs is linked to a lower risk of developing cardiovascular disease, because of their beneficial effects on inflammation, heart function and blood clotting (361). Therefore, the American Heart Association’s dietary guidelines recommend high consumption of fatty fish in order to increase dietary omega-3 FAs (362).

These FAs may exert part of their health benefits by modulating the endocannabinoid system (ECS) as well as the gut microbiome, both of which are key regulators of several aspects of cardiometabolic health and energy metabolism.

The ECS plays a pivotal role at both central and peripheral levels to generally decrease metabolism and increase energy storage in several organs (151). Endocannabinoids (ECs; *N*-arachidonylethanolamine (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG)) are long chain arachidonic acid (AA)-derived signalling lipids generally produced on demand from phospholipid precursors (363), and originally found to activate cannabinoid receptors type-1 and type-2 (CB1 and CB2) (364). The abundance of these ECs in the brain is related to the fact that AA is the most abundant omega-6 FA in the brain (365). Modification of the omega-6/omega-3 ratio modulates the levels of AEA and 2-AG as well as the levels of related lipid signalling mediators that make up the expanded ECS, or endocannabinoidome (eCBome) signalling system, which is composed of AEA and 2-AG as well as their endogenous congeners (the *N*-acylethanolamines and 2-acylglycerols, respectively, which can contain various omega-3, -6 and -9 unsaturated FAs as well as saturated FAs) and other analogues, their several receptors and metabolic enzymes (158). An obesogenic diet rich in omega-6 and poor in omega-3 FAs increases AEA and/or 2-AG tissue concentrations and signalling (226–229) due primarily to an increase in the levels of esterified AA, the ultimate precursor for these two endocannabinoids (366–368), and possibly also to changes in the expression of AEA and 2-AG anabolic (*N*-Acylphosphatidylethanolamines (NAPE-PLD) and Diacylglycerol lipase (DAGL) respectively) and catabolic (Fatty acid amide hydrolase (FAAH) and Monoacylglycerol lipase (MAGL) respectively) enzymes (230–233), as well as an increase in CB1 receptor levels (234). These changes are often positively correlated with BMI, and abdominal obesity (230,231,236). Therefore, the ECS dysregulation is associated with increased adiposity, fatty liver disease, dyslipidemia and insulin resistance. The administration of omega-3 FA rich flax seed oil with a lard diet to young mice significantly decreased liver AEA levels and improved glucose homeostasis (237). Furthermore, *N*-docosahexaenylethanolamine (DHEA) and *N*-eicosapentaenylethanolamine (EPEA), derived from DHA and EPA omega-3 FAs, have been also identified as eCBome mediators (238). EPEA and DHEA are present in the brain in concentrations about two-fold higher compared to AEA (239), but their binding affinity for CB1 and CB2 receptors is lower

(238,240). EPEA and DHEA share the same pathways of production and degradation as AEA, leading to a competition between the EPEA, DHEA and AEA; this competition can be affected by changing the dietary omega-6/omega-3 ratio, thus modulating the proportion of *N*-acylethanolamines derived from omega-6 and omega-3 FAs (223,241,242). In other words, the proportions of eCBome mediators depend on phospholipid biosynthetic precursors, which in turn are sensitive to omega-6 and omega-3 changes in dietary fats (368). For instance, EPA- and DHA-rich fish oil and krill oil were both able to down regulate EC tissue levels in obese rats (244) and mice (245) and the supplementation with 2 g/day of krill oil or 4 g/day of krill powder in obese subjects significantly decreased circulating 2-AG (246) and AEA (247) levels, respectively. These studies and others led us to propose that the positive health effects of long-chain omega-3 FAs derive, at least in part, from the modulation of the ECS, and in particular from the reduction of AEA and 2-AG activity at CB1 receptors (248,249).

Like the ECS, the gut microbiome can be modified by dietary fatty acids, including supplementation with omega-3 FAs from fish oil and krill oil (369–371). The microbiome is directly modulated by dietary changes (214), where the obesogenic diet is linked to dysbiosis and a decreased bacterial diversity which are associated with obesity and metabolic syndrome (215–218). Furthermore, the study from Pu S. and colleagues, showed that serum lipopolysaccharide (LPS) levels were higher in mice fed with lard compared with those fed with fish oil, indicating that microbial factors are present in the periphery contributing to white adipose tissue inflammation (23). By modifying the diet with supplementation with omega-3 FAs from fish oil and krill oil, the gut microbiota composition can be restored (250–252) at the genera level (253). In fact, several studies (254) showed that mice fed with fish oil have increased relative abundance of *Akkermansia muciniphila*, which is a mucin-degrading, gram-negative bacterium inversely correlated with overweight, obesity and diabetes, in both murine (255) and human (256) studies.

Recently, a bidirectional interaction between the gut microbiome and the ECS has come to light that is relevant to metabolic health (259). The eCBome changes, such as increased CB1 expression and 2-AG levels, accompanying an obesogenic diet are associated with an altered microbiome (260,261). In the same way, the gut microbiome changes induced by an

obesogenic diet increase gut barrier permeability, thereby causing increased circulating levels of LPS, which in turn modulated the eCBome (264). This may engender a vicious circle due to increased endocannabinoid signalling at CB1 receptors-> increased intestinal permeability-> increased LPS levels-> increased endocannabinoid signalling, which might be able to be interrupted by increasing the dietary intake in omega-3 FAs and thus decreasing the levels of the CB1 ligands AEA and 2-AG.

Faced with this critical situation, it appears indispensable to find alternative foods that are beneficial, easily available and can be used to improve the industrial food quality. In this regard, omega-3 FA-rich plant seeds may represent a valuable nutritional resource. In this context, whole hemp seeds possess excellent nutritional values. Hemp (*cannabis sativa*) is an ancient Asian crop that has been grown and cultivated for about 10,000 years (290). *Cannabis sativa* can be classified mainly into two phenotypes: drug-type (marijuana) and non-drug type (Hemp). Over the past 20 years, Australia, Canada, and most recently the United States, have legalized the cultivation of hemp seeds with low D⁹-tetrahydrocannabinol (THC) levels (<0.3%) (291). Hemp seeds represent a potentially important food crop for northern populations, and especially individuals with low consumption rates of omega-3 fatty acids and fibers, could take healthful benefits from this dietary source. Whole hemp seeds are very rich in essential fatty acids (EFAs) and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (292,293). In addition to the omega-6 FA linoleic acid (LA), hemp seeds exhibit high levels of the omega-3 FA alpha-linolenic acid (ALA), found at about a 3:1 ratio, which is proposed to be ideal for a healthy diet and representative of Paleolithic human diets (372,373). Omega-3 ALA amounts in lin seeds (17,9 g/100 g), which produce a beneficial effect on the eCBome, with overall reduction in CB1 signalling even under a high-fat diet, are higher than in hemp seeds (Finola variety: 5,53 g/100 g) (see chapter 1). On the other hand, hemp seed oil is a rich source of the omega-3 FA stearidonic acid (SDA) (2%), thus bypassing the lack of the omega-3 desaturase-mediated conversion of ALA to SDA in mammals, and, by being elongated to EPA, provides the same beneficial effects coming from marine sources of this latter omega-3 FA (374). Based on human intervention studies, it appears that daily supplementation with 30 ml of hemp seed oil is able to produce positive cardiometabolic effects (294).

Hemp seeds contain almost as much high-quality protein (297). Its proteins are well known for their digestibility, and their richness in all nine essential amino acids required by humans (293). Hemp seeds are also rich in polyphenols. The antiradical capacity of these compounds is evident in several chemical and *in vitro* studies (298–300). In fact, phenols and polyphenols, whose production is strictly related to plant defence mechanisms, have gained a lot of attention because of their potential use as prophylactic and therapeutic agents in many diseases (301). These compounds are also well-known modulators of the gut microbiome, which has been suggested to mediate part of their beneficial effects (375). Finally, hemp seeds are a unique source of fiber, vitamins and minerals, which are well established to contribute to the beneficial modulation of the gut microbiome (376).

Based on all the above, the aim of this study was to examine the effects of whole hemp seeds on the development of obesity, insulin resistance and various metabolic and inflammatory parameters in a high fat/high carbohydrate diet-induced obesity murine model and to correlate the observed changes to concurrent modifications of the ECS and gut microbiota. We compared the effects of hemp seeds with Lin seeds, which has already been thoroughly investigated in this context. We hypothesize that hemp seeds will improve adiposity, circulating glucose, fatty acids ratio, lipid and adipokine levels and insulin sensitivity in obese mice, and speculate that the observed changes will be accompanied by modifications in the circulating and tissue levels of eCBome lipid mediators as well as by drastic changes in the gut microbiota composition.

Problematic

Are hemp seeds able to improve metabolic disorders caused by an obesogenic diet by modulating the endocannabinoidome-microbiome axis?

Objective

To examine the effects of whole hemp seeds on the development of obesity, insulin resistance and various metabolic and inflammatory parameters in a high fat/high carbohydrate diet-induced obesity murine model and to correlate the observed changes to concurrent modifications of the ECS and gut microbiota

Hypothesis

Hemp seeds will improve adiposity, circulating glucose, n-3/n-6 fatty acid ratio, lipid and adipokine levels and insulin sensitivity in obese mice, and the observed changes will be accompanied by modifications in the circulating and tissue levels of eCBome lipid mediators as well as by changes in the gut microbiota composition

II. Materials and Methods

1.1. Animals, housing and diets

All studies were carried out at 'Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Québec' (IUCPQ, QC, Canada). Six-week-old male C57BL/6J (40 mice) were divided randomly into 4 groups (suppl. Figure 1) after one week of acclimatization to the animal facility and access to regular chow diet. All the mice were provided with water *ad libitum* and housed individually on a regulated daylight cycle. For 8 weeks protocol, the control group was fed with a diet containing 10% fat, 20% protein and 70% carbohydrates (LFLS). All other groups were fed with an obesogenic High Fat/High Sucrose (HFHS) diet composed of 45% lipids, 20% protein and 35% carbohydrates without or with the supplementation of Lin seeds or Hemp seeds (suppl. Figure 2). The 15% of the fat intake in the supplemented diets was derived from the seeds. Quantity determined firstly, on a study by Demizieux L and collaborators which showed that this rate is sufficient to obtain a beneficial effect for Lin seeds (237), and secondly, on the idea that we can mimic a clinical study with 15% of fat coming from the seed since it represents 37 g of whole Finola seeds and that can easily be consumed daily. The Hemp seeds (Finola) was provided by our partner Nature's Decision and the different diets were made by Research Diet USA.

1.2. Determination of food intake, body weight and composition

Body weight and food intake were assessed twice a week. Body composition (lean mass, fat mass, water content) was determined by nuclear magnetic resonance (NMR) using ^CBruker's Minispec Analyzer at week 0 and week 8. Liver weights of animals were determined after sacrifice.

1.3 Glucose tolerance test:

After 8 weeks on the diet, mice were fasted 6 h prior to an oral-glucose-tolerance test (OGTT). 2ul/g of 50% dextrose solution was administrated by gavage and blood glucose were measured from the tail at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Blood samples were collected during all-time points for insulin determination; measured with the Ultrasensitive mouse ELISA kit (ALPCO). The HOMA-IR was determined using the following formula: Area under the curve of fasting insulinemia (ng/mL) * Area under the curve of fasting glycemia (mg/dL).

During the OGTT, we evaluated the intestinal permeability by the measurement of sulfonic acid fluorescence .150 µL of the sulfonic acid solution (Mix 1.5 mg sulfonic acid with 150 µL 0.5% Carboxymethylcellulose Sodium Salt [CMC] for each mouse) were administered with the dextrose solution. 5 µL of plasma was pipetted each well of a black 96-well plate with optical bottom placed on ice.

Before reading the plate 150 µL 0.5% CMC is added each well and the content is mixed by pipetting. The plate is read on a plate reader with excitation/emission 485/528 nm (unpublished reference). Then mice had a week of rest to de-stress before sacrifice.

1.4. Blood, tissue collection and analysis

After 12 hours of fasting, intracardiac blood samples were taken in tubes contain EDTA (K3) from animals during deep isoflurane anesthesia followed by cervical dislocation. Then, mice were dissected to collect the necessary tissues and organs including liver, muscle, intestine, adipose tissues and brain for the study.

1.5. Plasma analysis

Plasma levels of cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol were measured by the biochemical analysis platform of the Quebec Heart and Lung Institute by colorimetry (Siemens Dimension Vista 1500).

Metabolic parameters: Ghrelin, GIP, GLP-1, Insulin, Glucagon and Resistin; as well as inflammatory state and circulating adipokine levels: IL-6, TNF-alpha, adiponectin, leptin,

IFN γ , IL-17, IL-10, IL-1 β and PAI-1, were assessed via bioplex- BIO-RAD analysis (Bio-Plex ProTM Mouse Diabetes Standard 8-Plex+Adiponectin, and Bio-Plex ProTM Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group I).

1.6. Liver triglycerides

To measure hepatic triglyceride levels, 50 mg of liver were used for a standard chloroform-methanol Folch lipid extraction as previously described (377) and triglycerides were measured by commercial kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK).

1.7. Lipid extraction and HPLC-MS/MS for the analysis of eCBome mediators

Lipids were extracted from tissue samples according to the Bligh and Dyer method (378) with slight modifications. Tissues were processed and analyzed randomly and blindly. Briefly, the samples of each mouse were powdered in liquid nitrogen and about 10 mg was homogenized in 1 ml of a 1:1 Tris-HCl 50mM pH 7: methanol solution containing 0.1M acetic acid and 5 ng of deuterated standards. The hypothalamus followed the same steps but were directly homogenized in the 1:1 Tris-HCl solution with a tissue grinder and not powdered in liquid nitrogen. 1ml of chloroform was then added to each sample, which was then vortexed for 30 seconds and centrifuged at 3000 \times g for 5 minutes. The organic phase was collected and another 1 ml of chloroform was added to the inorganic one. This was repeated twice to ensure the maximum collection of the organic phase. The organic phases were pooled and evaporated under a stream of nitrogen and then suspended in 50 μ l of mobile phase containing 50% of solvent A (water + 1 mM ammonium acetate + 0.05% acetic acid) and 50% of solvent B (acetonitrile/water 95/5 + 1mM ammonium acetate + 0.05% acetic acid). 40 μ l of each sample was finally injected onto an HPLC column (Kinetex C8, 150 \times 2.1mm, 2.6 μ m, Phenomenex) and eluted at a flow rate of 400 μ l/min using a discontinuous gradient of solvent A and solvent B (379). Quantification of eCBome-related mediators (suppl. Table 1), was carried out by HPLC system interfaced with the electrospray source of a Shimadzu 8050 triple quadrupole mass spectrometer and using multiple reaction monitoring in positive ion mode for the compounds and their deuterated homologs.

In the case of unsaturated monoacyl-glycerols, the data are presented as 2-monoacylglycerols (2-MAGs) but represent the combined signals from the 2- and 1(3)-isomers since the latter are most likely generated from the former via acyl migration from the *sn*-2 to the *sn*-1 or *sn*-3 position.

1.8. RNA isolation and Reverse Transcription

For each mouse, about 10 mg of the samples was ground with a mortar and pestle, and RNA was extracted using the RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions and eluted in 30 μ l of UltraPure Distilled Water (#10977035, Invitrogen, CA, USA). Tissues were processed randomly and blindly. The concentration and purity of RNA were determined by measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm, and RNA integrity was assessed by an Agilent 2100 Bioanalyzer, using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (#5067-1511, Agilent Technologies, CA, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368814, Applied Biosystems, CA, USA) in a reaction volume of 20 μ l.

1.9. Gene expression analysis

Sixty-five nanograms total of starting RNA were used to evaluate the expression of the 52 eCBome-related genes and 4 housekeeping genes (Suppl. Table 2) using a custom-designed qPCR-based TaqMan Open Array on a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) following the manufacturer's instructions. 24 samples (6 per group) were analyzed randomly.

The mRNA expression levels were calculated from duplicate reactions using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as calculated by CFX Maestro Software (Bio-Rad) and are represented as fold change with respect to the baseline (LFLS group) within each tissue for each age. *Hprt1* (Mm.PT.39a.22214828, IDT, IA, USA) and *Tbp* (Mm.PT.39a.22214839, IDT, IA, USA) were used as reference genes.

1.10. DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing

DNA was extracted from feces using the QIAmp PowerFecal DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturers' instructions. The DNA concentrations of the extracts were measured fluorometrically with the Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and the DNAs were stored at -20°C until 16S rDNA library preparation. Briefly, 1 ng of DNA was used as template and the V2-V3 region of the 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the QIAseq 16S Region Panel protocol in conjunction with the QIAseq 16S/ITS 384-Index I (Sets A, B, C, D) kit (Qiagen, Hilden, Germany). The 16S metagenomic libraries were eluted in 30 μl of nuclease-free water and 1 μl was qualified with a Bioanalyser DNA 1000 Chip (Agilent, CA, USA) to verify the amplicon size (expected size ~ 600 bp) and quantified with a Qubit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Libraries were then normalized and pooled to 2nM, denatured and diluted to a final concentration of 6 pM and supplemented with 5% PhiX control (Illumina, CA, USA). Sequencing (2×300 bp paired-end) was performed using the MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles) on an Illumina MiSeq System. Sequencing reads were generated in less than 65 h. Image analysis and base calling were carried out directly on the MiSeq. Data was processed using the DADA2 pipeline (380) and microbiota composition assessed by calculating alpha and beta-diversity indexes and intra and inter-individual variations in microbial composition using PERMANOVA (vegan R package) (381).

1.11. Statistical analysis

All the statistical analyses were made with Graphpad prism (version 8.0.1) using one-way ANOVA or two-way ANOVA.

III. Results

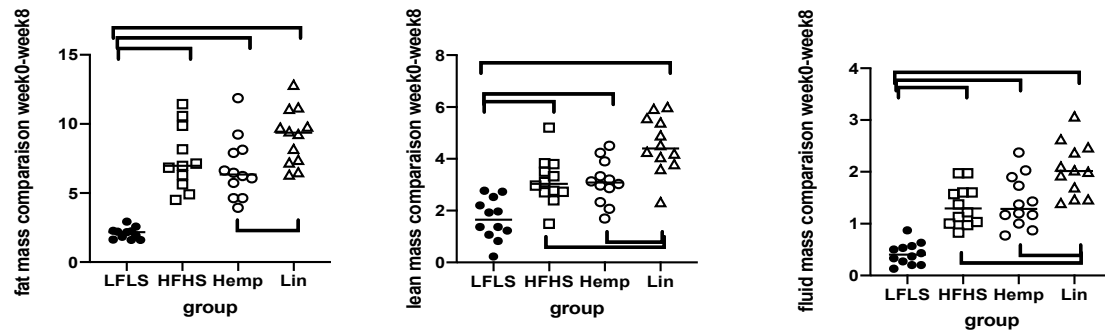
To investigate the effects of whole hemp seed dietary supplementation on the gut microbiome-eCBome axis and its implications in diet-induced obesity we set up an 8-week protocol supplementation where the LFLS, HFHS and the Lin supplemented diets were the control groups (suppl. Figure 1). In order to analyze the differences in the anthropometric, metabolic and inflammatory parameters we made several measurements before, during and at the end of the protocol.

1. Anthropometrics and metabolic results:

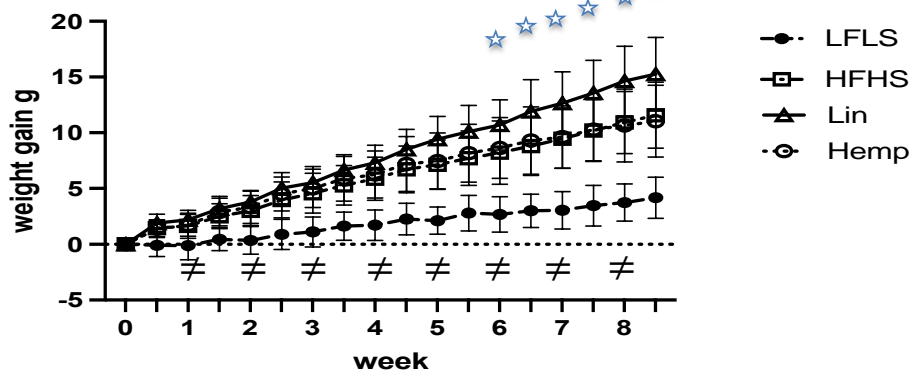
- *Effect of hemp seeds supplementation on anthropometric and metabolic parameters affected by HFD-induced obesity*

Before starting our protocol (week 0), we confirmed the non-significant differences between all the groups in fat mass, lean mass and fluid mass by results coming from the NMR at 6 weeks of age while the mice were on a standard chow diet (suppl. Figure 3-A). However, already after 8 weeks of diet introduction, the Lin and the HFHS groups had the highest levels of fat mass when the Hemp group had the lowest level, but still higher compared to LFLS. Interestingly, the hemp group has significantly less fat than the Lin group. When we corrected the fat mass by the total weight of the mouse, we observed the same significant differences. As for lean mass, the Lin group also had the highest level with a significant difference with respect to the LFLS, HFHS and Hemp groups (Figure 7-A), but when we corrected the lean mass by the total weight of the mouse we had an inversion of the results, with the LFLS having the highest significant lean mass compared to all groups (suppl. Figure 3-B). Concerning the liquid mass, the LFLS group had the lowest levels compared to all groups (Figure 7-A). The Hemp and the HFHS group also had less liquid mass compared to the Lin group. When we corrected the liquid mass by the total weight of the mouse, we observed the same differences (suppl. Figure 3-B). This difference persisted even when we compared the changes in body composition between week 0 and week 8; we observed the same profile where the LFLS group had the lowest levels of fat mass, lean mass and liquid mass, and the Lin group had the highest levels with a significant difference compared to the Hemp and the HFHS groups (Figure 7-A).

A



B



C

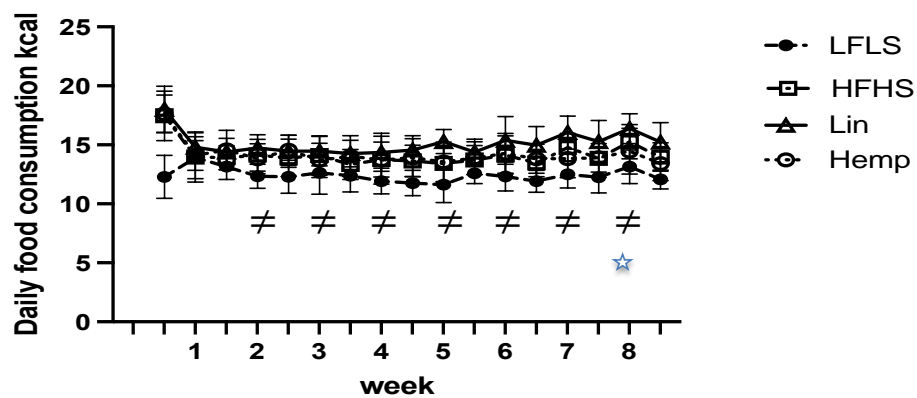


Figure 7 : (A) Body composition changes (delta difference) between week 0 and week 8 in g. * (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); ****(p <0.00001). (B) Weight gain in g: ≠

significant difference between LFLS vs all the groups fed with HFHS diet ($p < 0.05$).★, significant difference between Lin group vs Hemp and HFHS groups ($p < 0.05$). (C) Daily food consumption in Kcal: ≠ significant difference between LFLS vs all the groups fed with HFHS diet ($p < 0.05$). ★, significant difference between Lin group vs Hemp group ($p < 0.05$).

This was also evident when measuring weight gain. From the first week, all the groups fed with the HFHS diet gained significantly more weight compared to LFLS group and the highest level of significance was observed in the Lin group. From week 6 the Lin group also started to gain significantly more weight than Hemp and HFHS groups (Figure 7-B).

To investigate whether differences in weight gain were a result of differences in food intake between groups, we monitored this parameter twice a week. From week 2, the LFLS group consumed significantly fewer calories than all the HFHS groups. At week 8 the Hemp group started to consume significantly less energy than the Lin group (Figure 7-C).

We then went on to look at glucose handling within the mice by administering an OGTT. The only significant differences found were between the LFLS group and all the HFHS groups, with the lowest response being in the LFLS group. However, the insulin levels during the OGTT were only significantly higher in the Lin vs. LFLS group. However, when we calculated the HOMA IR from the above curves, all the HFHS groups had increased values with respect to the LFLS group, (Figure 8).

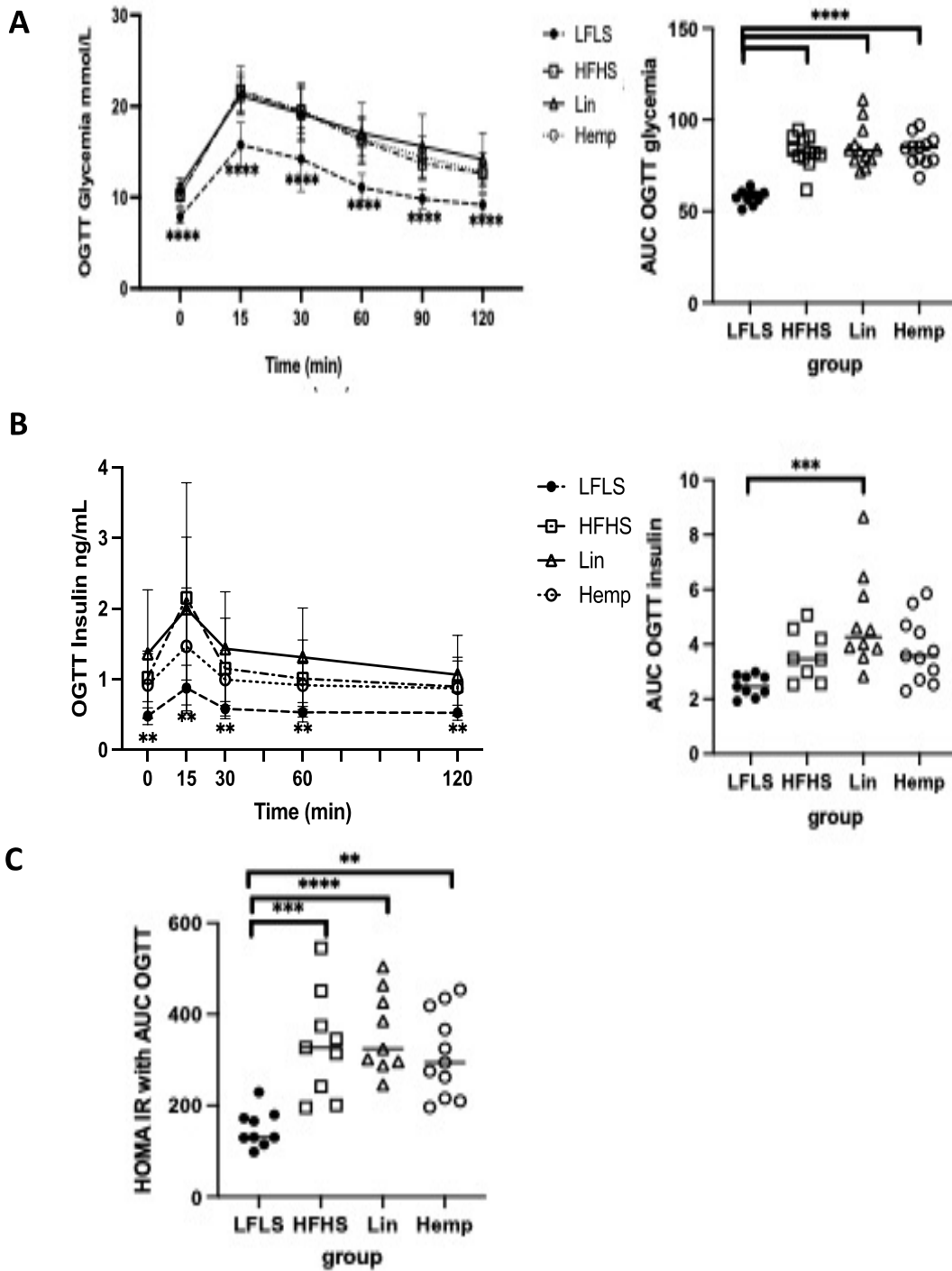


Figure 8: Glucose and insulin homeostasis after 8 weeks of diet. (A) Glycemic excursion curves during OGTT (left: significant difference between LFLS vs all the groups fed with

HFHS diet) with their corresponding area under the curve analysis of glucose (right); (B) Insulinemic excursion curves during OGTT (significant difference between LFLS vs all the groups fed with HFHS diet) and their corresponding area under the curve; (C) HOMA-IR with AUC (area under the curve) OGTT. * (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); ****(p <0.00001).

Regarding the intestinal permeability test, performed during the OGTT, the LFLS group exhibited the lowest intestinal permeability compared to HFHS, and at 30 min we saw a significantly lower permeability in the Hemp group vs the HFHS group (Figure 9).

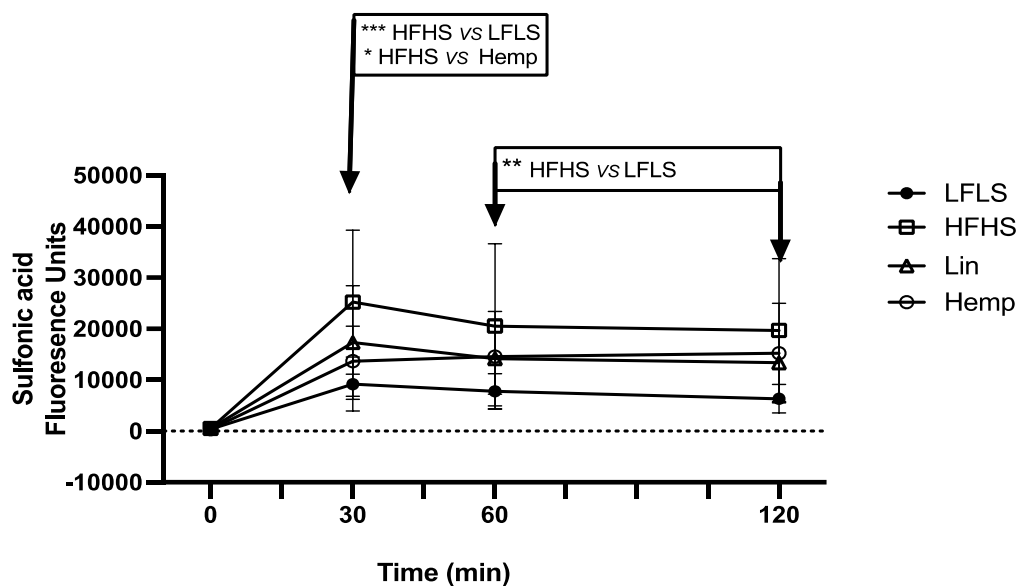


Figure 9: Intestinal permeability test at week 8 done during OGTT. * (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); ****(p <0.00001).

We then went on to assess the effects of the different diets in the biochemical parameters that were measured after 12 hours of fasting before sacrifice. Starting with the plasma triglycerides (TGs), no significant differences were observed among the groups (data not shown). However, triglyceride levels were significantly increased within the livers of the Lin

group compared to the LFLS group (Figure 10-A), and the Lin group also had significantly heavier livers than the LFLS group (Figure 10-B).

Total cholesterol was significantly lower in the LFLS group compared to all the HFHS groups (Figure 11). The Lin group had lower total cholesterol than the Hemp group. HDL cholesterol was higher in all the HFHS groups compared to the LFLS group and the highest levels were in the Hemp group, but was only significantly higher than the Lin group. However, the HDL/total cholesterol ratio was not different between groups.

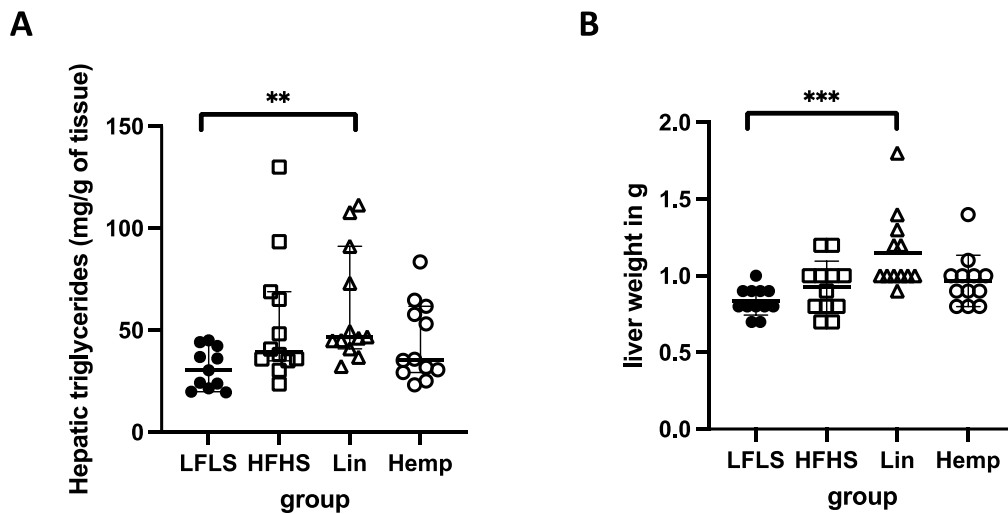


Figure 10: (A) Hepatic triglyceride levels (sacrifice done after 12 hours of fasting); (B) Liver weight. ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$)

Concerning plasma glucose levels, the Lin group had higher fasting glucose levels than both the LFLS and the HFHS groups, while the hemp group remained unchanged (Figure 11).

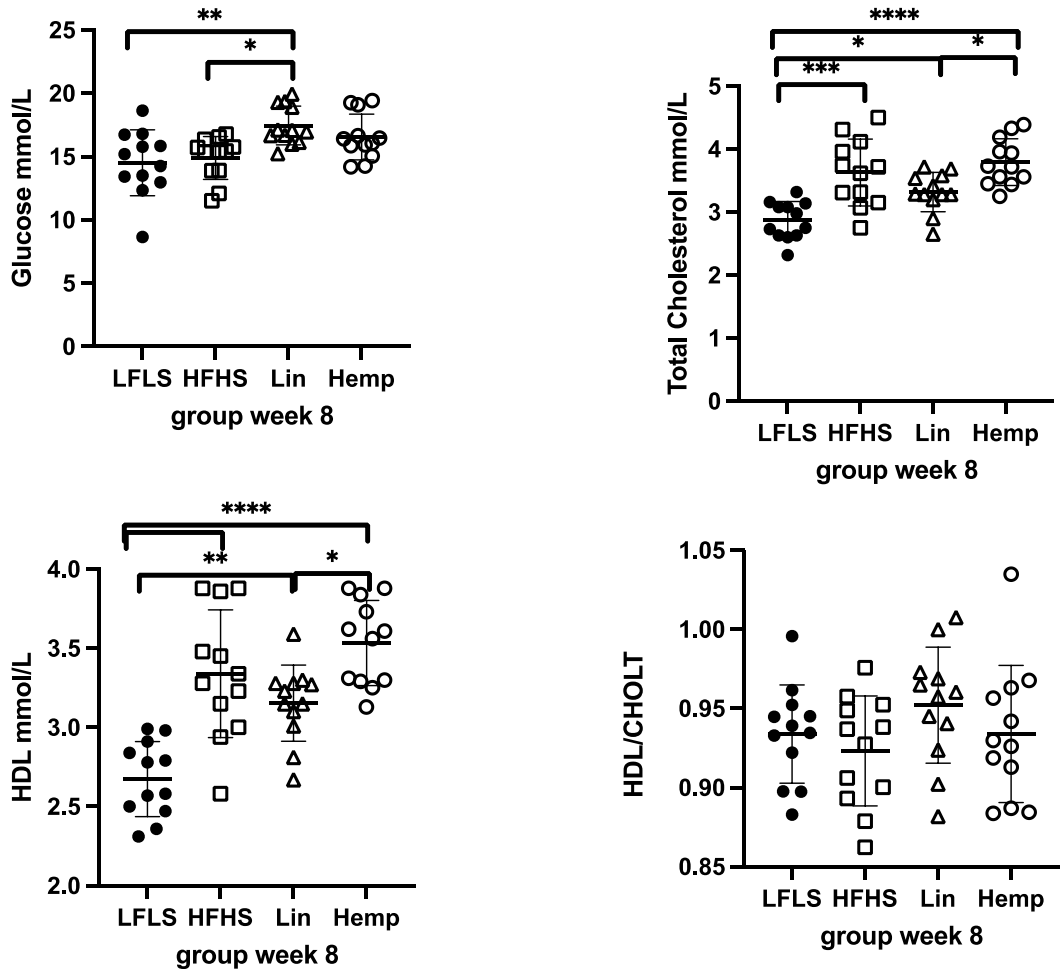


Figure 11: Metabolic parameters: glucose, total cholesterol and HDL cholesterol in mmol/L after 12 hours of fasting. * (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); ****(p <0.00001).

- *Effect of hemp seeds supplementation on hormones and inflammatory cytokines affected by HFD-induced obesity*

No significant differences were found between all the groups in basal ghrelin, GIP, GLP-1 and insulin levels (data not shown). Adiponectin levels were highest in the Lin group, being the only group to have a statistically significant increase over the LFLS group, whereas resistin levels were increased in all the HFHS groups compared to the LFLS group (Figure 12-A). Leptin levels were significantly higher in the HFHS and Lin groups, but not in the Hemp group, compared to the LFLS group (Figure 12-A). Despite this, there were no differences between the levels of any of these factors between the different HFHS groups.

We also assessed the inflammatory state using a bioplex assay. TNF alpha, IFN γ , IL-17, IL-10, IL-6 and the IL-1 beta levels were not significantly different among groups (data not shown). Interestingly, however, PAI-1 was significantly increased in the Lin and HFHS groups vs the LFLS group, and Hempseed supplementation inhibited the effect of the HFHS (Figure 12-B).

We also evaluated the browning, metabolism and the inflammatory state in the different adipose tissues using qPCR analysis of various biomarkers. For the browning in the BAT, no differences in *Pparg1a*, *Prdm16* and *Ucp1* expression among the different groups were observed (data not shown). In the Epididymal adipose tissue (EPAT), *Cidea* was less expressed in all the HFHS vs the LFLS, and *Pparg1a* was decreased in the Lin vs the LFLS group, but no differences in *Prdm16* and *Ucp1* were observed among the different groups (data not shown). Concerning the Subcutaneous adipose tissue (SCAT), *Cidea* and *Pparg1a* were less expressed in all the HFHS vs the LFLS and again no differences were found in *Prdm16* and *Ucp1* expression among the different groups (data not shown). Evaluating the expression of lipid metabolic enzymes in the EPAT and the SCAT, *ACC1*, *Atgl*, *Hsl* and *Scd1* were all less expressed in the HFHS vs the LFLS groups (data not shown). Concerning the inflammation state in adipose tissues, in the EPAT, *IL10* and *TNF alpha* were increased only in the Lin vs the LFLS group (Figure 12-C), and no differences were found in *PAI-1* and *IL6* expression among the groups (data not shown). While in the SCAT, *TNFalpha* expression

was increased in all the HFHS group vs LFLS, and no differences were found in *IL10*, *IL6* and *PAI-1* among the groups (Figure 12-C and data not shown).

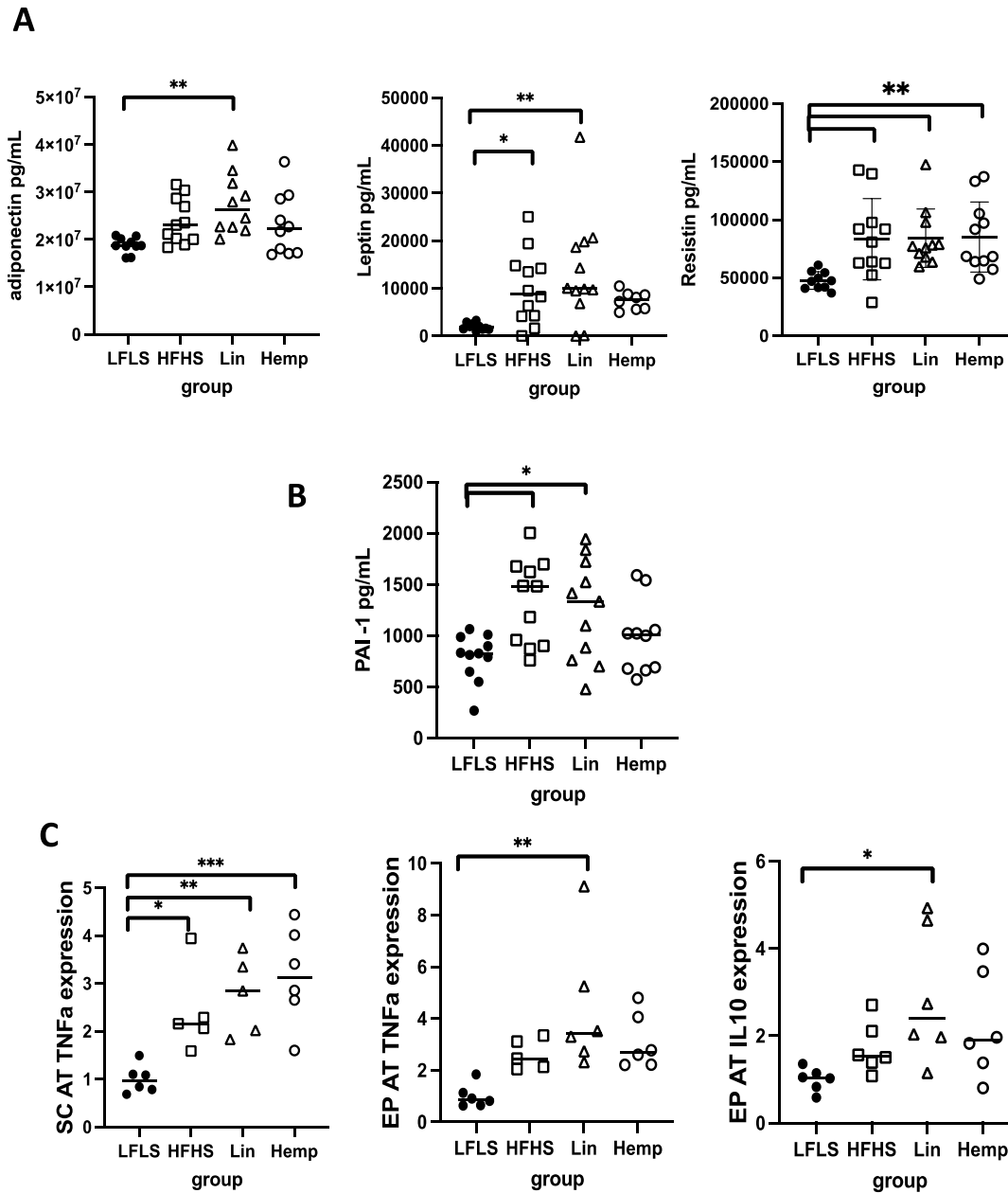


Figure 12 : (A) Adipokines in pg/mL: adiponectin, leptin and resistin. (B) Circulating inflammatory factor: PAI-1 in pg/mL. (C) Adipose tissue inflammatory markers: TNFa and IL-10. * (p < 0.05); ** (p < 0.01); *** (p < 0.001); ****(p < 0.00001).

2. *eCBome gene expression and mediator-level results*

To assess direct effects of the different diets on the eCBome, we measured eCBome gene expression and mediator levels in the muscle, hypothalamus, liver, BAT, SCAT, EPAT and plasma (Figure 13). As expected, we observed important changes in eCBome signalling under the Hemp and Lin seed supplemented diets, which are rich in PUFA.

- *Genes encoding eCBome receptors*

The receptor gene expression was different from a tissue to another. For the BAT, we observed changes in the expression of *Cnr1* and *Cacna1h* where *Cnr1* (encoding CB1) was more highly expressed in all the HFHS groups compared the LFLS group, but this increase was redered non-significant in the Hemp and Lin groups. In the EPAT and the SCAT we saw changes in the expression of *Cnr2* (encoding CB2), which was more strongly expressed in the HFHS and Lin *vs* the LFLS group in the EPAT, and more expressed in the Hemp and Lin *vs* the LFLS group in the SCAT. In the SCAT we also saw changes in the *Trpv2* and *Trpv4* genes, which were more expressed in the HFHS groups compared to the LFLS group. In the liver, *Pparg* expression was increased in the HFHS group *vs* the LFLS group and addition of hempseed or linseed rendered the difference insignificant. No significant differences were found in the muscle and hypothalamus (Figure 13).



Figure 13: *eCBome receptor and enzyme expression* measured by qPCR array in different tissues: Brown adipose tissue (BAT), Epididymal adipose tissue (EPAT), Subcutaneous adipose tissue (SCAT), Hypothalamus (HYPO), Liver and Muscle. Statistically significant differences between the high fat high sucrose groups (HFHS, Hemp or Lin) vs the LFLS group are indicated with a ‘+’ (increase in expression) or ‘-’ (decrease in expression); $p < 0.05$. Yellow boxes indicate significant difference between Hemp and Lin; green boxes indicate significant differences between Hemp or Lin and HFHS; $p < 0.05$.

- *NAE anabolic enzymes*

Regarding the *N*-acylethanolamine (NAE) anabolic enzymes, differences were also observed among the various tissues, and here we focus on those changes that might explain the observed changes in mediator levels. For the BAT we observed that *Gde1* expression was decreased in the Hemp group compared to LFLS, where *Inpp5d* expression increased in the Hemp and Lin groups vs LFLS. Most changes were observed in the EPAT, where the expression of 5 enzymes was altered, with *Gde1* and *Ptges* being less expressed in all HFHS groups compared to LFLS group and *Napepld* also being decreased in the Hemp vs LFLS group. Conversely, *Ptpn22* expression was increased in all the HFHS groups compared to LFLS group and *Inpp5d* expression was higher in the Lin and Hemp groups vs the LFLS group. *Abhd4* expression decreased in the Lin compared to Hemp group and *Hrasls5* also decreased in the Lin group vs the LFLS and the Hemp one (Figure 13).

Concerning the SCAT, changes were observed for the expression of 2 enzymes only: *Gde1* expression decreased in the Lin group compared to LFLS group, and conversely, *Inpp5d* increased in the Lin compared to the LFLS group. For the liver, both *Fam213b* and *Napepld* expression increased in the Lin group: vs all the groups, for *Fam213b*, and vs LFLS group, for *Napepld*. Finally, in the muscle, *Gde1* expression was increased in the Lin compared to the Hemp group.

Given the opposite changes often observed in omega-3 vs. omega-6 PUFA-derived NAEs, these data suggest that NAE biosynthetic enzymes contribute less than availability of NAE ultimate precursors to NAE tissue concentrations, and that different enzymes may contribute to omega-3 (i.e. *Gde1*, *Napepld* and *Abhd4*, but not in the liver or muscle) vs. omega-6 PUFA-derived (i.e., *Inpp5d*) NAEs.

- *NAE catabolic enzymes*

For the BAT, *Ptges* expression was lower in the HFHS and Hemp groups vs Lin. In EPAT, *Ptges* was less expressed in the HFHS group compared to LFLS group. Concerning the SCAT, *Naaa* was more expressed in the HFHS vs LFLS group. This time we saw change in the hypothalamus, *Faah* expression being decreased in the Lin vs LFLS group. Finally, for

the liver, *Faah* expression was decreased in the Hemp vs the LFLS group. Thus, lower expression of *Faah* in the Hemp or Lin groups may contribute to the increases of omega-3 PUFA-derived NAEs, whereas stronger expression of *Ptges* in the Lin group may contribute to reduced levels of omega-6 PUFA-derived NAEs (Figure 13)

- *Mono-acyl-glycerol anabolic enzymes*

For the BAT, *Dagla* expression was decreased in the Hemp group vs HFHS and LFLS group. In the EPAT, the changes were mostly found in the HFHS groups where *Daglb* was more expressed in Lin vs the LFLS group. Concerning the SCAT, only *Daglb* was more expressed in all the HFHS groups compared to the LFLS. For the hypothalamus, *Dgke* was decreased in the Lin group vs the LFLS and *Plcb1* was decreased in the Lin group vs HFHS and LFLS groups. Finally, in the muscle, *Dagla* was more expressed in the Lin vs the Hemp group. Thus, in some tissues (EPAT, muscle), *Dagla* or *Daglb* may contribute to increased levels of omega-3 PUFA-derived MAGs in the treated groups, and *Daglb* to increase MAGs in the SCAT following HFHS diet (Figure 13).

- *Mono-acyl-glycerol catabolic enzymes*

In the BAT, *Mogat1* was less expressed in HFHS and Lin group vs LFLS. In the EPAT, *Enpp2* and *Mogat1* were decreased in the HFHS groups vs the LFLS group. *Abhd6* and *Ces1d* expressions were decreased in the Lin compared to the LFLS group, where *Abhd12* expression was increased in the Lin vs the LFLS group. Concerning the SCAT, *Abhd6* expression was lower in the HFHS groups than the LFLS group and *Mogat1* was lower in Hemp than LFLS group. In the hypothalamus, *Alox12* that was more expressed in the Hemp compared to the HFHS group. (Figure 13).

In the liver, *Enpp2* increased in the HFHS group vs the LFLS and the Hemp group, and increased in the Lin vs the LFLS group. *Abhd16a* and *Abhd6* expression was higher in the Lin than the LFLS group. *Mogat1* expression was stronger in all the HFHS groups than the LFLS group.

These data emphasize how different MAG catabolic enzymes may contribute to both the increases of omega-3 PUFA-derived MAGs (via their reduced expression) and the decreases

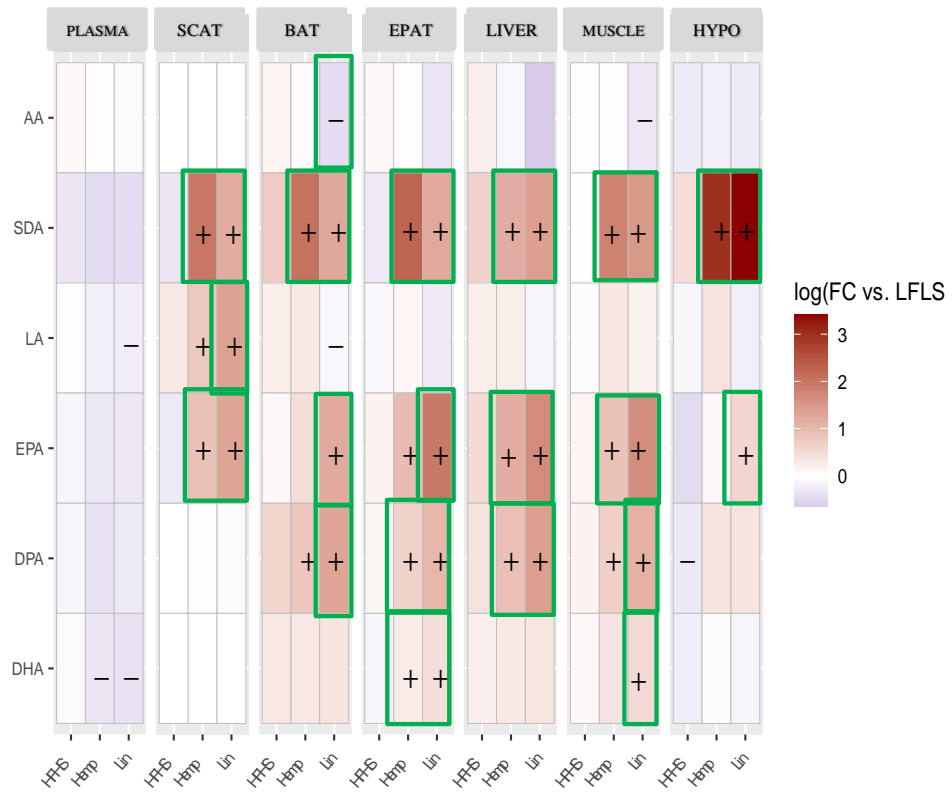
of omega-6 PUFA-derived MAGs (via their increased expression) in the treatment groups, in a tissue- and treatment-dependent manner.

- *eCBome mediators*

The mediator levels were measured in the BAT, EPAT, SCAT, liver, hypothalamus, ileum (data not shown for the ileum) and plasma. As expected, important changes in eCBome mediator concentrations under the Hemp and Lin seeds supplemented diets which are rich in PUFAs.

The fatty acid results (Figure 14-A) showed an increase in the omega-3 precursors and a decrease in the omega-6 precursors in several tissues of the supplemented diet mice. In the adipose tissue (BAT, EPAT and SCAT), the liver, the ileum, the hypothalamus and the muscle, at least two of the omega-3 FAs, SDA, EPA, DPA and DHA increased in the Hemp and the Lin *vs* the LFLS group. Conversely, at least one of the omega-6 FAs, AA and LA decreased the Lin group tissues *vs* the other groups.

A



B

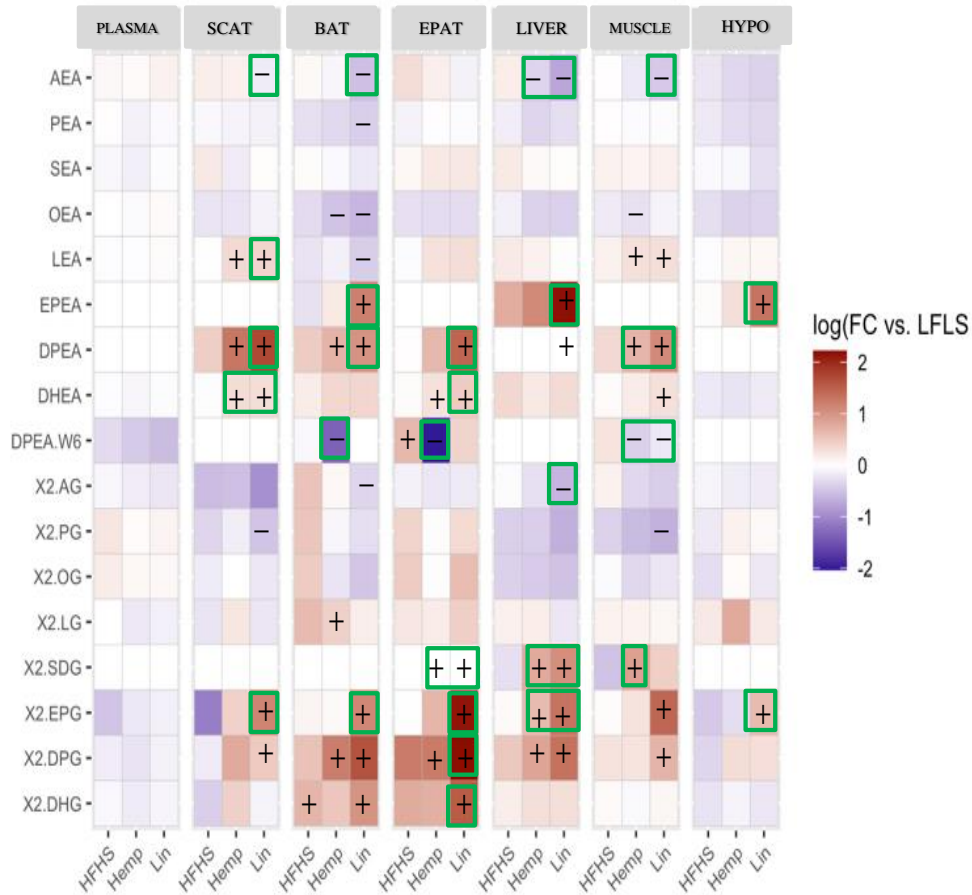


Figure 14: (A) Fatty acid levels in the different tissues; (B) *eCBome* mediators levels in the different tissues: Brown adipose tissue (BAT), Epididymal adipose tissue (EPAT), Subcutaneous adipose tissue (SCAT), Hypothalamus (HYPO), Liver and Muscle. Statistically significant differences between the high fat high sucrose groups (HFHS, Hemp or Lin) vs the LFLS group are indicated with a “+” (increase in expression) or “-” (decrease in expression); $p < 0.05$. Green boxes indicate significant differences between Hemp or Lin and HFHS; $p < 0.05$.

Likewise, at least 2 of the omega-3-derived NAEs, EPEA, DPEA and DHEA increased in the Hemp and Lin groups almost in all the tissues; whereas the omega-6 derived NAE, AEA,

decreased in all the tissues (except the EPAT and hypothalamus) of the Lin group, and the omega-6 DPEA decreased in the Hemp and Lin groups in the BAT, EPAT, and the muscle (Figure 14-B). Importantly, AEA, which is a driver of hepatosteatosis, was reduced in both Hemp and Lin groups as compared to HFHS.

For the 2-MAGs (Figure 14-B), once again, at least one of the omega-3-derived 2-MAGs, 2-SDG, 2-EPG, 2-DPG and 2-DHG increased in the Hemp and Lin groups in all the tissues, while the omega-6-derived 2-AG decreased in the Lin group in the BAT and liver.

Concerning the prostaglandins (data not shown), the omega-6 derived proinflammatory PGF2 alpha decreased in the Lin group in the BAT and the ileum; PGD2 decreased in the Hemp and Lin group in the BAT. Moreover, the omega-3-derived anti-inflammatory prostaglandin PGE3 increased in the Lin group vs all the other groups in the ileum.

The eCBome mediator levels proved that the diet supplementation was effective by increasing the levels of omega-3 FAs in the Lin and Hemp groups. In particular, SDA as well as the 1/2 SDG levels were remarkably higher in all the tissues of the Hemp group (Figure 15) (Figure 16), although the *N*-acylethanolamines of SDA was not detected.

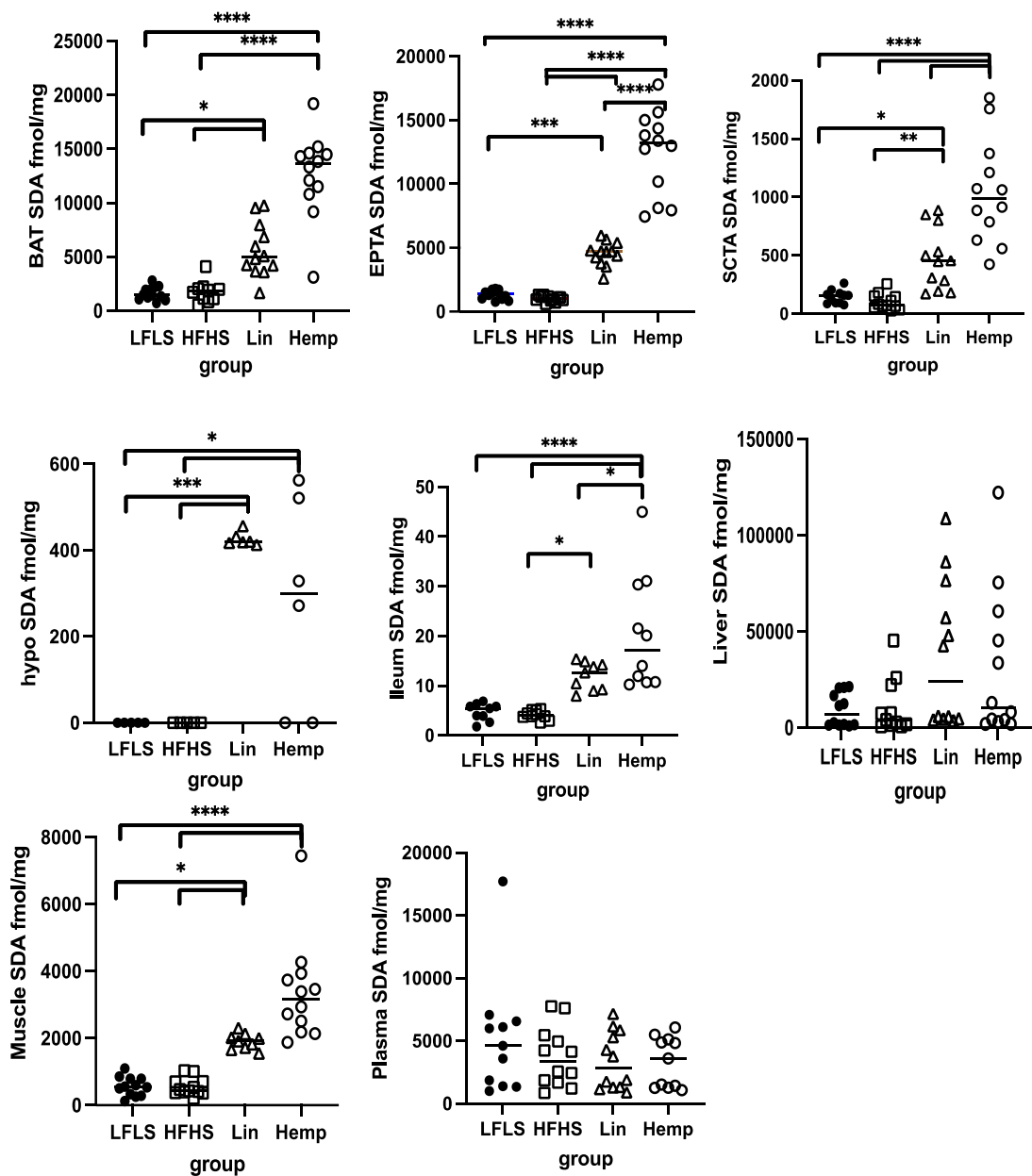


Figure 15: SDA profile in all the tissues and Plasma. * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$); **** ($p < 0.00001$).

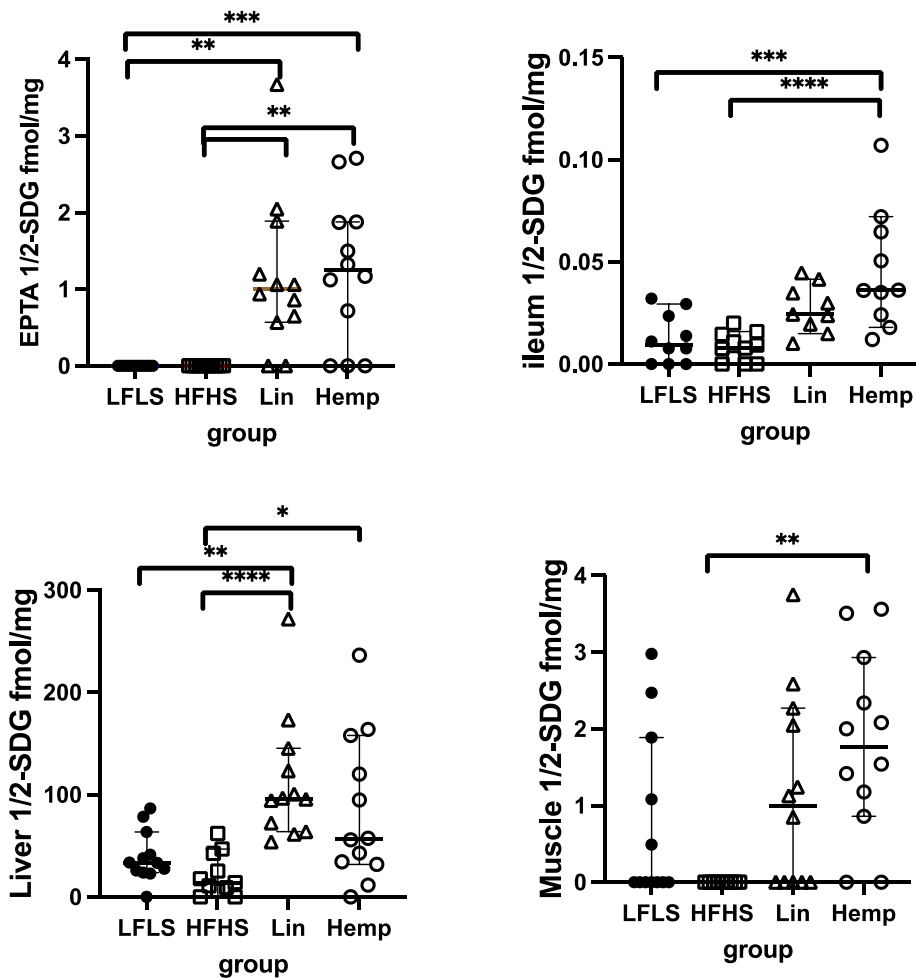


Figure 16: 1.2 SDG profile in the tissues. * (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); ****(p <0.00001).

3. Gut microbiota results

We next assessed the gut microbiota of mice on chow diet and in response to dietary changes. Metataxonomic profiling showed that the gut microbiota were mostly different between the chow diet (week 0) and after LFLS, HFHS, Hemp and Lin diets (week 8), *Akkermansiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Clostridiaceae_1*, *Eggerthellaceae*, *Enterococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae* and *Streptococcaceae* abundance increased in all the groups with reduced amounts of dietary fibers, i.e., in the

LFLS, HFHS, Hemp and Lin groups compared to the chow group, while the *Anaeroplasmataceae* and *Lactobacillaceae* abundance decreased with the supplemented diets. Most of the statistically significant changes were observed in the LFLS and the Lin group (suppl. Figure 4). The metataxonomic profiling showed only 2 changes at the family level when we compared the gut microbiota composition of the different dietary supplementations at week 8. *Clostridiaceae_1* was less abundant in Hemp vs Lin, and *Rikenellaceae* was more abundant in the Hemp and HFHS vs the LFLS group (suppl. Figure 5).

IV. Discussion

We postulated that supplementation of a HFHS diet with hempseeds would, given that they are a rich source of omega-3 FAs, exert benefits on health in part by modulating the endocannabinoidome (eCBome) system, (ECS) as well as the gut microbiome. The results regarding the anthropometric and metabolic measures of our study showed that the Lin group had the highest level of significance in weight gain vs the LFLS one, and from week 6 it also started to gain significantly more weight than the Hemp and HFHS groups. Concerning food consumption, the LFLS group consumed significantly less calories than all the HFHS groups, but the food intake of the Hemp group was not stable over the duration of the treatment, and at week 3, 4 and 8 was no longer significantly different from the LFLS group, and, perhaps more importantly, at week 8 it started to be significantly lower than in the Lin group. Concerning the body composition, the Lin and the HFHS groups had the highest levels of fat mass whereas the Hemp group had the lowest levels compared to LFLS. Accordingly, leptin levels, which are a reflection of the amount of fat mass (382), were significantly higher in Lin group compared to the LFLS group. These results are consistent with the observation that linseed supplementation increased weight gain in our mice, and suggest that within our diet the supplementation exacerbated obesity and its metabolic consequences, in contrast to other studies using linseed components (390).

Glycemia was also highest in the Lin, but not Hemp, HFHS group and, consequently, the AUC of the levels, in the OGTT test, of insulin, which is the anabolic hormone responsible, among others, of glucose homeostasis and whose deficiency or malfunctioning (insulin resistance) is linked to obesity and type 2 diabetes (383), these were significantly higher in

the Lin vs LFLS group. Accordingly, the HOMA IR index, which is positively correlated with insulin resistance (384), showed a higher significance in the HFHS and Lin groups with respect to the LFLS group, and treatment with hemp seeds decreased the statistical significance of this difference. Thus, in addition to a less compromised scenario at the level of HFHS-induced fat accumulation, the Hemp group was also characterized by lesser insulin resistance with respect to the Lin group. Furthermore, the Lin group was also the only one showing higher levels of liver TGs and weight with respect to the LFLS group.

Interestingly, the assessment of circulating inflammatory parameters showed that PAI-1, which is involved in thrombosis and atherosclerosis as well as ischemic cardiovascular events (385,386), was significantly higher in the Lin and HFHS groups, but not in the Hemp group, vs the LFLS group. Thus it appears that hempseed supplementation mitigated the HFHS-induced increase in PAI-1 levels, even if it only showed a trend towards a decrease as compared to the HFHS group, perhaps due to the fact that the study was under-powered to allow for the detection of a statistically significant decrease. Accordingly, in the EPAT, *IL10*, which is linked to insulin resistance in the adipose tissue (387), and *TNF alpha*, a pro-inflammatory cytokine that plays a role in the pathophysiology of insulin resistance (388), were increased in the Lin, but not Hemp, group vs the LFLS group. These results are consistent with the data presented above on the effects of linseeds on weight gain in mice on an HFHS, supporting the notion that these seeds are pro-obesogenic and exacerbate metabolic consequences associated with weight gain, while hempseeds do not.

These protective results in the Hemp group are partially in agreement with those reported by Paulina M Opyd et al (389), who were the first to examine the effects of whole hemp seeds supplementation on lipid metabolism. This recent paper showed that hemp seeds were more effective than hemp oil at regulating lipid metabolism in obese Zucker rats. We were unable to detect any beneficial effect of either seed on total cholesterol levels in mice on a HFHS diet. This, again may be due to our use of whole seeds rather than seed-derived n-3 FA-rich oils. Indeed, low efficacy of lin seed supplementation against the effects of a high-fat diet was reported also by Siti Raihanah Shafie et al (390), who showed that whole Lin seeds are less effective than lin seed components at reversing diet-induced metabolic syndrome in rats.

As expected, important changes in eCBome signalling under the hemp seeds and lin seeds supplemented diets, which are rich in PUFAs, were found in the present study. The ECS generally decreases energy expenditure and increases energy storage in several organs through the elevation of AEA and/or 2-AG levels and CB1 receptor activation (222). However the ECS is now considered as part of a much larger signalling system, the eCBome, which, with its over 100 lipid mediators and about 13 molecular targets (including the PPARs, thermosensitive TRP channels such as TRPV1, and orphan GPCRs such as GPR119) is also deeply involved in energy metabolism control, but also in ways opposite to endocannabinoid/CB1 signalling (223). Mediators whose ultimate precursors are omega-3 FAs like the EPEA and DHEA (224), and their targets, are also being actively investigated in the framework of inflammation (223). In fact, there is a competition between the omega-6 and omega-3 FA precursors in the production of the corresponding eCBome mediators, such as NAEs and 2-MAGs, since all members of these two families of lipids share the same anabolic enzymes. As a consequence, the higher is the intake of omega-6 FAs and their precursors such as LA, the more such FAs will be esterified into phospholipids wherefrom NAEs and 2-MAGs are biosynthesized, and the same applied to dietary omega-3 FAs and their precursors such as ALA (225). Therefore, it is not surprising that our results show a general increase in the omega-3 FAs and a decrease in the omega-6 FAs, and similar changes in their respective *N*-acylethanolamines and monoacylglycerols, in several tissues coming from mice fed the diets supplemented with Lin seeds or hemp seeds. In particular, the omega-3 FAs, SDA, EPA, DPA and DHA increased in the Hemp and the Lin groups vs the LFLS group, whereas the omega-6 FAs AA and LA decreased almost in all the tissues of mice belonging to the Lin vs the other groups. Likewise, the omega-3 derived NAEs, EPEA, DPEA and DHEA increased in Hemp and the Lin groups, whereas the omega-6 NAEs, AEA and DPEA decreased in either only the Lin or both the Hemp and Lin groups, respectively. Concerning the 2-MAGs results, once again, the omega-3 derived 2-SDG, 2-EPG, 2-DPG and 2-DHG increased in both the Hemp and Lin groups, whereas the omega-6 2-AG decreased in the Lin group. It must be emphasized, however, that we measured here the levels of free, rather than esterified, omega-3 and omega-6 FAs, which can reflect both the amounts of such FAs that will be esterified to phospholipids and act as eCBome mediator biosynthetic

precursors and the degree of enzymatic hydrolysis of eCBome mediators to the corresponding FAs.

Indeed, although the alterations in the tissue levels of eCBome mediators observed in our study can be explained mostly by the effects of the supplemented diet on the levels of the ultimate precursors of such mediators, also changes in the expression of eCBome anabolic and catabolic enzymes may contribute to such alterations. The hemp seeds diet was able to downregulate anabolic enzyme expression by decreasing *Napepld* mRNA levels vs the LFLS diet in the EPAT, and *Dagla* mRNA levels vs the HFHS and LFLS diets in the BAT, and vs the Lin diet in the muscle. Conversely, the lin seeds diet generally increased anabolic enzyme and decreased catabolic enzyme expression. In the liver, *Napepld* mRNA levels increased in the Lin vs the LFLS group, and, in the EPAT, *Daglb* mRNA levels were higher in Lin vs the LFLS group. Moreover, in the hypothalamus, *Faah* expression was decreased in the Lin vs LFLS group. More importantly, perhaps, these considerations suggest that the contribution of metabolic enzyme expression to the diet-induced alterations in NAE and 2-MAG levels observed here might be different depending on the administered diet, with anabolic enzymes contributing to either omega-6 or omega-3-derived mediator levels during hemp seeds or lin seeds supplementation, respectively. This intriguing hypothesis will need to be investigated in future studies.

Interestingly, SDA and the corresponding MAGs, 1(3)- or 2-SDG, increased significantly in the Hemp group compared to all the other groups in the different tissues, and especially in the adipose tissue. SDA is a rare omega-3 FA in nature and mainly contained in Hemp (391,392) and other seeds (393). Several clinical and fundamental studies reported the beneficial effect of SDA supplementation in improving lipid profiles such as dyslipidemia (394,395), atherosclerosis (396), cardiovascular disease (397), hepatic steatosis (398), inflammation (399), and cancer (400). Our results suggest that SDA, and possibly its metabolites, might be partly responsible for the blunting of the increase in PAI-1 levels observed in response to the HFHS by hemp seed supplementation, which was unaffected by lin seed supplementation. While, 1/2-SDG levels were similarly affected in the Hemp and Lin groups, except in muscle where Hemp resulted in a significant increase over Lin, differences in other SDA-derived metabolites (i.e. *N*-straeridonoylethanolamine; SDEA)

may be present within the mice, which we were not able to measure at the time of this study. However, we have since developed the methodology to quantify the eCBome level and show (in the next chapter) that murine cells are able to produce SDEA in response to incubation with SDA. A recent meta-analysis on the rate of mortality associated with levels of omega-3 FAs highlighted how mortality for all causes as well as for cardiovascular disease and cancer is inversely correlated to the levels of circulating long chain (20–22 carbon) omega-3 FAs but not to those of ALA (401). These findings are in agreement with the poor conversion of ALA to SDA, and hence to EPA and DHA, because of the lack of an efficacious desaturase enzyme, in humans and other mammals (402), and highlight the potential importance of dietary SDA. This omega-3 FA, by bypassing the necessity of such conversion, and being in turn converted to EPA and DHA (partly), might ensure amounts of C20–22 omega-3 FAs (and their metabolites) that are optimal to counteract several chronic societal disorders, and hence act as a surrogate of dietary EPA and DHA. Future studies will need to address the question of whether also 1- and 2-SDG and SDEA (which, however, we could not detect here) play beneficial actions against metabolic disorders.

Concerning the gut microbiota results, the metataxonomic analysis performed here showed that only few differences could be induced by hemp seeds or lin seeds supplementation vs. the LFLS or HFHS diets. The paucity of the observed changes might be due to the fact that our control (LFLS) diet did not contain considerable amounts of fiber, as in typical chow diets. Thus, the amount of seed may have not been sufficient to overcome the changes induced by the experimental diets over chow. Alternatively, possibly contrasting effects of hemp seeds fiber, FA or protein contents may explain the little effect on fecal microbiota composition. Indeed, previously, dietary lin seeds oil was shown a decrease in *Firmicutes* abundance, that may attenuate diabetes via reducing *Firmicutes*-involved in energy absorption (403). This result is in line with the study of Jasmine Millman et al, who showed that lin seeds oil supplementation within a High Fat diet was able to improve the gut microbiota diversity as well as reducing the abundance of the Firmicutes phylum in black mice (404). Concerning the hemp seeds, a recent study of Xiang-Yong Li et al showed that Hemp seeds can improve the gut microbiota profile by decreasing the gut levels of *E. coli* and increasing the gut levels of *Bifidobacterium* and *Lactobacillum* species after 11 weeks of dietary intervention in mice (405). At any rate, we did see some changes at the family level,

where the *Clostridiaceae_1* was less abundant in Hemp vs Lin, and *Rikenellaceae* was more abundant in the Hemp and HFHS vs the LFLS group but the interpretation of these results seems difficult since there is not enough studies on these two families.

V. Conclusions

In conclusion, the results of this study suggest that lin seed supplementation of an HFHS has a negative impact on some metabolic and inflammatory parameters which are not observed when compared to Hemp seed supplementation; however, the eCBome modulation was similar with the two diets, even though Lin seeds contain 3 times more omega-3 FAs than the hemp seeds. Thus, hemp seed-containing foods might represent a source of healthy fats and effective nutrients that are not likely to exacerbate the metabolic consequences of the commonly consumed, obesogenic diets in western societies.

Chapitre 3 Omega-3 fatty acid supplementation *in vitro* results in the production of related endocannabinoidome mediators in 3T3-L1 adipocytes

Résumé

Contexte : Le SDA contourne l'étape limitante réalisée par l'enzyme $\Delta 6$ désaturase dans la voie métabolique de l'ALA à l'EPA ; ainsi, le SDA a été considéré comme un acide gras « pro-EPA ». D'un point de vue clinique, le SDA alimentaire est efficace pour augmenter les niveaux d'EPA et partage avec cet acide gras de nombreux effets biologiques bénéfiques en augmentant, en partie, l'indice d'oméga-3, qui est en corrélation avec un faible risque pour une variété de maladies cardiovasculaires. Les effets bénéfiques du SDA pourraient être dus à la modulation de l'eCBome. **Objectifs** : L'objectif était de vérifier si la SDEA et la 2-SDG peuvent être produits dans les adipocytes en présence de SDA. **Méthodes** : Les niveaux de différents acides gras ainsi que de N-acyléthanolamines et de monoacylglycérols ont été déterminés par LC-MS/MS. **Résultats** : le SDEA et le 2-SDG sont produits avec une augmentation significative à la fois dans les préadipocytes et les adipocytes matures traités par l'acide gras SDA. De plus, le SDA peut être converti en EPA ainsi qu'en son N-acyléthanolamine et son monoacylglycérol.

Abstract

Background: SDA bypasses the limiting step performed by the $\Delta 6$ desaturase enzyme in the ALA to EPA metabolic pathway; thus, SDA has been considered as a “pro-EPA” fatty acid. From a clinical perspective, dietary SDA is effective in increasing EPA levels and shares with this fatty acid many beneficial biological effects by increasing, in part, the omega-3 index, which correlates with a low risk for a variety of cardiovascular diseases. The beneficial effects of SDA may be due to modulation of the eCBome. **Objectives:** The objective was to test whether SDEA and 2-SDG can be produced in adipocytes incubated with SDA. **Methods:** The levels of different fatty acids as well as N-acylethanolamines and monoacylglycerols were determined by LC-MS/MS. **Results:** SDEA and 2-SDG are produced in preadipocytes and mature adipocytes following treatment with SDA. In addition, SDA can be converted to EPA as well as to the *N*-acylethanolamine and monoacylglycerol of this fatty acid.

I. Introduction

Stearidonic acid [SDA 18:4 (n-3)] is an omega-3 long-chain fatty acids, that is a metabolic intermediate between α -linolenic acid [ALA; 18:3 (n-3)] and eicosapentaenoic acid [EPA; 20:5 (n-3)] then docosahexaenoic acid [DHA; 22:6 (n-3)] (Figure 17). Between EPA and DHA there is an intermediary which is the docosapentaenoic acid [DPA; 22:5 (n-3)]. SDA bypasses the rate-limiting step carried out by the enzyme Δ 6 desaturase in the metabolic pathway from ALA to EPA; thus, SDA has been considered as a “pro-EPA” fatty acid (406). The Δ 6 desaturase enzyme, encoded by the *FADS2* gene, is a slow and rate-limiting enzyme, particularly in humans, in the conversion of the polyunsaturated fatty acid (PUFA) precursor α -linolenic acid (omega-3) and linoleic acid (omega-6) into their respective metabolites (402). In addition, this enzyme has a clear preference for omega-3 metabolism, but high dietary levels of omega-6 may shift its orientation to omega-6 conversion (407–409).

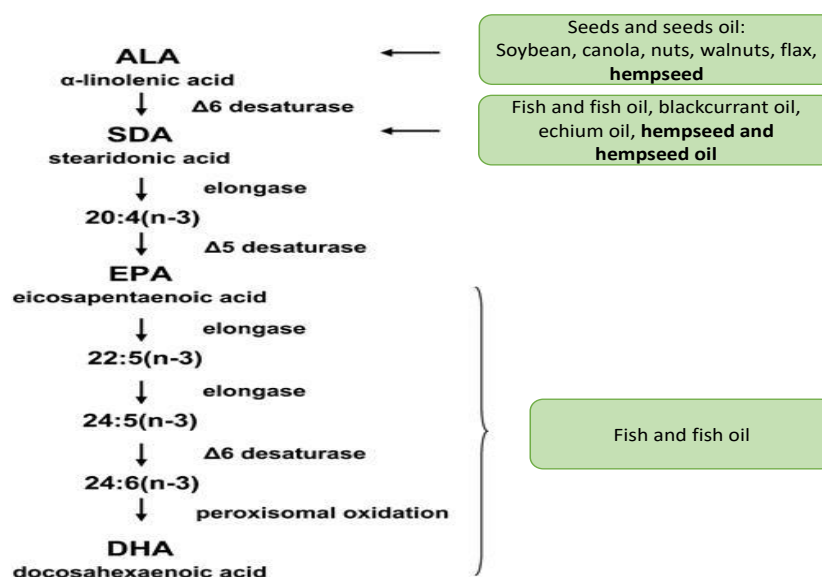


Figure 17: SDA metabolism and sources (inspired from Jay Whelan, 2009)

Cell phospholipids contain negligible levels of SDA (410), but once it enters the metabolic pathway after the Δ 6 desaturase step, it is rapidly converted to EPA, but not DHA, since it is the same-limiting enzyme is present between EPA and DHA. As such, dietary SDA consumption as ethyl esters, SDA-rich soybean oil or Echium Oil increased EPA levels in plasma, heart, neutrophil, and erythrocyte phospholipids by up to 5 times (411–414).

Clinically, dietary SDA is efficient in raising EPA levels (8-11) as well as sharing many of the beneficial biological effects by increasing, in part, the omega-3 index, which correlates with low risk for a variety of cardiovascular disease (416). Indeed, while not completely uncontroversial (417), a recent meta-analysis of 17 prospective cohort studies involving over 40,000 participants found a 15%-18% decrease in all-cause mortality in participants with the highest quintile as compared to the lowest quintile of circulating EPA, DPA and DHA levels, while no such association was found for ALA (418). It may be that the lack of positive effects in some studies may be due to differences in baseline levels of long chain (LC) omega-3 PUFAs, and it was suggested that future clinical trials may be able to observe significant effects by focusing on individual with lower baseline levels treated with EPA and DHA doses that significantly increase circulating levels of these fatty acids (FAs).

Increasing evidence supports the cardiometabolic health benefits of a diet rich in SDA as well as EPA and DHA. Both clinical and experimental studies showed that EPA and SDA are similarly able to reduce the inflammatory state by decreasing the release of inflammatory cytokine release such as prostaglandin E2 (PGE2) and tumour necrosis factor (TNF) α (419). Moreover, the supplementation of hypertriglyceridemic humans with SDA (1.88 g/day) was able to improve lipid metabolism by decreasing serum triacylglycerol concentration up to 21% compared with baseline (420). Additional studies have proved the beneficial roles of SDA; starting with Lolita M Forrest *et al* (421), who showed for the first time that supplemented diet with Echium Oil, which is rich in SDA, leads to a decrease in atherosclerosis compared with palm-oil fed mice and is similar to fish-oil fed mice in regard to atheroprotection. Terue Kawabata *et al* (422) also showed, a significant improvement in dyslipidemia with an SDA-enriched soybean oil diet by decreasing serum triacylglycerol levels in rats. Moreover, Echium oil was able to attenuate high-fat diet-induced hepatic steatosis (423). A clinical study by Kuhnt *et al* (424), demonstrated that daily consumption of 15 to 20 g of Echium oil increased EPA and DPA in the blood, and reduced cardiovascular risk markers, such as serum triglycerides. Another clinical study showed that the consumption of capsules containing 1000 mg of Echium seed oil during three weeks by asthma patients was able to suppress leukotriene production, consistent with reduced inflammation (425). Furthermore, oil enriched with SDA decrease the proliferation of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* (426). All these studies together suggest that SDA may

effectively improve metabolic syndrome and obesity as well as chronic diseases. It appears that SDA is directly able to regulate the process of adipogenesis as well. A recent *in vitro* study (427) showed that 200 μ M of SDA was able to inhibit adipocyte differentiation and reduce fat deposition in 3T3-L1 cells by down-regulating the expression and activity of certain adipogenesis transcriptional factors such as PPARG. Furthermore, the SDA treatment resulted in a significant increase in the level of EPA within 3T3-L1 adipocytes.

The major dietary source of SDA is seafood, such as mackerel, which contains up to 7% SDA (428). SDA is rarely found in commonly consumed seeds, vegetables, nuts, fruits, or commercial oils. However, Echium seed oil contains 9% to 16% of stearidonic acid (429), also, hemp seeds are an important source with 2% of SDA (430). Besides, our food chemistry analysis (see chapter 1) showed that the Finola Hemp seeds variety is rich in PUFAs with 24.6 g/100 g of which 5.53 g/100 g are omega-3. As mentioned in the previous chapter (see chapter 2), the eCBome is composed from the endocannabinoid system and other receptors, enzymes and mediators that the phospholipid precursors are a big family of FAs such as the SDA. Interestingly, our hemp seeds supplemented group showed an increase in SDA and its eCBome mediator $\frac{1}{2}$ stearidonoyl-glycerol ($\frac{1}{2}$ SDG) (but not Stearidonoyl-*N*-acylethanolamines (SDEA), which was not detected) in almost all the tissues tested, but particularly in the adipose tissue. These changes were found in conjunction with a slight improvement in metabolic parameters compared to the lin group.

These data, taken together with the above suggest that the SDA's beneficial metabolic effects may in part be due to the effects of SDA on adipose tissue biology, perhaps through the modulation of the process of adipogenesis and/or lipogenesis/lipolysis, which may be a result of SDA-mediated modulation of eCBome, including the increased production of SDA-derived eCBome mediators.

Problematic

Do 3T3-L1 preadipocytes and 3T3-L1 mature adipocytes produce SDEA and 1/2-SDG? If so, can supplementation with SDA increase the levels of these SDA-derived eCBome mediators?

Objective

To investigate the ability of 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes treated with omega-3 fatty acids or hemp seed and lin seed oil to produce their respective eCBome mediators.

Hypothesis

Omega-3 fatty acid-derived eCBome mediators levels will increase in 3T3-L1 cells in response to treatment with their respective FAs and that SDA treatment will increase the levels of EPA-derived eCBome mediators. Hemp seed oil, which is rich in SDA, will increase the levels of SDA in the cells as well as EPA-derived eCBome mediators.

II. Methods

- *Cell Culture*

3T3-L1 cells were a generous gift from Dr. Matthieu Laplante and were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% FBS. 3T3-L1 cells were treated with various fatty acids and oils.

To induce the differentiation of 3T3-L1 cells, the following procedure was used. **D0:** two days after reaching confluence, cells were exposed to an adipogenic cocktail containing growth medium (DMEM 4.5 g/l glucose, 10% fetal bovine serum) plus 1 µg/ml insulin (Sigma), 250 nM dexamethasone (Sigma), and 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) for 2 days. **D2:** After 2 days, the medium was changed to DMEM 4.5 g/l glucose, 10% FBS containing 1 mg/ml insulin alone for an additional 2 days. **D4:** After 4 days, the medium was changed to regular growth media and then changed every 2 days until **D8**. Differentiation was confirmed by visual examination of the cells, with greater than 80% having developed many lipid vacuoles.

- *Fatty Acid Treatment*

3T3-L1 adipocytes were treated with 200 µM of SDA, EPA and DHA free fatty acids (Cayman Chemicals, USA) as described in Li *et al* 2017 (427). The hemp seeds oil (MOISSONNERIES DU PAYS) treatment was performed in order to obtain a final concentration of 200uM SDA. As hemp seeds oil contains 2% SDA in, we added 0.31%

hemp oil in the media. The same percentage of linseed oil (FLORA) was used. All cell treatments lasted 24 hours. The treatment timing was 24h based on unpublished data in our lab showed that 24h fatty acid treatment was able to produce eCBome mediators *in vitro*. Cells were treated at d0 (preadipocytes) and d8 (mature adipocytes) and harvested on Day 1 and Day 9 respectively.

- *Lipid extraction and HPLC-MS/MS for the analysis of eCBome mediators*

The same protocols for lipid extractions and HPLC-MS/MS quantification of eCBome mediators as was used in Chapter 2 was utilized here; briefly, we scraped the adherent cells washed twice with PBS, in the solution PBS+LC-MS grade MeOH (methanol solution containing 0.1M acetic) (1:1), then we added 5 ng of deuterated standards. 1ml of chloroform was then added to each sample, which was then vortexed for 30 seconds and centrifuged at 3000×g for 5 minutes. The organic phase was collected and another 1 ml of chloroform was added to the inorganic one. This was repeated twice to ensure the maximum collection of the organic phase. The organic phases were pooled and evaporated under a stream of nitrogen and then suspended in 50 µl of mobile phase containing 50% of solvent A (water + 1 mM ammonium acetate + 0,05% acetic acid) and 50% of solvent B (acetonitrile/water 95/5 + 1mM ammonium acetate + 0.05% acetic acid). 40µl of each sample was finally injected into an HPLC column (Kinetex C8, 150 × 2.1mm, 2.6µm, Phenomenex) and eluted at a flow rate of 400 µl/min using a discontinuous gradient of solvent A and solvent B (379). Quantification of eCBome-related mediators was carried out by HPLC system interfaced with the electrospray source of a Shimadzu 8050 triple quadrupole mass spectrometer and using multiple reaction monitoring in positive ion mode for the compounds and their deuterated homologs.

- *Statistical analysis*

All the statistical analyses were performed using Graphpad prism (version 8.0.1) using one-way ANOVA.

III. Results and discussion

- *Levels of fatty acids within 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes in response to incubation with various fatty acids*

When comparing undifferentiated (control d1) to mature adipocytes (control d9) we did not detect differences in the cellular levels of any of the fatty acids. This suggests that as the lipogenic process is upregulated upon differentiation, there is no difference between the two, so that differentiation and lipid accumulation did not change the levels of free fatty acids. As expected, the omega-3 supplementation of the growth media significantly increased the levels of these FAs within the treated cells; SDA, EPA and DHA fatty acid levels increased, respectively, in the SDA, EPA and DHA-treated preadipocytes and adipocytes (Figure 18). These results are in line with the data of Li *et al* (427) who showed that SDA, EPA and DHA content increased significantly in adipocytes respectively treated with these fatty acids. Despite extensive washing of the cells, there exists a chance that the FA we detected in the LCMS was partially a result of contamination from the treatment media. However, we note that cells, for example, treated with SDA had significant increases in EPA, suggesting that the cells did in fact take up SDA and convert it to EPA.

As expected, we detected no changes with Hemp and Lin seed oil, except for an increase in LEA. This is unlikely due to the possible difficulties in emulsifying oils in the media even when using the sonication technic. In fact, oils contain fatty acids esterified in triglycerides and not as free acids, and this could have prevented the incorporation of the latter in preadipocytes or, particularly, adipocytes (and in their phospholipids) under our incubation conditions, as, *in vivo*, long chain fatty acids entering adipocytes are produced from triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in chylomicra (i.e., two components that were absent in our incubations) and triglycerides are not normally capable to be taken up by these cells. Nevertheless, our results confirm that *N*-acylethanolamines and, particularly, monoacylglycerols are not produced by adipocytes directly from exogenous triglycerides. The only apparent exception to this rule emerges from our experiments is the increase of LEA, which, however, could have been due to the likely presence of trace amounts of LA in both hemp and lin seed oil. Contamination with/presence of LA and AA in these two oils could also explain their slight stimulatory effects on 1/2-LG and 1/2-AG in adipocytes.

Unfortunately, we have not analyzed these oils for the presence of fatty acids, and this is certainly something that needs to be done next.

SDA resulted in significant increases in cellular levels of SDA in both preadipocytes and adipocytes, with higher levels found in SDA-treated adipocytes as compared to preadipocytes. Similarly, when incubated with EPA, EPA treatment of adipocytes resulting in significantly increase EPA levels as compared to both d9 controls and EPA-treated d1 preadipocytes. Interestingly, at d1 SDA treatment resulted in a significant increase for EPA production/levels while at d9 EPA treatment resulted in a significant increase for SDA production. In the same way, Docosapentaenoic Acid (DPA), which is an intermediate fatty acid between EPA and DHA, was higher in EPA treated group at day 1 and day 9 which prove the possibility of conversion from EPA to DPA in 3T3-L1 cells. These results can be explained by the fact that among the differences between a preadipocyte and an adipocyte is that a mature adipocyte has a higher enzymatic activity such as FAs desaturase which is responsible for the conversion of FAs (431,432). In fact, Jessica *et al* study (433) also showed that only 100 μ M of EPA treatment in mature adipocyte was able to increase significantly the DPA level. No group of our cells has been treated with arachidonic acid (AA) or the linoleic acid (LA) but AA levels were higher in SDA and EPA treated groups in adipocytes (d9) and the LA level was higher in the SDA/d9 treated group which can be a sign of non-purity of the SDA and EPA FAs; probably a low contamination of FAs with high enzymatic activity in mature adipocytes seems to be able to give significant elevations in LA at d9 which is likely converted into AA.

Finally, our results confirm that preadipocytes have significantly lower levels of fatty acids than mature adipocytes, clearly thanks to the high lipogenic and enzymatic capacity in the latter, except in the case of DPA in the EPA-treated group since it is the result of its conversion, thus following its proportions.

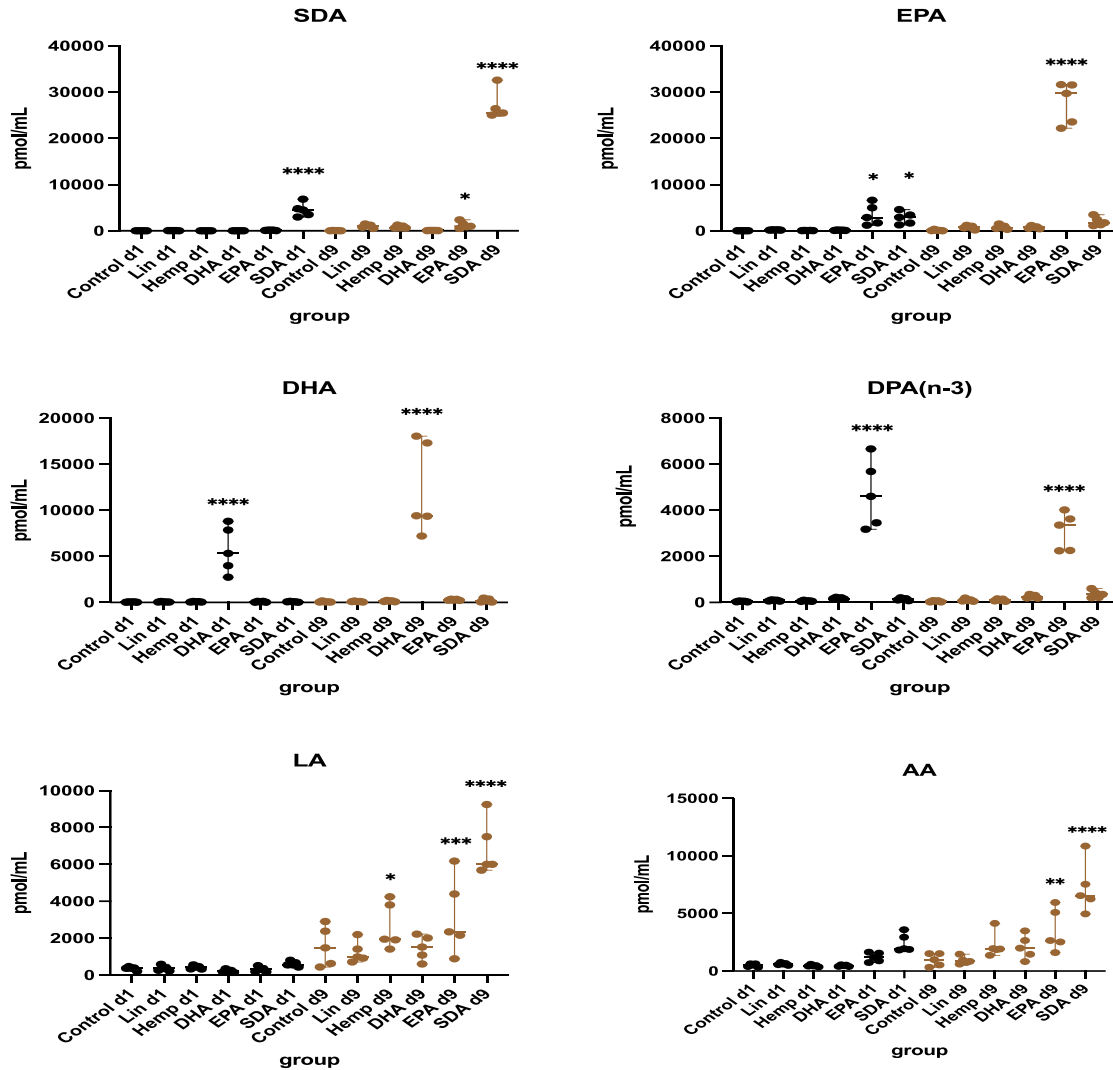


Figure 18: Fatty acid profiles in undifferentiated (d1) and differentiated (d9). 3T3-L1 cells were incubated for 24h with the indicated free fatty acid at 200 μ M or seed oil at 0.31% before lipids were extracted and quantified by "LC-MS/MS ». An n=5 was used for each treatment. The comparison made by the measured fatty acid level; **SDA:** ****(p<0.00001) SDA d9 vs all the groups and SDA d1 vs all the groups except SDA d9; * (p<0.05) EPA d9 vs all the groups at d1 and DHA, control at d9. **EPA:** ****(p<0.00001) EPA d9 vs all the groups; * (p<0.05) EPA d1 and SDA d1 vs Hemp d1, control d1 and control d9. **DHA:** ****(p<0.00001) DHA d9 vs all the groups and DHA d1 vs all the groups except DHA d9. **DPA:** ****(p<0.00001) EPA d1 vs all the groups and EPA d9 vs all the groups except EPA d1. **LA :** ****(p<0.00001) SDA d9 vs all the groups; *** (p<0.001) EPA d9 vs all the

groups at d1; * ($p < 0.05$) Hemp d9 vs all the groups at d1. **AA**: *****($p < 0.00001$) SDA d9 vs all the groups; ** ($p < 0.01$) EPA d9 vs all the groups at d1 and Lin, control at d9.

- *Levels of N-acylethanolamines within 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes in response to incubation with various fatty acids*

Again, we did not detect differences in the cellular levels of any of the *N*-acylethanolamines when comparing undifferentiated (control d1) to mature adipocytes (control d9). In the same way as the fatty acids, the omega-3 *N*-acylethanolamines SDEA, EPEA and DHEA increased in SDA, EPA and DHA preadipocyte and adipocyte treated groups respectively (Figure 19). Interestingly, the SDA that was able to be converted to EPA (Figure 18) increased significantly EPEA levels in undifferentiated (d1) and differentiated (d9) SDA-treated cells. Similarly, the EPA that was able to be converted to DPA (Figure 18), increased significantly the DPEA amount which is DPA *N*-acylethanolamines, in EPA treated group, knowing that the accumulation in preadipocytes was higher than adipocytes as the DPA was higher in preadipocyte than in mature adipocyte. Actually, the changes in the omega-3 *N*-acylethanolamines level are following the changes in the omega-3 FAs. These results are in line with a previous clinical study of our team (434) who showed that higher intakes of oleic acid as well as of EPA and DHA during the Mediterranean diet increased the levels of most omega-3-FA-derived eCBome mediators (i.e., EPEA, DHEA, 1/2-EPG and 1/2-DHG) as well as NAEs and 2-MAGs derived from oleic acid (i.e., OEA and 1/2-OG). Curiously, an experimental study (423) showed that SDA supplementation attenuated the hepatic steatosis caused by the high-fat diet, but unlike marine oils, it did not affect the levels of transcription factors involved in lipid metabolism, such as Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α) and Liver X Receptor α (LXR α), thus suggesting that it has a different mechanism of action from those observed for EPA and DHA. This beneficial effect can be through the eCBome mediators derived from SDA (i.e., SDEA and 1/2-SDG) since we hypothesize that the mediators of the eCBome modulate fat storage and distribution via their interventions on food intake, insulin sensitivity and lipogenesis, however, there are still not complete data on the activity and specificity of each mediator derived from omega-3 FA, as well as their

receptors in the context of the biology of the adipocyte. Exceptionally, the omega-6 derived *N*-acylethanolamines, AEA and LEA, did not follow the profiles of omega-6 FAs (Figure 18): for AEA levels, no significant difference was detected between the different groups and regarding LEA levels, we observed an increase in adipocytes and preadipocytes treated with SDA, Lin and Hemp, which confirm again that the eCBome mediators are not just related to FAs precursors but rather to the phospholipid-level changes (which will therefore need to be measured in future studies).

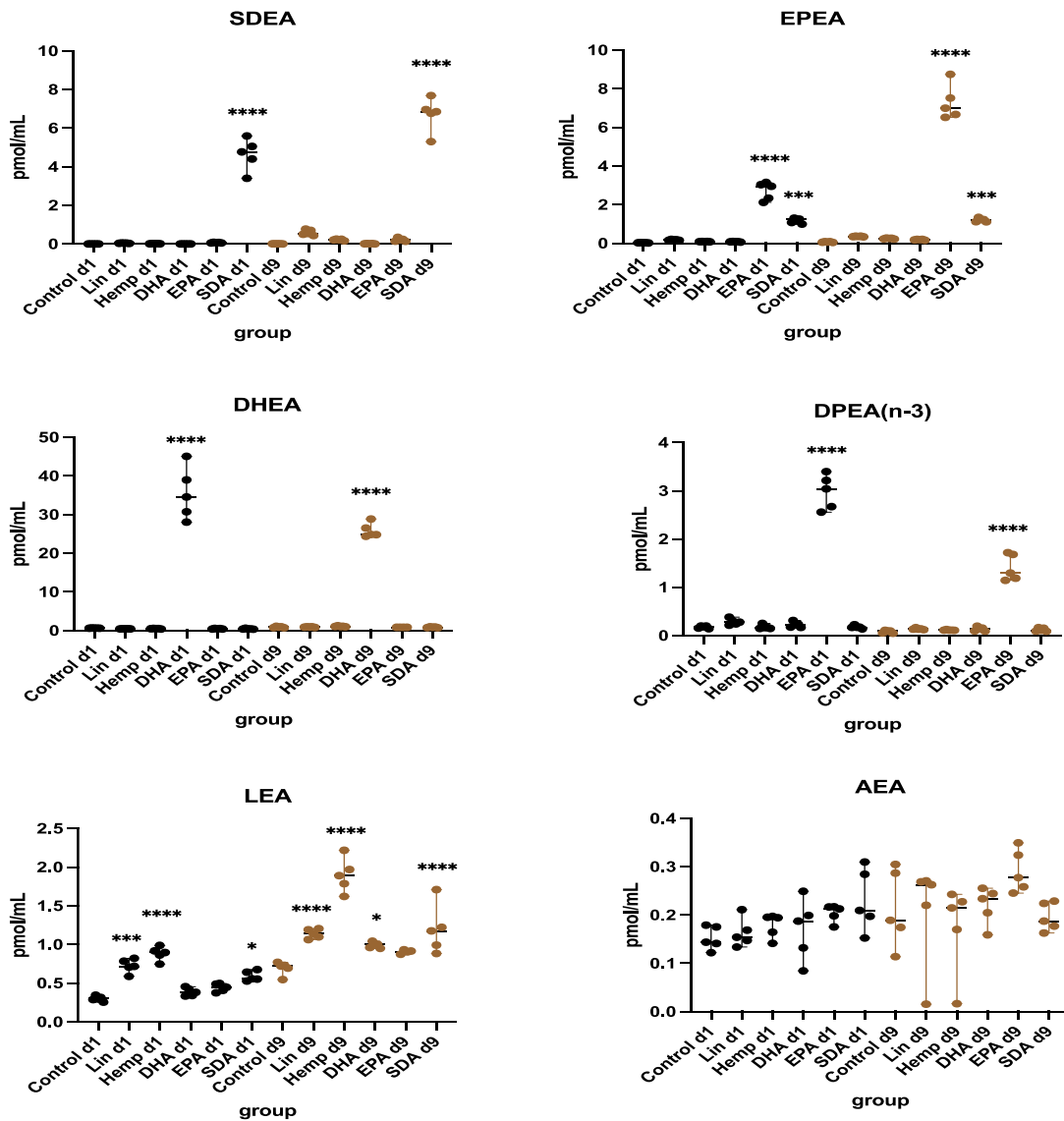


Figure 19: *N*-acylethanolamine profiles in undifferentiated (d1) and differentiated (d9) 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated for 24h with the indicated free fatty acid at 200 μ M or

seed oil at 0.31% before lipids were extracted and quantified by LC-MS/MS". An n=5 was used for each treatment. The comparison made by the measured *N*-acylethanolamines level; **SDEA**: *****(p<0.00001) SDA d9 vs all the groups and SDA d1 vs all the groups except SDA d9. **EPEA**: *****(p<0.00001) EPA d9 vs all the groups and EPA d1 vs all the groups except EPA d9; *****(p<0.001) SDA d9 vs all the groups except EPA d1 and EPA d9; SDA d1 vs all the groups except EPA d1, EPA d9 and SDA d9. **DHEA** : *****(p<0.00001) DHA d9 vs all the groups and DHA d1 vs all the groups except DHA d9. **DPEA**: *****(p<0.00001) EPA d1 vs all the groups and EPA d9 vs all the groups except EPA d1.

- *Levels of monoacylglycerols within 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes in response to incubation with various fatty acids*

No difference was detected in the cellular levels of any of the monoacylglycerols between the undifferentiated (control d1) and differentiated adipocytes (control d9). Similar to the effects observed on *N*-acylethanolamines, the omega-3 monoacylglycerol 1/2-SDG, 1/2-EPG and 1/2-DHG increased in SDA, EPA and DHA preadipocyte and adipocyte treated groups respectively with significantly higher levels detected in adipocytes compared to preadipocytes (Figure 20). Besides, the EPA was also able to be converted significantly to 1/2-EPG in SDA/d1 and SDA/d9 treated cells. This time, both EPA and SDA were able to convert to 1/2-DPG in EPA and SDA-treated adipocytes, respectively. Again, as shown in the recent study of our team, a diet rich in EPA and DHA can change the eCBome by increasing its own *N*-acylethanolamines and monoacylglycerols respectively, and concerning SDA rich diet, we saw in our previous work (chapter 2) an increase in SDA and 1/2-SDG in Hemp group but the amount or the period of the diet supplementation seems to be not enough to increase the SDEA biosynthesis. As opposite to omega-3 FA-derived monoacylglycerols, the profile of omega-6 FA-derived monoacylglycerols was not consistent between FAs and *N*-acylethanolamines: 1/2-LG and 1/2-AG, they increased in SDA- and EPA-treated adipocytes, which is related to the composition of the phospholipids, that seem to not have sufficient LA to be converted to AA and biosynthesize its own eCBome mediators in a stable

manner and thus normal given that the cells were not treated with LA and this is probably a contamination.

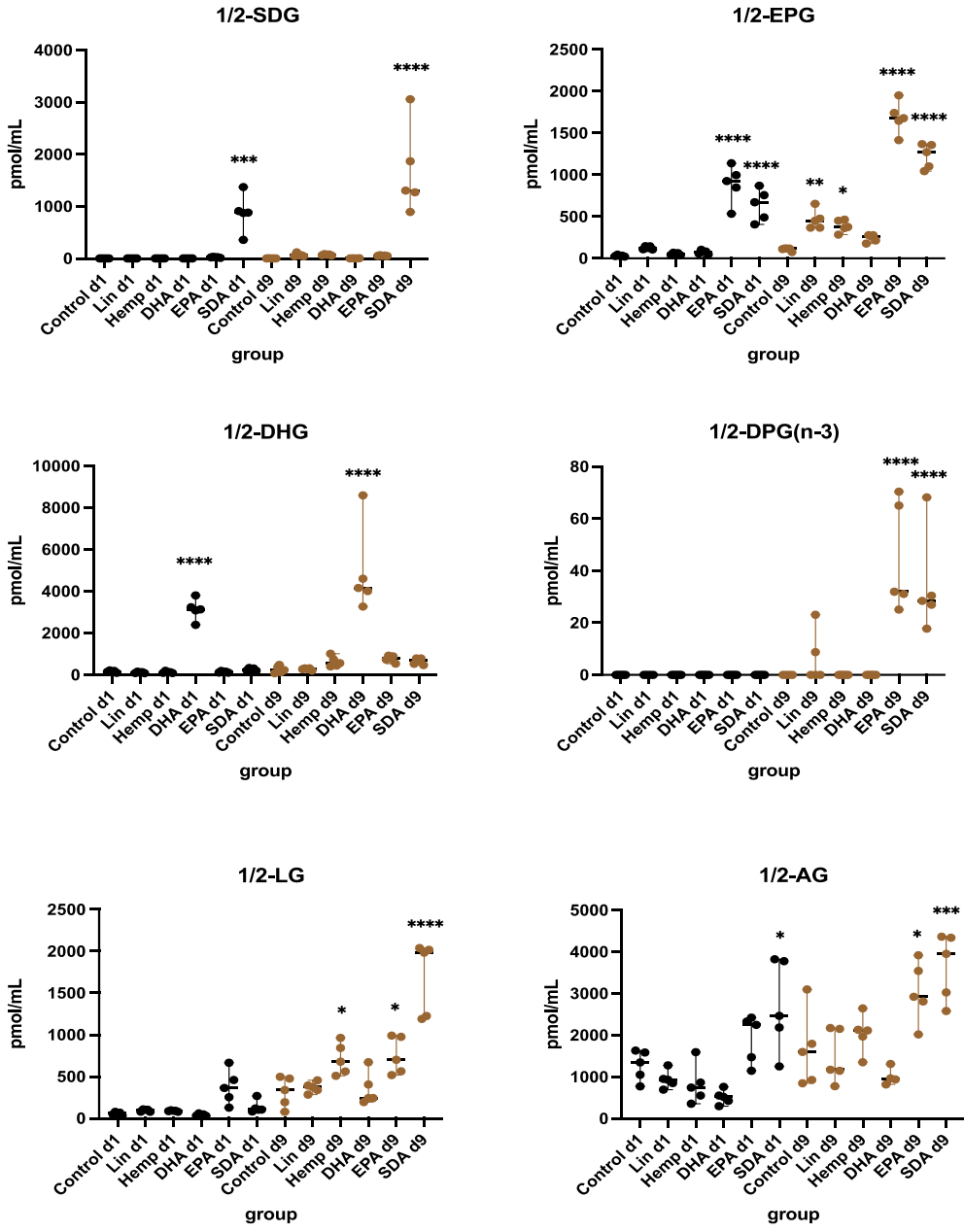


Figure 20: Monoacylglycerol profile in 3T3-L1 cells undifferentiated (d1) and differentiated (d9). 3T3-L1 cells were incubated for 24h with the indicated free fatty acid at 200 μ M or seed oil at 0.31% before lipids were extracted and quantified by LC-MS/MS". An n=5 was used

for each treatment. the comparison made by the measured Monoacylglycerol level; **1/2-SDG:** *****($p < 0.00001$) SDA d9 vs all the groups; *** ($p < 0.001$) SDA d1 vs all the groups except SDA d9. **1/2-EPG:** *****($p < 0.00001$) EPA d9 vs all the groups; *****($p < 0.00001$) SDA d9 vs all the groups except EPA d9; *****($p < 0.00001$) EPA d1 and SDA d1 vs all the groups except EPA and SDA at d9; ** ($p < 0.01$) Lin d9 vs cont at d1 and d9; * ($p < 0.05$) Hemp d9 vs cont at d1 and d9. **1/2-DHG:** *****($p < 0.00001$) DHA d9 vs all the groups and DHA d1 vs all the groups except DHA d9. **1/2-DPG:** *****($p < 0.00001$) EPA and SDA at d9 vs all the groups. **1/2-LG:** *****($p < 0.00001$) SDA d9 vs all the groups; * ($p < 0.05$) EPA and Hemp at d9 vs all the groups at d1. **1/2-AG:** ***($p < 0.001$) SDA d9 vs all the groups; * ($p < 0.05$) EPA d9 and SDA d1 vs all the groups except SDA d9.

IV. Conclusions

As expected and shown in Li Y et al study (427), the omega-3 precursors increased significantly in the treated cells. SDA can be converted to EPA as well as the cognate *N*-acylethanolamines and monoacylglycerols of these two fatty acids. Confirming our hypothesis, SDA incubation resulted in significant increases in both SDEA and 2-SDG in preadipocyte and mature adipocyte to higher levels at day 9, and mature adipocytes accumulated significantly more SDA in response to its addition to the culture media. These same observations were made for EPA and DHA. Thus, eCBome mediator levels can be modulated in adipocytes after a relatively short incubation with free FAs. To the best of our knowledge this the first time that the investigation of eCBome mediator production in response to omega-3 fatty acid incubation in 3T3-L1 cells has been reported.

Future work will be to see the direct effect of these mediators on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Additionally, we are conducting the same experiment in the HepG2 cell line (a cell line derived from liver tissue) and then we are planning to identify the specific receptors of the omega-3 eCBome mediators by using the Presto-Tango assay, which is a technique under development in our laboratory for targeting FA receptors. Finally, this work must be tested in vivo by enriching the diet with purified omega-3 FAs including SDA.

Discussion générale

Résumé des principaux résultats, discussion et perspective

Le passage d'un mode de vie traditionnel à un mode de vie moderne a entraîné des changements concomitants dans nos habitudes alimentaires. La consommation excessive d'aliments industrialisés a modifié l'équilibre des acides gras, tels qu'oméga-3 et oméga-6 et a été associé à une mauvaise santé cardiométabolique (26,27). Cette situation est attribuable à plusieurs facteurs, incluant la dérégulation de l'axe endocannabinoïdome-microbiome (260,261). Afin de préconiser des interventions nutritionnelles qui optimiseront l'état de santé de la population, il est crucial d'incorporer des aliments riches en oméga-3, étant donné qu'ils sont accessibles et abordables.

Les graines de chanvre entières bénéficient d'un profil nutritionnel intéressant. En effet, elles sont riches en oméga-3 dont le SDA, qui peut être converti en EPA. De plus, ces graines contiennent des protéines de qualité riches en acides aminés essentiels ; et sont également riches en vitamine E, en minéraux et en fibres. L'objectif de notre étude était d'évaluer les effets d'une supplémentation alimentaire en graines de chanvre entières, par rapport aux graines de lin, sur le développement des complications métaboliques dans un modèle de souris souffrant d'obésité induite par le régime alimentaire et de déterminer ses effets sur l'axe microbiome-endocannabinoïdome.

Dans un premier temps, nous avons étudié la composition nutritionnelle et cannabinoïde de deux variétés de graines de chanvre afin de choisir la meilleure. Par la suite, nous avons évalué les effets de la supplémentation alimentaire en graines de chanvre chez des souris C57BL/6J (traitées pendant 8 semaines). Dans ce but, les souris ont été réparties en 4 groupes expérimentaux : High Fat High Sucrose (HFHS) mixée avec les graines de chanvre et trois groupes de contrôle comprenant HFHS, HFHS mixée avec les graines de lin et Low Fat Low Sucrose (LFLS). Enfin, afin d'explorer le mécanisme qui pourrait expliquer notre observation *in vivo*, nous avons étudié la capacité des préadipocytes et des adipocytes 3T3-

L1 traités avec des acides gras oméga-3 ou des huiles de graines de chanvre et de graines de lin à produire leurs médiateurs eCBome respectifs.

La composition nutritionnelle des graines de chanvre Finola et X59

La culture du chanvre au Canada est en croissance continue avec plus de 77 000 acres utilisés pour sa production en 2018 (310). Le chanvre est utilisé dans plusieurs domaines tels que la production textile (fibres), les cosmétiques, la construction ainsi que la production de composés pharmaceutiques pertinents comme le CBD (311). Les graines de chanvre sont aussi utilisées pour l'alimentation humaine et animale, cependant, leurs compositions nutritionnelles changent considérablement d'une variété à une autre. Le chanvre est une ancienne culture asiatique qui est cultivée et exploitée depuis environ 10 000 ans (302), néanmoins, la qualité nutritionnelle de ces graines a récemment commencé à attirer l'attention des chercheurs scientifiques ainsi que des consommateurs (313). Les graines de chanvre sont aujourd'hui considérées comme l'une des sources alimentaires les plus complètes sur le plan nutritionnel. Le chanvre contient généralement 25-35 % de lipides avec une composition unique et équilibrée en acides gras (AG) ; 20-25 % de protéines facilement digestibles et riches en acides aminés essentiels et 20-30 % de glucides, dont une grande partie est constituée de fibres alimentaires, principalement insolubles ; ainsi que des vitamines et des minéraux (306). Notre partenaire industriel avait deux variétés de chanvre cultivées au Canada : Finola et X59. Afin de choisir la variété la plus riche en oméga-3, nous avons comparé la composition nutritionnelle et cannabinoïde de ces deux graines de chanvre.

Nos données démontrent que les deux variétés sont riches en macro et micronutriments dans des proportions souhaitées pour notre étude. En revanche, les graines de Finola s'avèrent être plus particulièrement prometteuses comparativement à la variété X59, grâce à une meilleure composition qualitative en macro et micronutriment, notamment en oméga 3. (tableau 1). Les oméga-3 sont des acides gras indispensables connus pour diminuer les taux de mortalité cardiovasculaire (349), améliorer la composition du microbiote intestinal (435) et moduler le système endocannabinoïde nécessaire pour le contrôle des troubles métaboliques. En effet, ils réduisent le niveau tissulaire d'endocannabinoïdes pouvant agir sur les récepteurs CB1 et

augmentent les molécules de type endocannabinoïde, qui ne sont pas médiées par les récepteurs CB1, et possédant une activité anti-inflammatoire (voir dessus) (436). De plus, il a été montré que le rapport des acides gras essentiels dans l'huile de chanvre est idéal pour favoriser la santé humaine : Oméga6/Oméga-3 est de 3,0/1 - 3,7/1, conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Par contre, dans l'huile de lin, il est de 1/3,6 avec presque trois fois plus d'oméga-3 (437). Nos analyses montrent que le taux d'acides gras oméga-3 totaux est plus élevé dans les graines Finola par rapport aux graines X59. De ce fait, nous avons choisi les graines Finola pour l'étude in vivo présentée au chapitre 2, vu que nous souhaitons évaluer l'effet de la supplémentation des graines de chanvre riche en oméga-3 mixées avec une diète obésogène sur la modulation d'axe endocannabinoïde-microbiome.

Tableau1 : Récapitulatif des résultats obtenus au Chapitre I pour la comparaison nutritionnelle entre les graines de Finola et X59

Parameter	Unit	RDL	X59	Finola
Protein	g/100 g	0,10	26,5	29,9
Ash	g/100 g	0,10	4,90	5,13
Carbohydrates	g/100g	0.5	35.7	29.8
Calories	kcal/100g	2	511	522
Saturated Fatty Acids	g/100g	0.10	2.43	2.45
Mono-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	3.42	2.94
Poly-unsaturated Fatty Acids	g/100g	0.10	21.9	24.6
C18:3n3c Linolenic Acid	g/100g	0.10	3.89	5.53
Calcium (Food)	mg/100g	5	106	107
Iron (Food)	mg/100 g	0,10	9,58	11,3
Sugars	g/100 g	0,10	1,36	1,12

RDL - Reported Detection Limit

Les analyses effectuées dans le chapitre 1 montrent la richesse qualitative et quantitative de ces graines en macro- et micronutriments, spécialement en oméga-3, protéines et fer. Ces nutriments sont indispensables pour le bon fonctionnement de l'organisme et c'est rare de les trouver ensemble dans un seul aliment d'origine végétale. Comme cité ci-dessus, les oméga - 3 sont essentiels pour la santé et la prévention des maladies et des complications métaboliques ; les protéines représentent un rôle structural dans les muscles, un rôle physiologique comme les enzymes et un rôle énergétique avec son apport calorique. Enfin, le fer est indispensable pour la constitution de l'hémoglobine qui ramène l'oxygène des poumons vers les cellules (438-440). En effet, nous avons tenté de doser la ferritine chez les souris dans notre expérimentation *in vivo* (chapitre 2), mais le seuil inférieur de détection était trop haut de façon que nous n'avons eu aucune détection de la ferritine dans le plasma des différents groupes. Néanmoins, il serait nécessaire de refaire le dosage de la ferritine avec une technique plus sensible afin de mieux étudier la biodisponibilité de fer dans les graines de chanvre, qui peuvent être extraites et utilisées par les végétariens en tant que supplément ferrique.

Plusieurs études montrent que la composition nutritionnelle des graines de chanvre diffère d'un pays à l'autre (318,319), voire entre les échantillons d'un même pays (320-322) : que se passerait-il, alors, si nous mesurons des graines provenant de différentes régions du Canada, avec des sols et des conditions de croissance différentes ?

Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas comparé les effets des deux types de graines de chanvre, et n'avons donc pas apporté la preuve que des compositions légèrement différentes pouvaient produire des effets métaboliques différents. Par conséquent, il pourrait être intéressant de répéter les analyses sur différents échantillons provenant de différentes régions du Canada afin de mieux caractériser leurs compositions nutritionnelles et de vérifier leur reproductibilité. De plus, les deux graines n'ont été analysées qu'une seule fois, ce qui constitue une limite pour cette étude, d'où l'intérêt de répéter l'analyse plusieurs fois sur différentes variétés.

Les effets de la supplémentation en graines de Finola sur le développement des troubles métaboliques ainsi que la modulation de l'axe endocannabinoïdome-microbiome

Notre hypothèse dans le chapitre 2 était « les graines de Finola amélioreront l'adiposité, les niveaux de glucose, d'acides gras, d'adipokines circulants et la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses en corrélation avec des niveaux circulants et tissulaires normalisés de médiateurs lipidiques de l'eCBome ainsi que des changements drastiques dans la composition du microbiote intestinal ». Cependant, nos résultats démontrent que la supplémentation en graines de Finola mixées avec une diète HFHS ne favorise pas une amélioration métabolique ni inflammatoire chez des souris C57BL/6J en comparaison avec le groupe de référence HFHS sauf la perméabilité intestinale qui a diminué significativement, au 30 min, dans le groupe du chanvre. Néanmoins, la supplémentation en graines de chanvre a démontré une légère amélioration du profil métabolique et inflammatoire par rapport aux graines de lin et en comparaison avec le groupe de contrôle LFLS. En termes de mesures anthropométriques, après 8 semaines d'introduction du régime, les groupes lin et HFHS avaient les niveaux de graisse corporelle les plus élevés tandis que le groupe chanvre avait le niveau le plus bas par rapport au groupe LFLS, sachant que le groupe chanvre n'était pas significativement différent du groupe HFHS ou lin. Pour la consommation alimentaire, à la semaine 8, le groupe chanvre a commencé à consommer significativement moins d'énergie que le groupe lin. Concernant le glucose, la leptine et le PAI-1 dosés après 12 h du jeûne, uniquement le groupe lin et HFHS ont eu une augmentation significative par rapport le LFLS. De même, pour le poids du foie, TG hépatique, TNF α (dans l'EPAT) et IL-10 (dans l'EPAT), seul le groupe de lin a eu une augmentation significative par rapport le groupe LFLS. Bien que le groupe HFHS soit le groupe de référence qui nous permet de spécifier l'effet des différentes graines de manière indépendante, le groupe LFLS est également un groupe de contrôle représentant les souris saines et nous ne pouvons pas négliger les différences observées entre les différents groupes en ce qui concerne ces dernières. Par conséquent, nous pouvons signaler que, au moins dans nos conditions expérimentales, les graines de Finola semblent avoir une tendance générale vers un effet protecteur légèrement plus fort contre un régime obésogène que les graines de lin ; ainsi, la quantité de chanvre ou la période d'intervention n'étaient probablement pas suffisantes pour avoir un effet plus prononcé et encore significativement différent du groupe lin ou HFHS.

Plusieurs études ont reporté l'effet bénéfique de l'huile de chanvre sur la santé ; par exemple, une supplémentation quotidienne avec 30 ml d'huile de graines de chanvre est capable de produire des effets cardiométaboliques bénéfiques (294). De même, Demizieux L et collaborateurs ont montré que 5 % d'huile de lin mixé avec du saindoux était suffisant pour obtenir un effet bénéfique sur les paramètres métaboliques (237). Pour les graines de chanvre, une première étude rapportée par Paulina M Opyd et al (389) a montré que les graines de chanvre étaient plus efficaces que l'huile de chanvre pour réguler le métabolisme lipidique chez les rats Zucker obèses. En revanche, dans notre étude, la supplémentation en graines de chanvre n'a pas montré des effets bénéfiques remarquables sur les paramètres métaboliques, au moment où, la supplémentation en graines de lin s'est avérée plus nocive. La faible efficacité de la supplémentation en graines de lin contre les effets d'un régime riche en graisses a également été rapportée par Siti Raihanah Shafie et al (390), qui ont montré que les graines de lin entières sont moins efficaces que ses composants pour inverser le syndrome métabolique induit par le régime alimentaire chez les rats. Ceci montre que l'efficacité de la graine de lin varie d'un composant à l'autre (huile, graine, farine...). Alors, est-il possible que la graine de chanvre présente la même variabilité ? Et si c'est le cas, quel est le composant le plus efficace du chanvre ? Par ailleurs, la quantité de chanvre semble, elle aussi, insuffisante pour favoriser les améliorations métaboliques sachant que cette quantité a été fixée afin de mimer une étude clinique en consommant l'équivalent de deux cuillères à soupe de Finola. D'où l'intérêt de reprendre l'expérimentation en augmentant la quantité des graines administrées (en utilisant différents composants) ainsi que la période d'intervention. Le système endocannabinoïde (ECS) se constitue des endocannabinoïdes (eCBs) AEA et 2-AG qui activent les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 ainsi que leurs enzymes anabolisantes et catabolisantes (135,136). Le système endocannabinoïde joue un rôle central et périphérique en diminuant le métabolisme et en augmentant le stockage d'énergie dans plusieurs organes. Le dérèglement de l'ECS, plus spécifiquement l'hyperstimulation et l'hyperactivation de récepteur CB1, est associé à une augmentation de l'adiposité, de la stéatose hépatique, de la dyslipidémie et de la résistance à l'insuline (151). Un régime obésogène, riche en oméga-6 et pauvre en oméga-3, augmente les niveaux des endocannabinoïdes. Par contre, la supplémentation en AG oméga-3 à un régime riche en oméga-6 inverse ces changements (228), en réduisant de manière significative les niveaux

d'AEA dans le foie et en améliorant l'homéostasie du glucose (237). L'eCBome, qui est un ECS élargi, se compose de l'ECS ainsi que d'autres médiateurs, récepteurs et enzymes où nous trouvons des médiateurs dont leurs précurseurs sont des oméga-3 comme SDEA, EPEA et DHEA. Ces médiateurs ont une affinité de liaison pour les récepteurs CB1 beaucoup plus faible (238,240). En fait, SDEA, EPEA et DHEA partagent les mêmes voies de production et de dégradation que l'AEA, ce qui entraîne une compétition entre l'EPEA, le DHEA et l'AEA. Cette compétition peut être affectée en modifiant le rapport alimentaire oméga-6/oméga-3, modulant ainsi la proportion d'éthanolamides dérivés des AG oméga-6 et oméga-3 (223,241,242). La SDEA n'a pas été testée auparavant, mais nous nous attendons à ce qu'elle ait les mêmes effets et le même mécanisme d'action que l'EPEA et la DHEA (voir les chapitres 2 et 3).

Ces données bibliographiques nous ont amenés, donc, à tester l'effet des graines de chanvre riche en oméga-3 (dont le SDA) sur la modulation de l'eCBome en comparaison avec le groupe contrôle positif : le groupe des graines de lin (étant 3 fois plus riche en oméga-3). Nos résultats ont montré que les deux graines modulent sensiblement l'eCBome par une augmentation des médiateurs dérivés des AG oméga-3 et une diminution des médiateurs dérivés des AG oméga-6, surtout dans le tissu adipeux, comparativement aux deux groupes de contrôle LFLS et HFHS. En fait, il existe une compétition entre les précurseurs des AG oméga-6 et oméga-3 dans la production des médiateurs de l'eCBome correspondants, tels que les NAE et les 2-MAG. Par conséquent, plus l'apport d'AG oméga-6 et de leurs précurseurs tels que l'LA est élevé, plus ces AG seront estérifiés en phospholipides à partir desquels les NAE et les 2-MAG sont biosynthétisés, et vice versa pour les AG oméga-3 alimentaires et leurs précurseurs tels que l'ALA (225) et SDA (voir chapitre 3). Ainsi, le chanvre et les graines de lin semblent moduler l'eCBome d'une manière qui réduit son activité au niveau des récepteurs CB1 et augmente son activité au niveau d'autres récepteurs de l'eCBome, comme les canaux TRPV1, les PPAR, GRP119 et CB2. De manière intéressante, le SDA et les MAGs correspondants, 1(3)- ou 2-SDG, étaient significativement augmentés dans le groupe chanvre par rapport à tous les autres groupes dans les différents tissus, et particulièrement dans le tissu adipeux et l'iléon. En outre, le chanvre a diminué la perméabilité intestinale avec une inhibition de l'augmentation significative du PAI-1 dans le plasma, ce qui conduirait à une diminution de l'inflammation puisque le LPS induit le PAI-

1 et l'inflammation dans le tissu adipeux (441). L'ensemble de ces résultats suggère que les médiateurs eCBome dérivés de la SDA inhibent le profil inflammatoire défavorable du tissu adipeux dans le groupe chanvre par rapport au groupe lin. De futures études devraient examiner cette possibilité.

En ce qui concerne les résultats du microbiote intestinal, l'analyse métataxonomique réalisée n'a montré aucune différence importante qui pouvait être induite par la supplémentation en graines de chanvre ou en graines de lin par rapport aux régimes LFLS ou HFHS. Les résultats ont montré seulement deux changements au niveau des familles lorsque nous avons comparé la composition du microbiote intestinal des différents compléments alimentaires à la semaine 8 : Clostridiaceae_1 était moins abondant dans le groupe chanvre vs lin, et Rikenellaceae était plus abondant dans le groupe chanvre et HFHS vs LFLS. Toutefois, l'interprétation de ces résultats semble difficile, car il n'y a pas assez d'études sur ces deux familles. En conclusion, la rareté des changements observés pourrait être due à la quantité insuffisante des différentes graines.

La supplémentation en acides gras oméga-3 in vitro dans les adipocytes 3T3-L1

Étant donné que la principale différence entre les deux traitements étudiés au chapitre 2 était la présence de quantités plus élevées de SDA dans les graines de chanvre, on a commencé par vérifier si SDEA et 2-SDG peuvent être produits dans les adipocytes en présence du SDA. Les résultats du chapitre 3 montrent que le SDEA et le 2-SDG sont produits avec une augmentation significative à la fois dans les préadipocytes et les adipocytes matures traités par l'acide gras SDA. De même, le SDA peut être converti en EPA ainsi qu'en son N-acyléthanolamine et son monoacylglycérol. D'une part, ces résultats démontrent que les préadipocytes et les adipocytes 3T3-L1 traités uniquement avec des acides gras oméga-3 étaient capables de produire leurs médiateurs eCBome respectifs et que le SDA était capable de se convertir en EPA ainsi que leurs médiateurs. D'autre part, ces résultats expliquent, la présence des quantités plus élevées d'éthanolamides et de monoacylglycérols dérivés d'AG oméga-3 dans les régimes supplémentés en graines de chanvre et de lin ainsi que des niveaux plus faibles d'anandamide et de 2-AG. Malgré le lavage intensif des cellules, il est possible que l'AG que nous avons détecté dans le LCMS soit en partie le résultat de la contamination

du milieu de traitement. Cependant, nous notons que les cellules traitées avec de la SDA ont connu une augmentation significative de l'EPA, ce qui suggère que les cellules ont effectivement absorbé de la SDA et l'ont convertie en EPA.

D'un point de vue clinique, le SDA alimentaire est efficace pour augmenter les niveaux d'EPA et partage avec cet acide gras de nombreux effets biologiques bénéfiques en augmentant, en partie, l'indice d'oméga-3, qui est en corrélation avec un faible risque pour une variété de maladies cardiovasculaires (416). Les effets bénéfiques du SDA peuvent être grâce à la modulation de l'eCBome. Il sera donc important de voir l'effet direct de ces médiateurs eCBome sur l'accumulation de lipides dans les adipocytes 3T3-L1 (et d'autres lignées cellulaires) sachant qu'à notre connaissance, notre étude est la seule à avoir étudié la production de médiateurs eCBome avec l'incubation d'acides gras oméga-3. Les données présentées dans cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pour le traitement du syndrome métabolique, car ces médiateurs sont censés être efficaces pour prévenir les complications métaboliques causées par un régime riche en graisses.

Conclusion générale

Cette thèse apporte donc une contribution originale à l'avancement des connaissances dans le domaine de la nutrition et de la santé. Les résultats de cette recherche fondamentale ouvrent la voie à d'autres études précliniques pour établir avec plus de confiance la supériorité potentielle des graines de chanvre par rapport à d'autres sources équivalentes d'acides gras oméga-3 dans le traitement des troubles métaboliques et de l'inflammation systémique du tissu adipeux qui y est associée. L'élaboration de nouveaux aliments riches en oméga-3 et avec une composition nutritionnelle intéressante, comme les « graines de chanvre », pourrait contribuer à prévenir l'obésité et les troubles cardiométaboliques associés en modulant l'eCBome. De plus, ces résultats sont très utiles pour le développement prochain d'une étude préclinique sur les effets de la SDA extraite des graines de chanvre.

Bibliographie

1. World Health Organization (WHO). Malnutrition [Internet] 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.
2. Elia M, editor. Guidelines for detection and management of malnutrition. Malnutrition Advisory Group, Standing Committee of BAPEN. Maidenhead: BAPEN, 2000.
3. Kruger HS, Puoane T, Senekal M, van der Merwe MT. Obesity in South Africa: Challenges for government and health professionals. *Public Health Nutrition*. 2005;8(5):491-500. DOI: 10.1079/PHN2005785.
4. Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world—A growing challenge. *The New England Journal of Medicine*. 2007;356:3. DOI: 10.1056/NEJMp068177.
5. Lau DCW, Douketis JD, Morrison KM, Hramiak IM, Sharma AM, Ur E. 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children (summary). *Canadian Medical Association Journal*. 2007;176(8):S1-S13. DOI: 10.1503/cmaj.061409.
6. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.
7. Roncari DA, Lau DC, Kindler S. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism*. 1981 May;30:425-7.
8. Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J*. 2012;59(10):849-57. doi: 10.1507/endocrj.ej12-0271. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22878669.
9. Brennan L, Walkley J, Fraser SF, Greenway K, Wilks R. Motivational interviewing and cognitive behaviour therapy in the treatment of adolescent overweight and obesity: Study design and methodology. *Contemporary Clinical Trials*. 2008;29:359-375. DOI: 10.1016/j.cct.2007.09.001.
10. Faucher, P., Cherifi, B. G., Poitou, C., & Neurocentre Magendie, I. (2017). Dénutrition chez le sujet obèse. *MCED*, 86, 23-29.
11. Raynaud-Simon, A., Sanchez, M., & Quilliot, D. (2017). Dénutrition chez le sujet âgé obèse. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(4), 282-289.
12. Kyung Mook Choi, *Korean J Intern Med*. 2016 Nov; 31(6): 1054–1060. Published online 2016 Nov 1. doi: 10.3904/kjim.2016.193.
13. F.Z. Zaher, G. Elmghari, N. Elansari, Y. Zemrani, L. Chabaa, Statut martial chez les sujets obèses, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, Volume 30, Issue 3, 2016, Page 267, ISSN 0985-0562, <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2016.09.104>.
14. Aboussaleh, Y., Farsi, M., EL Hioui, M. et al. Anemia and obesity coexist among women of reproductive age in north west of Morocco. *Mediterr J Nutr Metab* 5, 213–217 (2012). <https://doi-org.acces.bibl.ulaval.ca/10.1007/s12349-012-0096-9>.
15. World Health Organization (WHO). Daily iron and folic acid supplementation during pregnancy [Internet] 2021. Available from: https://www.who.int/elena/titles/guidance_summaries/daily_iron_pregnancy/en/.
16. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Fats: Total Fat and Fatty Acids. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, D.C.: National Academies Press; 2002:422-541.

17. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016;8(3):128. Published 2016 Mar 2. doi:10.3390/nu8030128.
18. Simopoulos A.P. Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. In: Hamazaki T., Okuyama H., editors. *Fatty Acids and Lipids—New Findings*. Volume 88. Karger; Basel, Switzerland: 2001. pp. 18–27.
19. Kang J.X. The importance of omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cell function. The gene transfer of omega-3 fatty acid desaturase. In: Simopoulos A.P., Cleland L.G., editors. *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence*. Volume 92. Karger; Basel, Switzerland: 2003. pp. 23–36.
20. Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res*. 1998;68(3):159-73. PMID: 9637947.
21. Meyer, B.J., Mann, N.J., Lewis, J.L., Milligan, G.C., Sinclair, A.J. and Howe, P.R.C. (2003), Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 38: 391-398. <https://doi-org.acces.bibl.ulaval.ca/10.1007/s11745-003-1074-0>.
22. A.P Simopoulos, Genetic variation and evolutionary aspects of diet A Papas (Ed.), *Antioxidants in nutrition and health*, CRC Press, Boca Raton (1999), pp. 65-88.
23. S.B Eaton, M Konner Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications *New Engl J M*, 312 (1985), pp. 283-289.
24. Harris WS. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor. *Pharmacol Res*. 2007 Mar;55:217-23.
25. Jane Higdon et al, *Essential Fatty Acids* Linus Pauling Institute, 203-2001, available on <https://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids#authors-reviewers>.
26. Birch E.E., Hoffman D.R., Castañeda Y.S., Fawcett S.L., Birch D.G., Uauy R.D. A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. *Am. J. Clin. Nutr*. 2002;75:570–580.
27. Guesnet P., Pugo-Gunsam P., Maurage C., Pinault M., Giraudeau B., Alessandri J.M., Durand G., Antoine J.M., Couet C. Blood lipid concentrations of docosahexaenoic and arachidonic acids at birth determine their relative postnatal changes in term infants fed breast milk or formula. *Am. J. Clin. Nutr*. 1999;70:292–298.
28. Thorsdottir I., Tomasson H., Gunnarsdottir I., Gisladdottir E., Kiely M., Parra M.D., Bandarra N.M., Schaafsma G., Martínéz J.A. Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *Int. J. Obes*. 2007;31:1560–1566. doi: 10.1038/sj.ijo.0803643.
29. Kabir M., Skurnik G., Naour N., Pechtner V., Meugnier E., Rome S., Quignard-Boulangé A., Vidal H., Slama G., Clément K., et al. Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: A randomized controlled study. *Am. J. Clin. Nutr*. 2007;86:1670–1679.
30. Parra D., Ramel A., Bandarra N., Kiely M., Martinez J.A., Thorsdottir I. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. *Appetite*. 2008;51:676–680. doi: 10.1016/j.appet.2008.06.003.
31. Couet C., Delarue J., Ritz P., Antoine J.M., Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 1997;21:637–643. doi: 10.1038/sj.ijo.0800451.
32. Krebs J.D., Browning L.M., McLean N.K., Rothwell J.L., Mishra G.D., Moore C.S.,

- Jebb S.A. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int. J. Obes.* 2006;30:1535–1544. doi: 10.1038/sj.ijo.0803309.
33. Kunesova M., Braunerová R., Hlavatý P., Tvrzická E., Stanková B., Skrha J., Hilgertová J., Hill M., Kopecký J., Wagenknecht M., et al. The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol. Res.* 2006;55:63–72.
 34. Kang J.X., Wang J., Wu L., Kang Z.B. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature.* 2004;427:504. doi: 10.1038/427504a.
 35. Simopoulos A.P. The importance of the omega-6/omega-3 Fatty Acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 2008;233:674–688. doi: 10.3181/0711-MR-311.
 36. Kromann N., Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950–1974. *Acta Med. Scand.* 1980;208:401–406. doi: 10.1111/j.0954-6820.1980.tb01221.x.
 37. Adler A.I., Boyko E.J., Schraer C.D., Murphy N.J. Lower prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes associated with daily seal oil or salmon consumption among Alaska Natives. *Diabetes Care.* 1994;17:1498–1501. doi: 10.2337/diacare.17.12.1498.
 38. Schraer C.D., Risica P.M., Ebbesson S.O., Go O.T., Howard B.V., Mayer A.M. Low fasting insulin levels in Eskimos compared to American Indians: are Eskimos less insulin resistant? *Int. J. Circumpolar Health.* 1999;58:272–280.
 39. Correia-Branco A, Keating E, Martel F. Maternal undernutrition and fetal developmental programming of obesity: the glucocorticoid connection. *Reprod Sci.* 2015; 22(2): 138- 145.
 40. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 185(1-2): 93- 98.
 41. Gonzalez-Bulnes A, Astiz S, et al. Nature and Nurture in the Early-Life Origins of Metabolic Syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(7):573-86.
 42. Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harslof LB, Ciappolino V, Agostoni C. DHA Effects in brain development and function. *Nutrients.* 2016; 8(1): 1- 17.
 43. Salem N Jr, Pawlosky R, Wegher B, Hibbeln J. In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999; 60(5-6): 407- 410.
 44. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr.* 2012; 3(1): 1- 7.
 45. Bernard JY, De Agostini M, Forhan A, de Lauzon-Guillain B, Charles MA, Heude B. The dietary n6:n3 fatty acid ratio during pregnancy is inversely associated with child neurodevelopment in the EDEN mother-child cohort. *J Nutr.* 2013; 143(9): 1481- 1488.
 46. Muhlhausler BS, Ailhaud GP. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 20(1): 56- 61.
 47. Jain AP, Aggarwal KK, Zhang PY. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(3): 441- 445.
 48. Heerwagen MJ, Stewart MS, de la Houssaye BA, Janssen RC, Friedman JE. Transgenic increase in N-3/n-6 Fatty Acid ratio reduces maternal obesity-associated inflammation and limits adverse developmental programming in mice. *PLoS ONE.* 2013;

8(6):e67791.

49. Ritchie K, Carriere I, Berr C, et al. The clinical picture of Alzheimer's disease in the decade before diagnosis: clinical and biomarker trajectories. *J Clin Psychiatry*. 2016;77(3):e305-e311.
50. Patel, V. 2016, Office of National Statistics. Deaths registered in England and Wales (Series DR): 2015. Available: <https://www.ons.gov.uk> [2017, 3/15].
51. Doody RS, Farlow M, Aisen PS, Alzheimer's Disease Cooperative Study Data Analysis and Publication Committee. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014;370(15):1460.
52. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*. 2014;13(8):788-794.
53. Chew EY, Clemons TE, Agron E, Launer LJ, Grodstein F, Bernstein PS, et al. Effect of omega-3 fatty acids, lutein/zeaxanthin, or other nutrient supplementation on cognitive function: the AREDS2 randomized clinical trial. *JAMA* 2015;314:791-801.
54. Tully AM, Roche HM, Doyle R, Fallon C, Bruce I, Lawlor B, et al. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* 2003;89:483-9.
55. Yassine HN, Feng Q, Azizkhanian I, Rawat V, Castor K, Fonteh AN, et al. Association of serum docosahexaenoic acid with cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol* 2016.
56. Dangour AD, Whitehouse PJ, Rafferty K, Mitchell SA, Smith L, Hawkesworth S, et al. B-vitamins and fatty acids in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and dementia: a systematic review. *J Alzheimers Dis* 2010;22:205-24.
57. Sydenham E, Dangour AD, Lim WS. Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;6:CD005379.
58. Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683–692.
59. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9–29.
60. Harnack, L., Block, G., Subar, A., Lane, S., & Brand, R. (1997). Association of cancer prevention-related nutrition knowledge, beliefs, and attitudes to cancer prevention dietary behavior. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(9), 957–965.
61. Beaglehole, R., Bonita, R., & Magnusson, R. (2011). Global cancer prevention: an important pathway to global health and development. *Public Health*, 125(12), 821–831.
62. Manca, A., Asseburg, C., Bravo Vergel, Y., Seymour, M. T., Meade, A., Stephens, R., et al. (2012). The cost-effectiveness of different chemotherapy strategies for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS). *Value in Health*, 15(1), 22–31.
63. Sher, D. J., Wee, J. O., & Punglia, R. S. (2011). Cost-effectiveness analysis of stereotactic body radiotherapy and radiofrequency ablation for medically inoperable, early-stage non-small cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(5), e767–e774.
64. Grady, W. M., & Markowitz, S. D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3(1), 101–128.
65. Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5258–5265.
66. Boffetta, P., Boccia, S., & La Vecchia, C. (2014). Overview of the major causes of human cancer. In *A quick guide to cancer epidemiology* (pp. 77-88): Springer.

67. Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835), 390–395.
68. Gerber, M. (2012). Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. *The British Journal of Nutrition*, 107(Suppl 2), S228–S239.
69. Berquin, I. M., Edwards, I. J., Kridel, S. J., & Chen, Y. Q. (2011). Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 30(3-4), 295–309.
70. Terry, P., Lichtenstein, P., Feychting, M., Ahlbom, A., & Wolk, A. (2001). Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *The Lancet*, 357(9270), 1764–1766.
71. Szymanski, K. M., Wheeler, D. C., & Mucci, L. A. (2010). Fish consumption and prostate cancer risk: a review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 92(5), 1223–1233.
72. Turunen, A. W., Suominen, A. L., Kiviranta, H., Verkasalo, P. K., & Pukkala, E. (2014). Cancer incidence in a cohort with high fish consumption. *Cancer Causes & Control*, 25(12), 1595–1602.
73. Rohrmann, S., Linseisen, J., Nöthlings, U., Overvad, K., Egeberg, R., Tjønneland, A., et al. (2013). Meat and fish consumption and risk of pancreatic cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer*, 132(3), 617–624.
74. Wu, S., Feng, B., Li, K., Zhu, X., Liang, S., Liu, X., et al. (2012). Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 125(6), 551–559.
75. Larsson, S. C., 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 935–945.
76. MacLean, C. H., Newberry, S. J., Mojica, W. A., Khanna, P., Issa, A. M., Suttorp, M. J., et al. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA*, 295(4), 403–415.
77. Hooper, L., Thompson, R. L., Harrison, R. A., Summerbell, C. D., Ness, A. R., Moore, H. J., et al. (2006). Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ*, 332(7544), 752–760.
78. Rose, D. P., & Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 83(3), 217–244.
79. Larsson, S. C., 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 935–945.
80. Hardman, W. E. (2004). (n-3) fatty acids and cancer therapy. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3427S–3430S.
81. A Kratz, A Campos-Neto, M S Hanson, N H Ruddle; Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis.. *J Exp Med* 1 April 1996; 183 (4): 1461–1472. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1461>.
82. Heinonen, M. V., Laaksonen, D. E., Karhu, T., Karhunen, L., Laitinen, T., Kainulainen, S., Rissanen, A., Niskanen, L. and Herzig, K. H. (2009). Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr.Metab.Cardiovasc.Dis.* 19:626–633.
83. Rasmussen-Torvik, L. J., Pankow, J. S., Jacobs, D. R., Jr., Steinberger, J., Moran, A. and Sinaiko, A.R. (2012). Development of associations among central adiposity, adiponectin and insulin sensitivity from adolescence to young adulthood. *Diabet. Med.* 29:1153–1158.

84. Ambeba, E. J., Styn, M. A., Kuller, L. H., Brooks, M. M., Evans, R. W. and Burke, L. E. (2013). Longitudinal effects of weight loss and regain on cytokine concentration of obese adults. *Metabolism*. 62:1218–1222.
85. Endoscopic ultrasound in the diagnosis of foreign bodies of the colon and rectum. Rodrigues FG, Campos JB, Silva GD, Wexner SD *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2016 Dec; 62(9):818-821.
86. Calder P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc. Trans.* 2005;33:423–427. doi: 10.1042/BST0330423.
87. Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 233:674–688.
88. Buoite Stella A, Gortan Cappellari G, Barazzoni R, Zanetti M. Update on the Impact of Omega 3 Fatty Acids on Inflammation, Insulin Resistance and Sarcopenia: A Review. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 11;19(1):218. doi: 10.3390/ijms19010218. PMID: 29324650; PMCID: PMC5796167.
89. Serhan C.N., Chiang N., Dalli J. New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol. Asp. Med.* 2017 doi: 10.1016/j.mam.2017.08.002.
90. Calder P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1851:469–484. doi: 10.1016/j.bbali.2014.08.010.
91. Caughey G.E., Mantzioris E., Gibson R.A., Cleland L.G., James M.J. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996;63:116–122. doi: 10.1093/ajcn/63.1.116.
92. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M *Hepatology*. 2016 Jul; 64(1):73-84.
93. A review of the pathogenic and therapeutic role of nutrition in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Panera N, Barbaro B, Della Corte C, Mosca A, Nobili V, Alisi A *Nutr Res.* 2018 Oct; 58():1-16.
94. Healthcare Cost and Utilization in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Real-World Data From a Large U.S. Claims Database. Allen AM, Van Houten HK, Sangaralingham LR, Talwalkar JA, McCoy RG *Hepatology*. 2018 Dec; 68(6):2230-2238.
95. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. Jump DB, Lytle KA, Depner CM, Tripathy S *Pharmacol Ther.* 2018 Jan; 181():108-125.
96. Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. Scorletti E, Byrne CD *Mol Aspects Med.* 2018 Dec; 64():135-146.
97. I. P. J. Alwayn, K. Gura, V. Nosé et al., “Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease,” *Pediatric Research*, vol. 57, no. 3, pp. 445–452, 2005.
98. M.-T. Wu, H.-N. Chou, and C.-J. Huang, “Dietary fucoxanthin increases metabolic rate and upregulated mRNA expressions of the PGC-1alpha network, mitochondrial biogenesis and fusion genes in white adipose tissues of mice,” *Marine Drugs*, vol. 12, no. 2, pp. 964–982, 2014.
99. J. Araya, R. Rodrigo, L. A. Videla et al., “Increase in long-chain polyunsaturated fatty

acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease,” *Clinical Science*, vol. 106, no. 6, pp. 635–643, 2004.

100. K. Promrat, D. E. Kleiner, H. M. Niemeier et al., “Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis,” *Hepatology*, vol. 51, no. 1, pp. 121–129, 2010.

101. M. Lazo and J. M. Clark, “The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 28, no. 4, pp. 339–350, 2008.

102. A. P. Simopoulos, “Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet,” *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 102, pp. 10–21, 2011.

103. Chen LH, Wang YF, Xu QH, Chen SS. Omega-3 fatty acids as a treatment for non-alcoholic fatty liver disease in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr*. 2018;37(2):516–21.

104. Spooner MH, Jump DB. Omega-3 fatty acids and nonalcoholic fatty liver disease in adults and children: where do we stand?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019;22(2):103-110. doi:10.1097/MCO.0000000000000539.

105. Lytle KA, Wong CP, Jump DB. Docosahexaenoic acid blocks progression of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in obese *Ldlr*^{-/-} mice. *PLoS One*. 2017;12(4):e0173376.

106. What is Cardiovascular Disease?, American Heart Association. available on: <https://www.heart.org/en/health-topics/consumer-healthcare/what-is-cardiovascular-disease>.

107. WHO CVD Risk Chart Working Group. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *Lancet Glob Health*. 2019;7(10):e1332-e1345. doi:10.1016/S2214-109X(19)30318-3.

108. Gaziano T, Reddy KS, Paccaud F, et al. Cardiovascular Disease. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2006. Chapter 33. Co-published by Oxford University Press, New York.

109. Simopoulos AP, Cleland LG (Eds.). *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The scientific evidence*. *World Rev Nutr Diet*. Basel: Karger, Vol. 92, 2003.

110. Weber PC. Are we what we eat? Fatty acids in nutrition and in cell membranes: cell functions and disorders induced by dietary conditions. *Svanoybukt*, Norway: Svanoy Foundation (Report no. 4), pp9–18, 1989.

111. Fish intake and risk of incident heart failure. Mozaffarian D, Bryson CL, Lemaitre RN, Burke GL, Siscovick DS *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jun 21; 45(12):2015-21.

112. Dietary fish and n-3 fatty acid intake and cardiac electrocardiographic parameters in humans. Mozaffarian D, Prineas RJ, Stein PK, Siscovick DS *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug 1; 48(3):478-84.

113. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA, PREDIMED Study Investigators. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4; 368(14):1279-90.

114. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. Mozaffarian D, Rimm EB *JAMA*. 2006 Oct 18; 296(15):1885-99.

115. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Kris-

- Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation*. 2002 Nov 19; 106(21):2747-57.
116. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999;354(9177):447-55.
117. CONNOR SL, CONNOR WE. Are fish oils beneficial in the prevention and treatment of coronary artery disease? *Am J Clin Nutr* 1997; 66(4 Suppl): 1020S-1031S.
118. DE CATERINA R, LIAO JK, LIBBY P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000 ; 71(1Suppl) : 213S-223S.
119. Raoux F. Syndrome métabolique : définitions et épidémiologie. *mt cardio* 2006 ; 2 (2) : 174-82.
120. IDF. The IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. 2006.
121. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
122. M.S. Mecca, F. Moreto, F.H. Burini, R.C. Dalanesi, K.C. McLellan, R.C. Burini Ten-week lifestyle changing program reduces several indicators for metabolic syndrome in overweight adults *Diabetology Metabolic Syndrome*, 4 (2012), p. 1.
123. de Camargo Talon L, de Oliveira EP, Moreto F, Portero-McLellan KC, Burini RC. Omega-3 fatty acids supplementation decreases metabolic syndrome prevalence after lifestyle modification program. *Omega-3 Lipids*. 2015 Dec 1;19:922-8.
124. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun; 83(6 Suppl):1499S-1504S.
125. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N *Adv Food Nutr Res*. 2012; 65():211-22.
126. Bertrand C, Pignalosa A, Wanecq E, Rancoule C, Batut A, Deleruyelle S, et al. Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS One* 2013;8:e78874.
127. Hainault I, Carolotti M, Hajduch E, Guichard C, Lavau M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1993;683:98-101.
128. Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, et al. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 2010;59:2495-504.
129. Lu M., D.A. Sarruf, S. Talukdar, S. Sharma, Li P., G. Bandyopadhyay, S. Nalbandian, Fan W., J.R. Gayen, S.K. Mahata, N.J. Webster, M.W. Schwartz, J.M. Olefsky Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones *Nature Medicine*, 17 (2011), pp. 618-622.
130. K.K. Ryan, Li B., B.E. Grayson, E.K. Matter, S.C. Woods, R.J. Seeley A role for central nervous system PPAR-gamma in the regulation of energy balance *Nature Medicine*, 17 (2011), pp. 623-626.
131. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J *Physiol Res*. 2014; 63(Suppl 1):S93-118.
132. Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr* 2010;140:1915-22.
133. Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on

individuals. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2012;2(6):241-254. doi:10.1177/2045125312457586.

134. Pertwee, R.; Cascio, M.G. Chapter 6: Known Pharmacological Actions of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and of Four Other Chemical Constituents of Cannabis that Activate Cannabinoid Receptors. In *Handbook of Cannabis*; Pertwee, R., Ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014; pp. 115–136. ISBN 978-0-19-178756-0.

135. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jun 29;50(1):83-90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d. PMID: 7605349.

136. Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Bisogno, T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005, 147–185.

137. Banni S, Di Marzo V. Effect of dietary fat on endocannabinoids and related mediators: consequences on energy homeostasis, inflammation and mood. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Jan;54(1):82-92. doi: 10.1002/mnfr.200900516. PMID: 20013888.

138. Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Gri_n, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992, 258, 1946–1949.

139. Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Bisogno, T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005, 147–185.

140. Dinh, T.P.; Carpenter, D.; Leslie, F.M.; Freund, T.F.; Katona, I.; Sensi, S.L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 10819–10824.

141. Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996, 384, 83–87.

142. Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G.; Minassi, A.; Cascio, M.G.; Ligresti, A.; Matias, I.; Schiano-Moriello, A.; Paul, P.; Williams, E.-J.; et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* 2003, 163, 463–468.

143. Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 5298–5305.

144. Lau BK, Cota D, Cristino L & Borgland SL 2017 Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology* 124 38–51.

145. Tarragon E & Moreno JJ 2017 Role of endocannabinoids on sweet taste perception, food preference, and obesity-related disorders. *Chemical Senses* 43 3–16.

146. Coccorello R & Maccarrone M 2018 Hedonic eating and the ‘delicious circle’: from lipid-derived mediators to brain dopamine and back. *Frontiers in Neuroscience* 12 271.

147. Kirkham TC, Williams CM, Fezza F & Di Marzo V 2002 Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British Journal of Pharmacology* 136 550–557.

148. Balsevich G, Petrie GN & Hill MN 2017 Endocannabinoids: effectors of glucocorticoid signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology* 47 86–108.

149. Forte N, Fernández-Rilo AC, Palomba L, Di Marzo V & Cristino L 2020 Obesity affects the microbiota-gut-brain axis and the regulation thereof by endocannabinoids and related mediators. *International Journal of Molecular Sciences* 21 1554.

150. Ruiz de Azua I & Lutz B 2019 Multiple endocannabinoid-mediated mechanisms in the regulation of energy homeostasis in brain and peripheral tissues. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 1341–1363.
151. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013 Apr 2;17(4):475-90. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.001. PMID: 23562074.
152. Boyd ST, Fremming BA. Rimonabant--a selective CB1 antagonist. *Ann Pharmacother.* 2005 Apr;39(4):684-90. doi: 10.1345/aph.1E499. Epub 2005 Mar 8. PMID: 15755787.
153. Wierzbicki AS. Rimonabant: endocannabinoid inhibition for the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract.* 2006 Dec;60(12):1697-706. doi: 10.1111/j.1742-1241.2006.01210.x. Erratum in: *Int J Clin Pract.* 2007 Mar;61(3):534. PMID: 17109677.
154. Samat A, Tomlinson B, Taheri S, Thomas GN. Rimonabant for the treatment of obesity. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2008 Nov;3(3):187-93. doi: 10.2174/157489008786264014. PMID: 18991793.
155. Soyka M. Rimonabant and depression. *Pharmacopsychiatry.* 2008 Sep;41(5):204-5. doi: 10.1055/s-2008-1078744. Epub 2008 Sep 1. PMID: 18763226.
156. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ *Nat Rev Neurosci.* 2015 Dec; 16(12):705-18.
157. The endocannabinoid/endovanilloid system and depression. Smaga I, Bystrowska B, Gawliński D, Przegaliński E, Filip M *Curr Neuropharmacol.* 2014 Sep; 12(5):462-74.
158. Di Marzo, V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018, 17, 623–639.
159. Hansen, H. S., Kleberg, K., & Hassing, H. A. (2015). Chapter 1—Nonendocannabinoid N-Acylethanolamines and Monoacylglycerols: Old Molecules New Targets. In V. Di Marzo & J. Wang (Eds.), *The Endocannabinoidome* (pp. 1–13). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420126-2.00001-8>.
160. Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C. T., Gardner, L. S., Griffin, G., Jackson, H. C., Procter, M. J., Rasamison, C. M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P. S., Williams, G. M., & Reynet, C. (2006). Orphanization of 121 a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metabolism*, 3(3), 167– 175. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.004>.
161. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 236–240. PubMed. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.90879>.
162. Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>.
163. Ramer, R., Schwarz, R., & Hinz, B. (2019). Modulation of the Endocannabinoid System as a Potential Anticancer Strategy. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 430. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00430>.
164. Kersten, Sander, Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(11), 1489–1498. <https://doi.org/10.1172/JCI6223>.
165. O'Sullivan, S. E., Kendall, P. J., & Kendall, D. A. (2011). Endocannabinoids and the

- cardiovascular response to stress. *Journal of Psychopharmacology*, 26(1), 71–82. <https://doi.org/10.1177/0269881111408457>.
166. Console-Bram, L., Brailoiu, E., Brailoiu, G. C., Sharir, H., & Abood, M. E. (2014). Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: A tale of biased agonism. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3908–3917. PubMed. <https://doi.org/10.1111/bph.12746>.
167. Iannotti, F. A., Di Marzo, V., & Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*, 62, 107–128. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>.
168. Syed, S. K., Bui, H. H., Beavers, L. S., Farb, T. B., Ficorilli, J., Chesterfield, A. K., Kuo, M.-S., Bokvist, K., Barrett, D. G., & Efanov, A. M. (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(12), E1469–E1478. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00269.2012>.
169. Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3–4), 105–111. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001>.
170. Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 487–487. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>.
171. Rosenbaum, T., & Simon, S. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. (Liedtke WB, Heller S, editors). CRC Press/Taylor & Francis.
172. Meletis, C. (2019). The Important Role of the Endocannabinoid System and the Endocannabinoidome in Gut Health. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 25(S2), 24–28. PubMed.
173. Du, Q., Liao, Q., Chen, C., Yang, X., Xie, R., & Xu, J. (2019). The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Frontiers in Physiology*, 10, 1064. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01064>.
174. Christie, S., Wittert, G. A., Li, H., & Page, A. J. (2018). Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 420. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00420>.
175. Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G. N-Acylethanolamines and precursor phospholipids – relation to cell injury. *Chem Phys Lipids* 2000;108:135–50.
176. Hansen HS. Effect of diet on tissue levels of palmitoylethanolamide. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12:17–25.
177. Diep TA, Madsen AN, Holst B, Kristiansen MM, Wellner N, Hansen SH, et al. Dietary fat decreases intestinal levels of the anorectic lipids through a fat sensor. *FASEB J* 2011;25: 765–74.
178. Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001;414:209–12.
179. Thabuis C, Destailats F, Landrier JF, Tissot-Favre D, Martin JC. Analysis of gene expression pattern reveals potential targets of dietary oleoylethanolamide in reducing body fat gain in C3H mice. *J Nutr Biochem* 2010;21:922–8. [40] Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I.
180. Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 2001;419:191–8.

181. Suardiaz M, Estivill-Torrus G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain* 2007;33:99–110.
182. Di Cesare ML, D'Agostino G, Pacini A, Russo R, Zanardelli M, Ghelardini C, et al. Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators* 2013;2013:328797.
183. Fan A, Wu X, Wu H, Li L, Huang R, Zhu Y, et al. Atheroprotective effect of oleoylethanolamide (OEA) targeting oxidized LDL. *PLoS ONE* 2014;9:e85337.
184. Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I, Lu J, Steardo A, et al. Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPARalpha activation. *Gut* 2014;68:1300–12.
185. Impellizzeri D, Esposito E, Di Paola R, Ahmad A, Campolo M, Peli A, et al. Palmitoylethanolamide and luteolin ameliorate development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R192.
186. Cerrato S, Brazis P, Della Valle MF, Miolo A, Petrosin S, Di Marzo V, et al. Effects of palmitoylethanolamide on the cutaneous allergic inflammatory response in *Ascaris* hypersensitive Beagle dogs. *Vet J* 2012;191:377–82.
187. Petrosino S, Cristino L, Karsak M, Gaffal E, Ueda N, Tuting T, et al. Protective role of palmitoylethanolamide in contact allergic dermatitis. *Allergy* 2011;65:698–711.
188. Mattace RG, Simeoli R, Russo R, Santoro A, Pirozzi C, de Villa Bianca d'E, et al. N-Palmitoylethanolamide protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress. *Pharmacol Res* 2013;76C:67–76.
189. Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. N-(2-Hydroxyethyl)-hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by downmodulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996;300:227–36.
190. Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR. Anti-convulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia* 2001;42:321–7.
191. Ahmad A, Genovese T, Impellizzeri D, Crupi R, Velardi E, Marino A, et al. Reduction of ischemic brain injury by administration of palmitoylethanolamide after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 2012;1477:45–58.
192. D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid-beta25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology* 2012;37:1784–92.
193. Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, et al. Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neuropharmacology* 2012;63:242–9.
194. Galan-Rodriguez B, Suarez J, Gonzalez-Aparicio R, Bermudez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo P, et al. Oleoylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 2009;56:653–64.
195. Garg P, Duncan RS, Kaja S, Zabaneh A, Chapman KD, Koulen P. Lauroyl-ethanolamide and linoleoylethanolamide improve functional outcome in a rodent model for stroke. *Neurosci Lett* 2011;492:134–8.
196. Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors* 2010;37:1–7.
197. Buczynski MW, Svensson CI, Dumlao DS, Fitzsimmons BL, Shim JH, Scherbart TJ,

- et al. Inflammatory hyperalgesia induces essential bioactive lipid production in the spinal cord. *J Neurochem* 2010;114:981–93.
198. Balvers MGJ, Verhoeckx KCM, Plastina P, et al. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid are converted by 3T3-L1 adipocytes to N-acyl ethanolamines with anti-inflammatory properties. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801(10):1107–14.
 199. Brown I, Cascio MG, Wahle KW, et al. Cannabinoid receptor-dependent and -independent anti-proliferative effects of omega-3 ethanolamides in androgen receptor-positive and -negative prostate cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2010;31(9):1584–91.
 200. Brown I, Cascio MG, Rotondo D, et al. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Prog Lipid Res* 2013;52(1):80–109.
 201. Berger A, Crozier G, Bisogno T, et al. Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11):6402–6.
 202. Wood JT, Williams JS, Pandarinathan L, et al. Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *J Lipid Res* 2010;51(6):1416–23.
 203. Sheskin T, Hanus L, Slager J, et al. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J Med Chem* 1997;40(5):659–67.
 204. Tan B, O'Dell DK, Yu YW, et al. Identification of endogenous acyl amino acids based on a targeted lipidomics approach. *J Lipid Res* 2010;51(1):112–9.
 205. Hansen HS, Rosenkilde MM, Holst JJ, Schwartz TW. GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:374–81.
 206. Kleberg K, Hassing HA, Hansen HS. Classical endocannabinoid-like compounds and their regulation by nutrients. *BioFactors* 2014, in press.
 207. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013;27:459–84.
 208. Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, et al. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1409–17.
 209. Kang SU. GPR119 agonists: a promising approach for T2DM treatment? A SWOT analysis of GPR119. *Drug Discov Today* 2013;18:1309–15.
 210. Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., Rico-Barrio, I., Zarandona, I., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2017). Targeting the endocannabinoid system: Future therapeutic strategies. *Drug Discovery Today*, 22(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>.
 211. Iannotti, F., & Piscitelli, F. (2018). *Endocannabinoidome*. N ELS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/doi:10.1002/9780470015902.a0028301>.
 212. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, et al. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(5):428-38.
 213. Blottière H Impact of the omic science in medicine, nutrition and biotechnologies, Madrid, 2016 <https://www.slideshare.net/FundacionAreces/herv-blottiereel-impacto-de-las-ciencias-micas-en-la-medicina-la-nutricin-y-la-biotecnologa>.
 214. David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and

- reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014, 505, 559–563.
215. Kasselmann, L.J.; Vernice, N.A.; DeLeon, J.; Reiss, A.B. The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity. *Atherosclerosis* 2018, 271, 203–213.
216. Ascher, S.; Reinhardt, C. The gut microbiota: An emerging risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. *Eur. J. Immunol.* 2018, 48, 564–575.
217. Ma, J.; Li, H. The Role of Gut Microbiota in Atherosclerosis and Hypertension. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1082.
218. van den Munckhof, I.C.L.; Kurilshikov, A.; ter Horst, R.; Riksen, N.P.; Joosten, L.A.B.; Zhernakova, A.; Fu, J.; Keating, S.T.; Netea, M.G.; de Graaf, J.; et al. Role of gut microbiota in chronic low-grade inflammation as potential driver for atherosclerotic cardiovascular disease: A systematic review of human studies: Impact of gut microbiota on low-grade inflammation. *Obes. Rev.* 2018, 19, 1719–1734.
219. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients*. 2020;12(5):1474. Published 2020 May 19. doi:10.3390/nu12051474.
220. Yong V.B. The Role of the Microbiome in Human Health and Disease. An Introduction for Clinicians. *BMJ*. 2017;356 doi: 10.1136/bmj.j831.
221. Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, J. F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(1), 1. <https://doi.org/10.1136/gut.53.1.1>.
222. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013 Apr 2;17(4):475-90. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.001. PMID: 23562074.
223. Kim H-Y, Spector AA. Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;88: 121–125. doi: 10.1016/j.plefa.2012.08.002.
224. Di Marzo V, Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. 2015;12(4):692-698. doi:10.1007/s13311-015-0374-6.
225. Clark TM, Jones JM, Hall AG, Tabner SA, Kmiec RL. Theoretical Explanation for Reduced Body Mass Index and Obesity Rates in Cannabis Users. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2018;3(1):259-271. Published 2018 Dec 21. doi:10.1089/can.2018.0045.
226. Piscitelli, F.; Carta, G.; Bisogno, T.; Murru, E.; Cordeddu, L.; Berge, K.; Tandy, S.; Cohn, J.S.; Griinari, M.; Banni, S.; et al. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2011, 8, 51.
227. Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, S.; Bátkai, S.; Harvey-White, J.; Mackie, K.; Oertler, L.; Wang, L.; et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1298–1305.
228. Alvheim, A.R.; Malde, M.K.; Osei-Hyiaman, D.; Lin, Y.H.; Pawlosky, R.J.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Frøyland, L.; Hibbeln, J.R. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2012, 20, 1984–1994.
229. Matias, I.; Petrosino, S.; Racioppi, A.; Capasso, R.; Izzo, A.A.; Di Marzo, V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008, 286, S66–S78.
230. Blüher, M.; Engeli, S.; Kloting, N.; Berndt, J.; Fasshauer, M.; Bátkai, S.; Pacher, P.;

- Schon, M.R.; Jordan, J.; Stumvoll, M. Dysregulation of the Peripheral and Adipose Tissue Endocannabinoid System in Human Abdominal Obesity. *Diabetes* 2006, 55, 3053–3060.
231. Engeli, S.; Böhnke, J.; Feldpausch, M.; Gorzelniak, K.; Janke, J.; Bátkai, S.; Pacher, P.; Harvey-White, J.; Luft, F.C.; Sharma, A.M.; et al. Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes* 2005, 54, 2838–2843.
232. Karvela, A.; Rojas-Gil, A.P.; Samkinidou, E.; Papadaki, H.; Pappa, A.; Georgiou, G.; Spiliotis, B.E. Endocannabinoid (EC) receptor, CB1, and EC enzymes' expression in primary adipocyte cultures of lean and obese pre-pubertal children in relation to adiponectin and insulin. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2010, 23, 1011–1024.
233. Aviello, G.; Matias, I.; Capasso, R.; Petrosino, S.; Borrelli, F.; Orlando, P.; Romano, B.; Capasso, F.; Di Marzo, V.; Izzo, A.A. Inhibitory effect of the anorexic compound oleylethanolamide on gastric emptying in control and overweight mice. *J. Mol. Med.* 2008, 86, 413–422.
234. Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, S.; Bátkai, S.; Harvey-White, J.; Mackie, K.; Oertler, L.; Wang, L.; et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1298–1305.
235. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013;17(4):475-90.
236. Côté, M.; Matias, I.; Lemieux, I.; Petrosino, S.; Alméras, N.; Després, J.-P.; Di Marzo, V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int. J. Obes.* 2007, 31, 692–699.
237. Demizieux, L.; Piscitelli, F.; Troy-Fioramonti, S.; Iannotti, F.A.; Borrino, S.; Gresti, J.; Muller, T.; Bellenger, J.; Silvestri, C.; Di Marzo, V.; et al. Early Low-Fat Diet Enriched With Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late Glycemic Control After a High-Fat Diet Challenge in Mice. *Diabetes* 2016, 65, 1824–1837.
238. Meijerink J, Balvers M, Witkamp R. N-Acyl amines of docosahexaenoic acid and other n-3 polyunsaturated fatty acids - from fishy endocannabinoids to potential leads. *Br J Pharmacol.* 2013 Jun;169(4):772-83. doi: 10.1111/bph.12030. Review. PubMed PMID: 23088259; PubMed Central PMCID: PMC3687658.
239. Wood JT, Williams JS, Pandarinathan L, Janero DR, Lammi-Keefe CJ, Makriyannis A. Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid- system metabolites in brain and plasma. *J Lipid Res.* 2010;51: 1416–1423. doi: 10.1194/jlr.M002436.
240. Sheskin T, Hanus L, Slager J, Vogel Z, Mechoulam R. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1997;40: 659–667. doi: 10.1021/jm960752x.
241. Kim H-Y, Spector AA, Xiong Z-M. A synaptogenic amide N-docosahexaenoylethanolamide promotes hippocampal development. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;96: 114–120. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2011.07.002.
242. Cao D, Kevala K, Kim J, Moon H-S, Jun SB, Lovinger D, et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem.* 2009;111: 510–521. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x.
243. Demizieux L, Piscitelli F, Troy-Fioramonti S, Iannotti FA, Borrino S, Gresti J, Muller T, Bellenger J, Silvestri C, Di Marzo V, Degrace P. Early Low-Fat Diet Enriched With Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late Glycemic Control After a High-Fat Diet Challenge in Mice. *Diabetes.* 2016 Jul;65(7):1824-37. doi:

- 10.2337/db15-1279. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27207550.
244. Batetta B, Griinari M, Carta G, Murru E, Ligresti A, Cordeddu L, et al. Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. *J Nutr.* août 2009;139(8):1495-501.
245. Piscitelli F, Carta G, Bisogno T, Murru E, Cordeddu L, Berge K, et al. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr Metab.* 13 juill 2011;8(1):51.
246. Banni S, Carta G, Murru E, Cordeddu L, Giordano E, Sirigu AR, et al. Krill oil significantly decreases 2-arachidonoylglycerol plasma levels in obese subjects. *Nutr Metab.* 30 janv 2011;8(1):7.
247. Berge K, Piscitelli F, Hoem N, Silvestri C, Meyer I, Banni S, et al. Chronic treatment with krill powder reduces plasma triglyceride and anandamide levels in mildly obese men. *Lipids Health Dis.* 27 mai 2013;12:78.
248. Silvestri C, Di Marzo V. Second generation CB1 receptor blockers and other inhibitors of peripheral endocannabinoid overactivity and the rationale of their use against metabolic disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* sept 2012;21(9):1309-22.
249. Wainwright CL, Michel L. Endocannabinoid system as a potential mechanism for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid mediated cardiovascular protection. *Proc Nutr Soc.* nov 2013;72(4):460-9.
250. Cui, C.; Li, Y.; Gao, H.; Zhang, H.; Han, J.; Zhang, D.; Li, Y.; Zhou, J.; Lu, C.; Su, X. Modulation of the gut microbiota by the mixture of fish oil and krill oil in high-fat diet-induced obesity mice. *PLoS ONE* 2017, 12, e0186216.
251. Shen, W.; Gaskins, H.R.; McIntosh, M.K. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J. Nutr. Biochem.* 2014, 25, 270–280.
252. Costantini, L.; Molinari, R.; Farinon, B.; Merendino, N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2645.
253. Pu, S.; Khazanehei, H.; Jones, P.J.; Khafipour, E. Interactions between Obesity Status and Dietary Intake of Monounsaturated and Polyunsaturated Oils on Human Gut Microbiome Profiles in the Canola Oil Multicenter Intervention Trial (COMIT). *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1612.
254. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell Metab* 2015;22:658–68.
255. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9066–71.
256. Karlsson CL, Onnerfält J, Xu J, et al. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:2257–61.
257. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus.* 2018;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0001 -2018. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.
258. Cotogni P, Muzio G, Trombetta A, Ranieri VM, Canuto RA. Impact of the omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio on cytokine release in human alveolar cells. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011 Jan;35(1):114-21. doi: 10.1177/0148607110372392. PMID: 21224438.
259. Cani PD, Plovier H, Van Hul M, Geurts L, Delzenne NM, Druart C, et al. Endocannabinoids--at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat*

Rev Endocrinol. mars 2016;12(3):133-43.

260. Everard, A.; Cani, P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2013, 27, 73–83.
261. Muccioli, G.G.; Naslain, D.; Bäckhed, F.; Reigstad, C.S.; Lambert, D.M.; Delzenne, N.M.; Cani, P.D. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 2010, 6, 392.
262. Muccioli, G. G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 392. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>.
263. Mehrpouya-Bahrami, P., Chitrala, K. N., Ganewatta, M. S., Tang, C., Murphy, E. A., Enos, R. T., Velazquez, K. T., McCellan, J., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2017). Blockade of CB1 cannabinoid receptor alters gut microbiota and attenuates inflammation and diet-induced obesity. *Scientific Reports*, 7(1), 15645. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15154-6>.
264. Cani, P.D.; Plovier, H.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Delzenne, N.M.; Druart, C.; Everard, A. Endocannabinoids—At the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016, 12, 133–143.
265. Muccioli G.G., Naslain D., Bäckhed F., Reigstad C.S., Lambert D.M., Delzenne N.M., Cani P.D. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 2010;6:392. doi: 10.1038/msb.2010.46.
266. Manca, C., Boubertakh, B., Leblanc, N., Deschênes, T., Lacroix, S., Martin, C., Houde, A., Veilleux, A., Flamand, N., Muccioli, G. G., Raymond, F., Cani, P., Di Marzo, V., & Silvestri, C. (2019). Germ-free mice exhibit profound gut microbiota-dependent alterations of intestinal endocannabinoid signaling. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000424>.
267. Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.
268. Kirshenbauer HG. *Fats and oils*, 2nd ed. New York: Reinhold Publishing; 1960.
269. E.A Emken, *Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils* *Ann Rev Nutr*, 4 (1984), pp. 339-376.
270. R Troisi, W.C Willett, Weiss ST. Trans-fatty acid intake in relation to serum lipid concentrations in adult men *Am J Clin Nutr*, 56 (1992), pp. 1019-.
271. A.P Simopoulos, *Trans fatty acids* G.A Spiller (Ed.), *Handbook of lipids in human nutrition*, CRC Press, Boca Raton (1995), pp. 91-99.
272. A.P Simopoulos, *Omega-6/omega-3 fatty acid ratio and trans fatty acids in non-insulin dependent diabetes mellitus I Klimes, et al. (Eds.), Lipids and syndromes of insulin resistance*, *Ann NY Acad Sci*, 827 (1997), pp. 327-338.
273. World Health Organization (WHO). Plan de l’OMS pour éliminer de l’alimentation les acides gras trans produits industriellement [Internet] 2021. Available from: <https://www.who.int/fr/news/item/14-05-2018-who-plan-to-eliminate-industrially-produced-trans-fatty-acids-from-global-food-supply>.
274. Smith MD, Oglend A, Kirkpatrick AJ, et al. Seafood prices reveal impacts of a major ecological disturbance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(7):1512-1517. doi:10.1073/pnas.1617948114.

275. Greene J, Ashburn SM, Razzouk L et al. (2013) Fish oils, coronary heart disease, and the environment. *Am J Public Health* 103, 1568–1576.
276. Jenkins DJA, Sievenpiper JL, Pauly D et al. (2009) Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? *CMAJ* 180, 633–637.
277. Brunner EJ, Jones PJS, Friel S et al. (2009) Fish, human health and marine ecosystem health: policies in collision. *Int J Epidemiol* 38, 93–100.
278. Thurstan RH & Roberts CM (2014) The past and future of fish consumption: can supplies meet healthy eating recommendations? *Mar Pollut Bull* 89, 5–11.
279. Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH et al. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
280. Khan F, Orson F, Ogawa Y, Parker C, McGuire Davis C: Adult seafood allergy in the Texas medical center: a 13-year experience. *Allergy Rhinol* 2:71–77, 2011.
281. Rivas MF: Food allergy in Aergológica—2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19:37–44, 2009.
282. Cianferoni A, Novembre E, Mugnaini L, Lombardi E, Bernardini R, Pucci N, Vierucci A: Clinical features of acute anaphylaxis in patients admitted to a university hospital: an 11-year retrospective review (1985–1996). *Ann Allergy Asthma Immunol* 87:27–32, 2001.
283. Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S: Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. *J Allergy Clin Immunol* 121:166–171, 2008.
284. Ben-Shoshan M, Harrington DW, Soller L, Fragapane J, Joseph L, Pierre YS, Godefroy SB, Elliot SJ, Clarke AE : A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J Allergy Clin Immunol* 125:1327–1335, 2010.
285. Turner P, Ng I, Kemp A, Campbell D: Seafood allergy in children: a descriptive study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 106:494–501, 2011.
286. Lee AJ, Thalayasingam M, Lee BW: Food allergy in Asia: how does it compare? *Asia Pacific Allergy* 3:3–14, 2013.
287. Park M, Kim D, Ahn K, Kim J, Han Y: Prevalence of immediate-type food allergy in early childhood in Seoul. *Allergy Asthma Immunol Res* 6:131–136, 2014.
288. Appleby PN, Key TJ. The long-term health of vegetarians and vegans. *Proc Nutr Soc*. 2016 Aug;75(3):287-93. doi: 10.1017/S0029665115004334. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26707634.
289. Yeliosof O, Silverman LA. Veganism as a cause of iodine deficient hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018 Jan 26;31(1):91-94. doi: 10.1515/jpem-2017-0082. PMID: 29303778.
290. Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 4, 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>.
291. Leonard, W, Zhang, P, Ying, D, Fang, Z. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020; 19: 282– 308. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12517>.
292. Pihlanto A, Mattila P, Mäkinen S, Pajari A-M. Bioactivities of alternative protein sources and their potential health benefits. *Food Funct*. 18 oct 2017;8(10):3443-58.
293. House JD, Neufeld J, Leson G. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino

- acid score method. *J Agric Food Chem.* 24 nov 2010;58(22):11801-7.
294. Rodriguez-Leyva D, Pierce GN (2010) The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutr Metabol* 7:32.
295. Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 5 mars 2002;166(5):608-15.
296. Horia E, Watkins BA. Comparison of stearidonic acid and alpha-linolenic acid on PGE2 production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. *J Nutr Biochem.* 2005 Mar;16(3):184-92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.11.001. PMID: 15741054.
297. Aiello G, Fasoli E, Boschini G, Lammi C, Zanoni C, Citterio A, Arnoldi A (2016) Proteomic characterization of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *J Proteomics* 147:187–196.
298. Yan, X., Tang, J., dos Santos Passos, C., Nurisso, A., Simoes- Pires, C. A., Ji, M., ... Fan, P. (2015). Characterization of lignanamides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed and their antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 10611–10619. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05282>.
299. Zhou, Y., Wang, S., Lou, H., & Fan, P. (2018). Chemical constituents of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed with potential antineuroinflammatory activity. *Phytochemistry Letters*, 23, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.11.013>.
300. Chen, T., He, J., Zhang, J., Li, X., Zhang, H., & Li, L. (2012). The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chemistry*, 134, 1030–1037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.009>.
301. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients.* 2016 Aug 22;8(8). pii: E515. doi: 10.3390/nu8080515. Review. PubMed PMID: 27556486; PubMed Central PMCID: PMC4997428.
302. Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 4, 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>.
303. Petrović M, Debeljak Ž, Kezić N, Džidara P. Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chem.* 2015 Mar 1;170:218-25. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.039. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25306338.
304. Eunyoung Jang, Hyojeong Kim, Seojeong Jang, Jaesin Lee, Seungkyung Baek, Sanghwan In, Eunmi Kim, Yong-ung Kim, Eunyoung Han, Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea, *Forensic Science International*, Volume 306, 2020, 110064, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110064>.
305. Leonard, W, Zhang, P, Ying, D, Fang, Z. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2020; 19: 282– 308. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12517>.
306. Farinon B, Molinari R, Costantini L, Merendino N. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients.* 2020 Jun 29;12(7):1935. doi: 10.3390/nu12071935. PMID: 32610691; PMCID: PMC7400098.
307. Johnson R. Hemp as an Agricultural Commodity. [(accessed on 22 June 2018)]; Available online: <https://fas.org/sgp/crs/misc/RL32725.pdf>.
308. Agriculture and Agri-Food Canada Canada’s Industrial Hemp Industry. [(accessed on

- 10 January 2020)];2016 Available online: <http://www4.agr.gc.ca>.
309. Health Canada Cultivation Licenses. [(accessed on 10 January 2020)];2011 Available online: <http://www.hc-sc.gc.ca/>.
310. Health Canada Industrial Hemp Licensing Statistics for 2018. [(accessed on 10 January 2020)];2019 Available online: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-medication/cannabis/producing-selling-hemp/about-hemp-canada-hemp-industry/statistics-reports-fact-sheets-hemp.html>.
311. Irakli, M.; Tsaliki, E.; Kalivas, A.; Kleisiaris, F.; Sarrou, E.; Cook, C.M. Effect of Genotype and Growing Year on the Nutritional, Phytochemical, and Antioxidant Properties of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seeds. *Antioxidants* 2019, 8, 491.
312. Chang, C.-W., Tung, C.-W., Tsai, C.-C., Wu, Y.-T., and Hsu, M.-C. (2017) Determination of cannabinoids in hemp nut products in Taiwan by HPLC-MS/MS coupled with chemometric analysis: quality evaluation and a pilot human study. *Drug Test. Analysis*, 9: 888– 897. doi: 10.1002/dta.2062.
313. Mamone G, Picariello G, Ramondo A, Nicolai MA, Ferranti P. Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Res Int.* 2019;115:562–71.
314. Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ.* 2002 Mar 5;166(5):608-15. PMID: 11898942; PMCID: PMC99405.
315. Pihlanto A, Mattila P, Mäkinen S, Pajari A-M. Bioactivities of alternative protein sources and their potential health benefits. *Food Funct.* 18 oct 2017;8(10):3443-58.
316. Rodriguez-Leyva D, Pierce GN (2010) The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutr Metabol* 7:32.
317. Cristian Del Bo', Valeria Deon, Francesca Abello, Giulia Massini, Marisa Porrini, Patrizia Riso, Ornella Guardamagna, Eight-week hempseed oil intervention improves the fatty acid composition of erythrocyte phospholipids and the omega-3 index, but does not affect the lipid profile in children and adolescents with primary hyperlipidemia, *Food Research International*, Volume 119, 2019, Pages 469-476, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.045>.
318. LEIZER C., RIBNICKY D., POULEV A., DUSHENKOV S., RASKIN I., 2000. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J Nutraceut Funct Med Foods* 2(4), 35-53.
319. KRIESE U., SCHUMANN E., WEBER W.E., BEYER M., BRÜHL L., MATTHÄUS B., 2004. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* 137, 339-351.
320. ORHAN U., KUSMENOGLU S., SENER, B., 2000. GC-MS analysis of the seed oil of *Cannabis sativa* L. cultivated in Turkey. *J Fac Pharm Gazi* 17(2), 79-81.
321. BAGCI E., BRUEHL L., AITZETMULLER K., ALTAN Y., 2003. A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*). *Turk J Bot* 27, 141-147.
322. ANWAR F., LATIF S., ASHRAF M., 2006. Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *JAOCs* 83, 323-329.
323. Kara, Şevket & Gul, Volkan & Kiralan, Mustafa. (2010). Fatty acid composition of hempseed oils from different localities in Turkey. *Spanish journal of agricultural research*, ISSN 1695-971X, N° 2, 2010, pages. 385-390. 8. 10.5424/sjar/2010082-1220.
324. Liste des cultivars approuvés pour la saison de croissance de 2021 : variétés de

chanvre industriel approuvées pour la production commerciale, Santé Canada, available on, <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/drogues-medicaments/cannabis/production-vente-chanvre/licence-commerciale/liste-cultivars-approuves-cannabis-sativa.html>.

325. The Atwater System of Calculating the Caloric Value of Diets, *The Journal of Nutrition*, Volume 28, Issue 6, December 1944, Pages 443–452, <https://doi.org/10.1093/jn/28.6.443>.

326. Finola Hemp seeds, Agence canadienne d'inspection des aliments, available on, <https://inspection.canada.ca/francais/plaveg/pbrpov/cropreport/hem/app00002014f.shtml>.

327. X59 Hemp seeds, Agence canadienne d'inspection des aliments, available on, <https://inspection.canada.ca/francais/plaveg/pbrpov/cropreport/hem/app00008459f.shtml>.

328. Mahmoud ElSohly and Waseem Gul, Ethan B. Russo, Alice P. Mead, David J. Potter, Etienne de Meijer, 2014, *Handbook of Cannabis Part 1 Constituents, History, International Control, Cultivation, and Phenotypes of Cannabis*, Oxford, DOI:10.1093/acprof:oso/9780199662685.001.0001.

329. Y. Yang, M.M. Lewis, A.M. Bello, E. Wasilewski, H.A. Clarke, L.P. Kotra, Cannabis sativa (Hemp) seeds, D9-tetrahydrocannabinol, and potential overdose, *Cannabis Cannabinoid Res.* 2.1 (2017) 274–281, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/can.2017.0040>.

330. C.W. Chang, C.W. Tung, C.C. Tsai, Y.T. Wu, M.C. Hsu, Determination of cannabinoids in hemp nut products in Taiwan by HPLC-MS/MS coupled with chemometric analysis: quality evaluation and a pilot human study, *Drug Test. Anal.* 9 (2017) 888–897, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/dta.2062>.

331. Korea Ministry of Food and Drug Safety, (2019) . (Accessed 04 February 2015) https://www.mfds.go.kr/brd/m_84/view.do?seq=18792.

332. F. Grotenhermen, M. Karus, D. Lohmeyer, THC-limits for food: a scientific study, *J. Int. Hemp Assoc* 5 (2) (1998) 101–105.

333. B. Ba _nas, B. Beitzke, M. Carus, K. Iffland, D. Kruse, L. Sarmiento, et al., Reasonable Guidance Values for THC (Tetrahydrocannabinol) in Food Products, *European Industrial Hemp Association (EIHA)*, 2017.

334. Citti C, Linciano P, Panseri S, Vezzalini F, Forni F, Vandelli MA, et al. Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Front Plant Sci.* 2019;10:120.

335. Pavlovic R, Panseri S, Giupponi L, Leoni V, Citti C, Cattaneo C, et al. Phytochemical and Ecological Analysis of Two Varieties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Grown in a Mountain Environment of Italian Alps. *Front Plant Sci.* 2019;10:1265.

336. Vonapartis, E.; Aubin, M.-P.; Seguin, P.; Mustafa, A.F.; Charron, J.-B. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *J. Food Compos. Anal.* 2015, 39, 8–12.

337. Galasso, I.; Russo, R.; Mapelli, S.; Ponzoni, E.; Brambilla, I.M.; Battelli, G.; Reggiani, R. Variability in Seed Traits in a Collection of *Cannabis sativa* L. Genotypes. *Front. Plant Sci.* 2016, 7.

338. Lan, Y.; Zha, F.; Peckrul, A.; Hanson, B.; Johnson, B.; Rao, J.; Chen, B. Genotype x Environmental Effects on Yielding Ability and Seed Chemical Composition of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties Grown in North Dakota, USA. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2019, 96, 1417–1425.

339. Mattila, P.; Mäkinen, S.; Eurola, M.; Jalava, T.; Pihlava, J.-M.; Hellström, J.; Pihlanto, A. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. *Plant Foods*

- Hum. Nutr. 2018, 73, 108–115.
340. Callaway, J.C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 2004, 140, 65–72.
341. Siano, F.; Moccia, S.; Picariello, G.; Russo, G.; Sorrentino, G.; Di Stasio, M.; La Cara, F.; Volpe, M. Comparative Study of Chemical, Biochemical Characteristic and ATR-FTIR Analysis of Seeds, Oil and Flour of the Edible Fedora Cultivar Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Molecules* 2018, 24, 83.
342. Kriese, U.; Schumann, E.; Weber, W.E.; Beyer, M.; Brühl, L.; Matthäus, B. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* 2004, 137, 339–351.
343. Mihoc, M.; Pop, G.; Alexa, E.; Radulov, I. Nutritive quality of romanian hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. *Chem. Cent. J.* 2012, 6, 122.
344. House JD, Neufeld J, Leson G. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *J Agric Food Chem.* 24 nov 2010;58(22):11801-7.
345. EFSA (2009). Scientific opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from European Commission related to labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *The EFSA Journal*, 1176, 1–11. Helbig, D., Bohm,.
346. Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 5 mars 2002;166(5):608-15.
347. Teh, S.-S.; Birch, J. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* 2013, 30, 26–31.
348. Da Silva Marineli, R.; Moraes, É.A.; Lenquiste, S.A.; Godoy, A.T.; Eberlin, M.N.; Maróstica, M.R., Jr. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT Food Sci. Technol.* 2014, 59, 1304–1310.
349. Zatonski W, Campos H, Willett W. Rapid declines in coronary heart disease mortality in Eastern Europe are associated with increased consumption of oils rich in alpha-linolenic acid. *Eur J Epidemiol.* 2008;23(1):3-10. doi: 10.1007/s10654-007-9195-1. Epub 2007 Oct 23. PMID: 17955332.
350. Aiello G, Fasoli E, Boschini G, Lammi C, Zanoni C, Citterio A, Arnoldi A (2016) Proteomic characterization of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *J Proteomics* 147:187–196.
351. Rodriguez-Leyva D, Pierce GN. The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:32. Published 2010 Apr 21. doi:10.1186/1743-7075-7-32.
352. House, J.D.; Neufeld, J.; Leson, G. Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 11801–11807.
353. Mattila, P.; Mäkinen, S.; Eurola, M.; Jalava, T.; Pihlava, J.-M.; Hellström, J.; Pihlanto, A. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2018, 73, 108–115.
354. Da Silva, B.P.; Anunciação, P.C.; da Silva Matyelka, J.C.; Della Lucia, C.M.; Martino, H.S.D.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chem.* 2017, 221, 1709–1716.
355. Multari, S.; Neacsu, M.; Scobbie, L.; Cantlay, L.; Duncan, G.; Vaughan, N.; Stewart, D.; Russell, W.R. Nutritional and Phytochemical Content of High-Protein Crops. *J. Agric.*

Food Chem. 2016, 64, 7800–7811.

356. Mueller, K.; Eisner, P.; Yoshie-Stark, Y.; Nakada, R.; Kirchho_, E. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* 2010, 98, 453–460.

357. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc: a Report of the Panel on Micronutrientsexternal link disclaimer. Washington, DC: National Academy Press; 2001.

358. Lim KH, Riddell LJ, Nowson CA, Booth AO, Szymlek-Gay EA. Iron and zinc nutrition in the economically-developed world: a review. *Nutrients.* 2013 Aug 13;5(8):3184-211. doi: 10.3390/nu5083184. PMID: 23945676; PMCID: PMC3775249.

359. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010.

360. Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol.* févr 2014;25(1):85-90.

361. Minihane AM. Fish oil omega-3 fatty acids and cardio-metabolic health, alone or with statins. *Eur J Clin Nutr.* 2013 May;67(5):536-40. doi: 10.1038/ejcn.2013.19. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23403872.

362. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation.* 31 oct 2000;102(18):2284-99.

363. Banni S, Di Marzo V. Effect of dietary fat on endocannabinoids and related mediators: consequences on energy homeostasis, inflammation and mood. *Mol Nutr Food Res.* janv 2010;54(1):82-92.

364. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 29 juin 1995;50(1):83-90.

365. Morello G, Imperatore R, Palomba L, Finelli C, Labruna G, Pasanisi F, Sacchetti L, Buono L, Piscitelli F, Orlando P, Di Marzo V, Cristino L. Orexin-A represses satiety-inducing POMC neurons and contributes to obesity via stimulation of endocannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 26;113(17):4759-64. doi: 10.1073/pnas.1521304113. Epub 2016 Apr 11. PubMed PMID: 27071101; PubMed Central PMCID: PMC4855580.

366. Banni S, Carta G, Murru E, Cordeddu L, Giordano E, Sirigu AR, Berge K, Vik H, Maki KC, Di Marzo V, Griinari M. Krill oil significantly decreases 2-arachidonoylglycerol plasma levels in obese subjects. *Nutr Metab (Lond).* 2011 Jan 30;8(1):7. doi: 10.1186/1743-7075-8-7. PMID: 21276269; PMCID: PMC3048484.

367. Batetta B, Griinari M, Carta G, Murru E, Ligresti A, Cordeddu L, Giordano E, Sanna F, Bisogno T, Uda S, Collu M, Bruheim I, Di Marzo V, Banni S. Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. *J Nutr.* 2009 Aug;139(8):1495-501. doi: 10.3945/jn.109.104844. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19549757.

368. Piscitelli F, Carta G, Bisogno T, Murru E, Cordeddu L, Berge K, Tandy S, Cohn JS, Griinari M, Banni S, Di Marzo V. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr Metab*

- (Lond). 2011 Jul 13;8(1):51. doi: 10.1186/1743-7075-8-51. PMID: 21749725; PMCID: PMC3154144.
369. Shen W, Gaskins HR, McIntosh MK. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J Nutr Biochem.* 2014;25(3):270-80.
370. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci.* 7 déc 2017;18(12).
371. Cui C, Li Y, Gao H, Zhang H, Han J, Zhang D, et al. Modulation of the gut microbiota by the mixture of fish oil and krill oil in high-fat diet-induced obesity mice. *PloS One.* 2017;12(10):e0186216.
372. Pihlanto A, Mattila P, Mäkinen S, Pajari AM. Bioactivities of alternative protein sources and their potential health benefits. *Food Funct.* 2017 Oct 18;8(10):3443-3458. doi: 10.1039/c7fo00302a. PMID: 28804797.
373. Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ.* 2002 Mar 5;166(5):608-15. PMID: 11898942; PMCID: PMC99405.
374. Li Y, Rong Y, Bao L, Nie B, Ren G, Zheng C, Amin R, Arnold RD, Jeganathan RB, Huggins KW. Suppression of adipocyte differentiation and lipid accumulation by stearidonic acid (SDA) in 3T3-L1 cells. *Lipids Health Dis.* 2017 Sep 25;16(1):181. doi: 10.1186/s12944-017-0574-7. PMID: 28946872; PMCID: PMC5613458.
375. Kumar Singh A, Cabral C, Kumar R, Ganguly R, Kumar Rana H, Gupta A, Rosaria Lauro M, Carbone C, Reis F, Pandey AK. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. *Nutrients.* 2019 Sep 13;11(9):2216. doi: 10.3390/nu11092216. PMID: 31540270; PMCID: PMC6770155.
376. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and the metabolic syndrome. *Gut Microbes.* févr 2012;3(1):29-34.
377. Anhe, F.F., et al., 2018. Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. *Gut* 68 (3), 453–464.
378. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 911–917.
379. Everard, A., H. Plovier, M. Rastelli, M. V. Hul, A. de W. d'Oplinter, L. Geurts, C. Druart, S. Robine, N. M. Delzenne, G. G. Muccioli, W. M. de Vos, S. Luquet, N. Flamand, V. D. Marzo, and P. D. Cani. 2019. Intestinal epithelial N -acylphosphatidylethanolamine phospholipase D links dietary fat to metabolic adaptations in obesity and steatosis. *Nature Communications.* 10: 457.
380. Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods.* 13: 581–583.
381. Anderson, M. J. 2017. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.* pp. 1–15. , American Cancer Society. [online] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118445112.stat07841> (Accessed June 26, 2019).
382. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism.* 2015;64(1):13-23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010.
383. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017.
384. Salgado AL, Carvalho Ld, Oliveira AC, Santos VN, Vieira JG, Parise ER. Insulin

- resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. *Arq Gastroenterol.* 2010 Apr-Jun;47(2):165-9. doi: 10.1590/s0004-28032010000200009. PMID: 20721461.
385. Alessi MC, Juhan-Vague I. Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2004 Jun;97(6):673-8. PMID: 15283042.
386. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1879-83. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01420.x. PMID: 16102055.
387. Acosta JR, Tavira B, Douagi I, Kulyté A, Arner P, Rydén M, Laurencikiene J. Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Oct 1;104(10):4552-4562. doi: 10.1210/jc.2019-00341. PMID: 31132124.
388. Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine.* 2004 Mar-Apr;23(2-3):177-82. doi: 10.1385/ENDO:23:2-3:177. PMID: 15146098.
389. Paulina M Opyd, Adam Jurgoński, Bartosz Fotschki, Jerzy Juśkiewicz, Dietary Hemp Seeds More Effectively Attenuate Disorders in Genetically Obese Rats than Their Lipid Fraction, *The Journal of Nutrition*, Volume 150, Issue 6, June 2020, Pages 1425–1433, <https://doi-org.acces.bibl.ulaval.ca/10.1093/jn/nxaa081>.
390. Shafie SR, Wanyonyi S, Panchal SK, Brown L. Linseed Components Are More Effective Than Whole Linseed in Reversing Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Nutrients.* 2019;11(7):1677. Published 2019 Jul 22. doi:10.3390/nu11071677.
391. Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: an overview. *Euphytica.* 2004;140:65–72.
392. Porto CD, Decorti D, Tubaro F. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind Crops Prod.* 2012;36(1):401–4.
393. Baker EJ, Miles EA, Burdge GC, Yaqoob P, Calder PC. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Prog Lipid Res.* 2016 Oct;64:30-56. doi: 10.1016/j.plipres.2016.07.002. Epub 2016 Aug 3. PMID: 27496755.
394. Dietary echium oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. Surette ME, Edens M, Chilton FH, Tramposch KM *J Nutr.* 2004 Jun; 134(6):1406-11.
395. Influences of stearidonic acid-enriched soybean oil on the blood and organ biochemical parameters in rats. Kawabata T, Shimoda K, Horiguchi S, Domon M, Hagiwara C, Takiyama M, Kagawa Y *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013 Feb; 88(2):179-84.
396. Echium oil reduces atherosclerosis in apoB100-only LDLrKO mice. Forrest LM, Boudyguina E, Wilson MD, Parks JS *Atherosclerosis.* 2012 Jan; 220(1):118-21.
397. Dietary echium oil increases long-chain n-3 PUFAs, including docosapentaenoic acid, in blood fractions and alters biochemical markers for cardiovascular disease independently of age, sex, and metabolic syndrome. Kuhnt K, Fuhrmann C, Köhler M, Kiehntopf M, Jahreis G *J Nutr.* 2014 Apr; 144(4):447-60.
398. Effect of Echium oil compared with marine oils on lipid profile and inhibition of hepatic steatosis in LDLr knockout mice. Botelho PB, Mariano Kda R, Rogero MM, de Castro IA *Lipids Health Dis.* 2013 Mar 19; 12():38.
399. Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics. Arm JP, Boyce JA, Wang L, Chhay H, Zahid M, Patil V, Govindarajulu U, Ivester P, Weaver KL, Sergeant S, Israel E, Chilton FH *Lipids Health Dis.*

2013 Oct 2; 12():141.

400. Stearidonic acid-enriched flax oil reduces the growth of human breast cancer in vitro and in vivo. Subedi K, Yu HM, Newell M, Weselake RJ, Meesapyodsuk D, Qiu X, Shah S, Field CJ *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jan; 149(1):17-29.

401. Harris, W.S., Tintle, N.L., Imamura, F. et al. Blood n-3 fatty acid levels and total and cause-specific mortality from 17 prospective studies. *Nat Commun* 12, 2329 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22370-2>.

402. Brown KM, Sharma S, Baker E, Hawkins W, van der Merwe M, Puppa MJ. Delta-6-desaturase (FADS2) inhibition and omega-3 fatty acids in skeletal muscle protein turnover. *Biochem Biophys Rep.* 2019;18:100622. Published 2019 Mar 15. doi:10.1016/j.bbrep.2019.100622.

403. Zhu L, Sha L, Li K, et al. Dietary flaxseed oil rich in omega-3 suppresses severity of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in rats. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):20. Published 2020 Feb 7. doi:10.1186/s12944-019-1167-4.

404. Millman J, Okamoto S, Kimura A, et al. Metabolically and immunologically beneficial impact of extra virgin olive and flaxseed oils on composition of gut microbiota in mice. *Eur J Nutr.* 2020;59(6):2411-2425. doi:10.1007/s00394-019-02088-0.

405. Li XY, Liu YH, Wang B, Chen CY, Zhang HM, Kang JX. Identification of a sustainable two-plant diet that effectively prevents age-related metabolic syndrome and extends lifespan in aged mice. *J Nutr Biochem.* 2018 Jan;51:16-26. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.09.003. Epub 2017 Sep 19. PMID: 29080417.

406. Guil-Guerrero, J.L. (2007), Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 1226-1236. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700207>.

407. Jeromson S., Gallagher I., Galloway S., Hamilton D. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. *Mar. Drugs.* 2015;13(12):6977–7004. doi: 10.3390/md13116977.

408. Ruxton C.H.S., Reed S.C., Simpson M.J.A., Millington K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2004;20(3):275–285.

409. Su H., Zhou D., Pan Y.-X., Wang X., Nakamura M.T. Compensatory induction of Fads1 gene expression in heterozygous Fads2-null mice and by diet with a high n-6/n-3 PUFA ratio. *JLR (J. Lipid Res.)* 2016;57(11):1995–2004. doi: 10.1194/jlr.M064956.

410. Jay Whelan, Dietary Stearidonic Acid Is a Long Chain (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid with Potential Health Benefits, *The Journal of Nutrition*, Volume 139, Issue 1, January 2009, Pages 5–10, <https://doi.org/10.3945/jn.108.094268>.

411. Surette ME, Edens M, Chilton FH, Trampusch KM. Dietary echium oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. *J Nutr.* 2004;134:1406–11.

412. James MJ, Ursin VM, Cleland LG. Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1140–5.

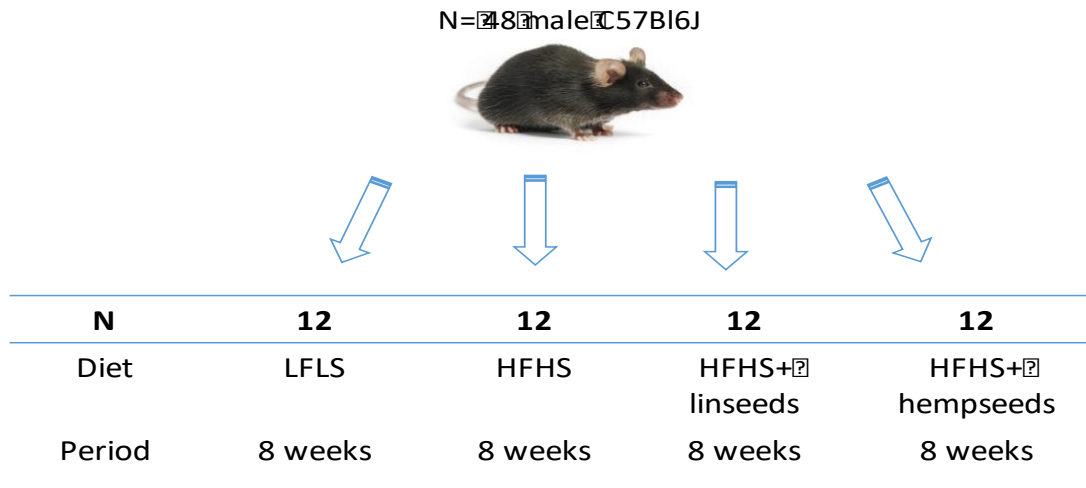
413. Harris WS, Dirienzo MA, Sands SA, George C, Jones PG, Eapen AK. Stearidonic acid increases the red blood cell and heart eicosapentaenoic acid content in dogs. *Lipids.* 2007;42:325–33.

414. Miles EA, Banerjee T, Calder PC. The influence of different combinations of gamma-linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;70:529–38.

415. Harris WS, Lemke SL, Hansen SN, Goldstein DA, Dirienzo MA, Su H, Nemeth MA, Taylor ML, Ahmed G, et al. Stearidonic acid-enriched soybean oil increased the omega-3 index, an emerging cardiovascular risk marker. *Lipids*. 2008;43:805–11.
416. Miles EA, Banerjee T, Dooper MM, M'Rabet L, Graus YM, Calder PC. The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr*. 2004 Jun;91:893-903.
417. Aung T, Halsey J, Kromhout D, Gerstein HC, Marchioli R, Tavazzi L, Geleijnse JM, Rauch B, Ness A, Galan P, Chew EY, Bosch J, Collins R, Lewington S, Armitage J, Clarke R; Omega-3 Treatment Trialists' Collaboration. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA Cardiol*. 2018 Mar 1;3(3):225-234. doi: 10.1001/jamacardio.2017.5205. PMID: 29387889; PMCID: PMC5885893.
418. Harris, W.S., Tittle, N.L., Imamura, F. et al. Blood n-3 fatty acid levels and total and cause-specific mortality from 17 prospective studies. *Nat Commun* 12, 2329 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22370-2>.
419. Ishihara K, Komatsu W, Saito H, Shinohara K. Comparison of the effects of dietary alphinolenic, stearidonic, and eicosapentaenoic acids on production of inflammatory mediators in mice. *Lipids*. 2002 May;37:481-6.
420. Surette ME, Edens M, Chilton FH, Tramposch KM. Dietary echium oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. *J Nutr*. 2004 Jun;134:1406-11.
421. Echium oil reduces atherosclerosis in apoB100-only LDLrKO mice. Forrest LM, Boudyguina E, Wilson MD, Parks JS *Atherosclerosis*. 2012 Jan; 220(1):118-21.
422. Influences of stearidonic acid-enriched soybean oil on the blood and organ biochemical parameters in rats. Kawabata T, Shimoda K, Horiguchi S, Domon M, Hagiwara C, Takiyama M, Kagawa Y *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013 Feb; 88(2):179-84.
423. Effect of Echium oil compared with marine oils on lipid profile and inhibition of hepatic steatosis in LDLr knockout mice. Botelho PB, Mariano Kda R, Rogero MM, de Castro IA *Lipids Health Dis*. 2013 Mar 19; 12():38.
424. Dietary echium oil increases long-chain n-3 PUFAs, including docosapentaenoic acid, in blood fractions and alters biochemical markers for cardiovascular disease independently of age, sex, and metabolic syndrome. Kuhnt K, Fuhrmann C, Köhler M, Kiehntopf M, Jahreis G *J Nutr*. 2014 Apr; 144(4):447-60.
425. Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics. Arm JP, Boyce JA, Wang L, Chhay H, Zahid M, Patil V, Govindarajulu U, Ivester P, Weaver KL, Sergeant S, Israel E, Chilton FH *Lipids Health Dis*. 2013 Oct 2; 12():141.
426. Stearidonic acid-enriched flax oil reduces the growth of human breast cancer in vitro and in vivo. Subedi K, Yu HM, Newell M, Weselake RJ, Meesapyodsuk D, Qiu X, Shah S, Field CJ *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jan; 149(1):17-29.
427. Li Y, Rong Y, Bao L, et al. Suppression of adipocyte differentiation and lipid accumulation by stearidonic acid (SDA) in 3T3-L1 cells. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):181. Published 2017 Sep 25. doi:10.1186/s12944-017-0574-7.
428. Frankel EN, Satue-Gracia T, Meyer AS, German JB. Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*. 2002;50:2094–9.

429. Coupland, K. and A. Hebard. 2002. Stearidonic acid containing plant-seed oils: Their potential for use in healthy foods. 93rd AOCS Annual meeting and Expo. May 5–8, 2002. Montreal, Quebec, Canada.
430. Callaway, J.C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140, 65–72 (2004). <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>.
431. Nematbakhsh S, Pei Pei C, Selamat J, Nordin N, Idris LH, Abdull Razis AF. Molecular Regulation of Lipogenesis, Adipogenesis and Fat Deposition in Chicken. *Genes* (Basel). 2021;12(3):414. Published 2021 Mar 13. doi:10.3390/genes12030414.
432. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-36. doi: 10.1146/annurev-biochem-052110-115718. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22463691.
433. Ralston JC, Matravadia S, Gaudio N, Holloway GP, Mutch DM. Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function. *Obesity* (Silver Spring). 2015;23(4):725-728. doi:10.1002/oby.21035.
434. Castonguay-Paradis, S., Lacroix, S., Rochefort, G. et al. Dietary fatty acid intake and gut microbiota determine circulating endocannabinoid signaling beyond the effect of body fat. *Sci Rep* 10, 15975 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72861-3>.
435. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2645. Published 2017 Dec 7. doi:10.3390/ijms18122645.
436. Bosch-Bouju, C., & Layé, S. (2016). Dietary omega-6/omega-3 and endocannabinoids: implications for brain health and diseases. *Cannabinoids in Health and Disease*, 111-142.
437. Chemical aspects of the composition of industrial hempseed products, Mykola Oseyko¹, Nataliia Sova², Maryna Lutsenko³, Viktoriia Kalyna² (DOI: 10.24263/2304-974X-2019-8-3-11).
438. Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D’Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. *Nutrients*. 2018;11(1):46. Published 2018 Dec 27. doi:10.3390/nu11010046.
439. D.J. Millward, Protein: requirements and role in diet, Reference Module in Food Science, Elsevier, 2021,.
440. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164-174.
441. Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):37-46. doi: 10.1172/JCI118404. PMID: 8550848; PMCID: PMC507060.

Annexes



Accommodation: 1 mouse/cage

Suppl. Figure 1: Experimental model



D12450H, D12451, and Formulas

Formulated by:
Juliet Gentile
Research Diets, Inc.
April 2019

Rodent Diet With 10 or 45 Kcal% Fat
and Same With Lin Seed or Hemp Seed

Product #	D12450J	D12451	Formula 1	Formula 2
Ingredient	gm	gm	gm	gm
Casein	200	200	182.4	171.1
L-Cystine	3	3	3	3
Corn Starch	506.2	72.8	34	44
Maltodextrin 10	125	100	100	100
Sucrose	68.8	172.8	172.8	172.8
Cellulose, BW200	50	50	50	50
Soybean Oil	25	25	25	25
Lard	20	177.5	147.1	147.11
Lin Seed	0	0	95.3	0
Hemp Seed	0	0	0	96.5
Mineral Mix S10026	10	10	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	16.5	16.5	16.5
Vitamin Mix V10001	10	10	10	10
Choline Bitartrate	2	2	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.04	0	0.05	0
FD&C Red Dye #40	0	0.05	0	0.025
FD&C Blue Dye #1	0.01	0	0	0.025
Total	1055.05	858.15	866.65	866.56
Kcal Fat From Lin Seed	0	0	273.6	0
Kcal% of Fat from Lin Seed	0%	0%	15.0%	0%
Total Kcal% Fat From Lin	0%	0%	7%	0%
Kcal Fat From Hemp Seed	0	0	0	273.6
Kcal% of Fat from Hemp Seed	0%	0%	0%	15.0%
Total Kcal% Fat From Hemp	0%	0%	0%	7%
gm				
Protein	203.0	203.0	203.0	203.0
Carbohydrate	710.0	355.6	355.6	355.6
Fat	45.0	202.5	202.5	202.5
gm%				
Protein	19%	24%	23%	23%
Carbohydrate	67%	41%	41%	41%
Fat	4%	24%	23%	23%
kcal				
Protein	812	812	812	812
Carbohydrate	2840	1422	1422	1422
Fat	405	1823	1823	1823
Total	4057	4057	4057	4057
kcal%				
Protein	20%	20%	20%	20%
Carbohydrate	70%	35%	35%	35%
Fat	10%	45%	45%	45%
Total	100%	100%	100%	100%

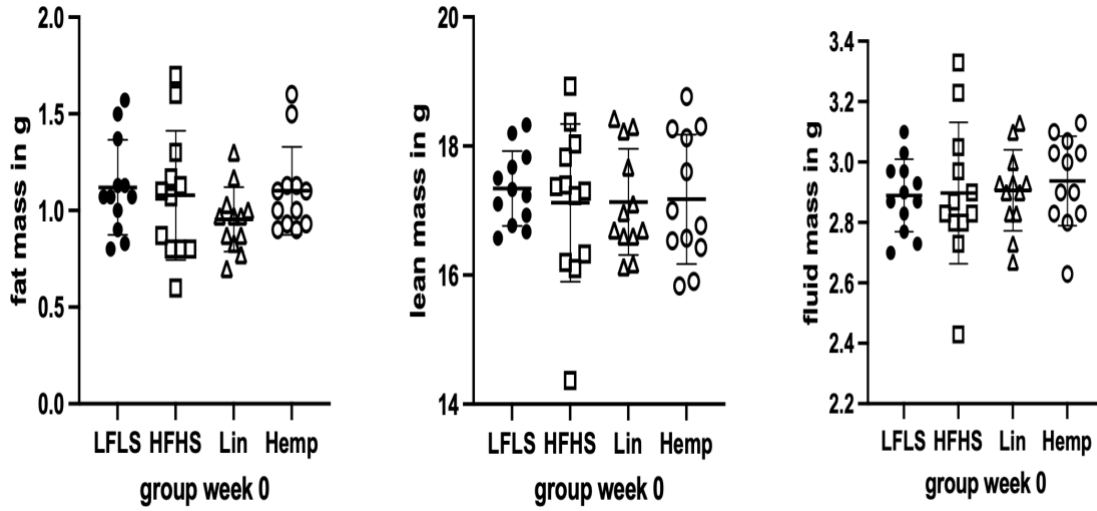
Research Diets, Inc.
20 Jules Lane
New Brunswick, NJ 08901 USA
info@researchdiets.com

BenNecibr01.for

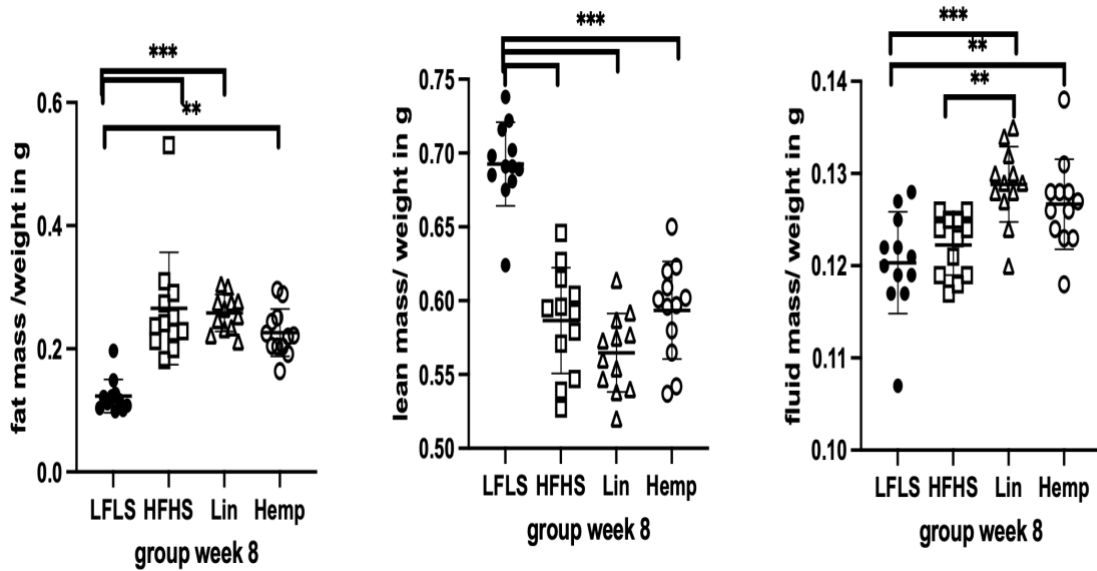


Suppl. Figure 2: diets composition.

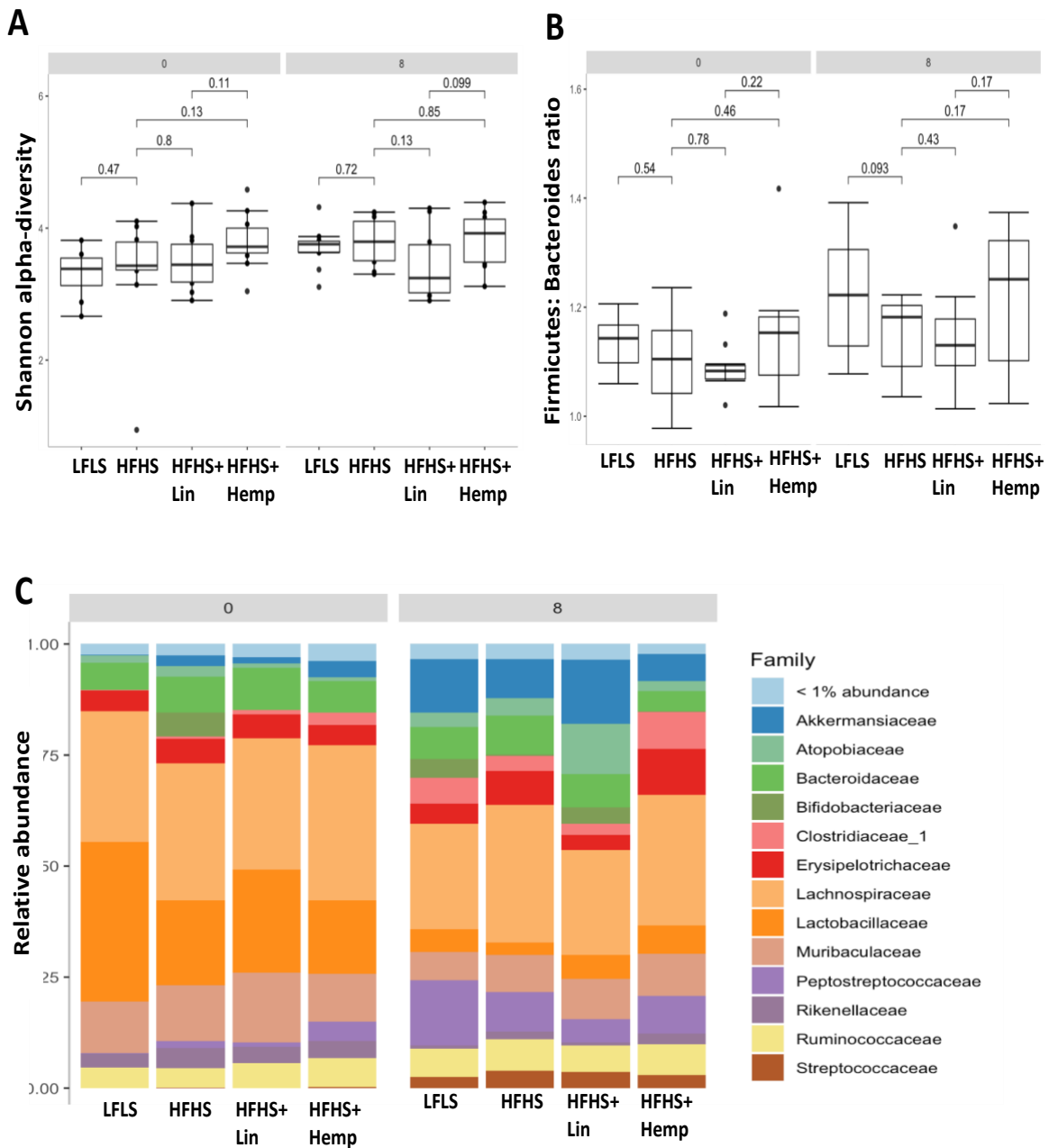
A



B



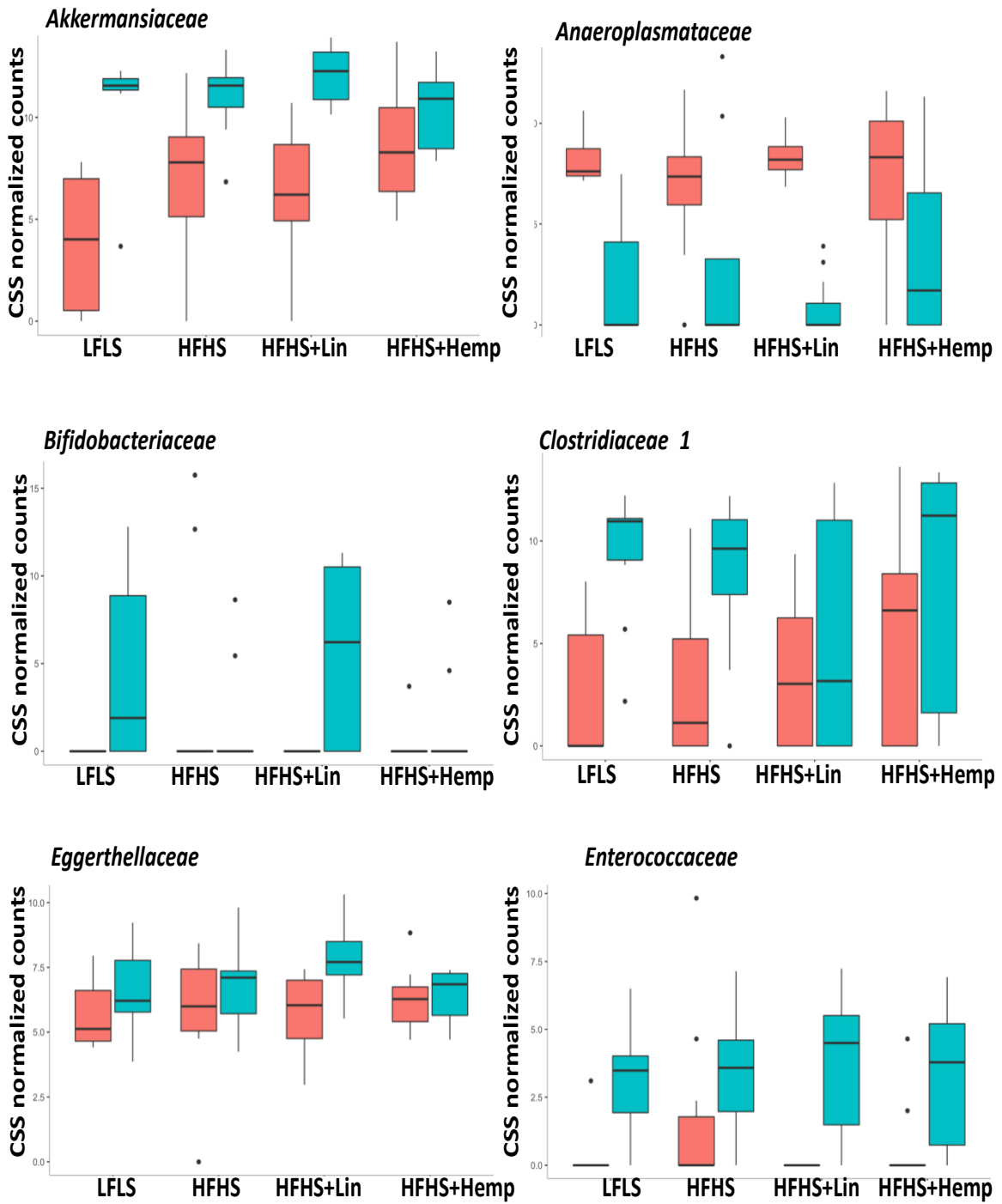
Suppl. Figure 3: (A) Body composition at week 0; (B) body composition at week 8 corrected by the total body weight. ** (p < 0.01); *** (p < 0.001)

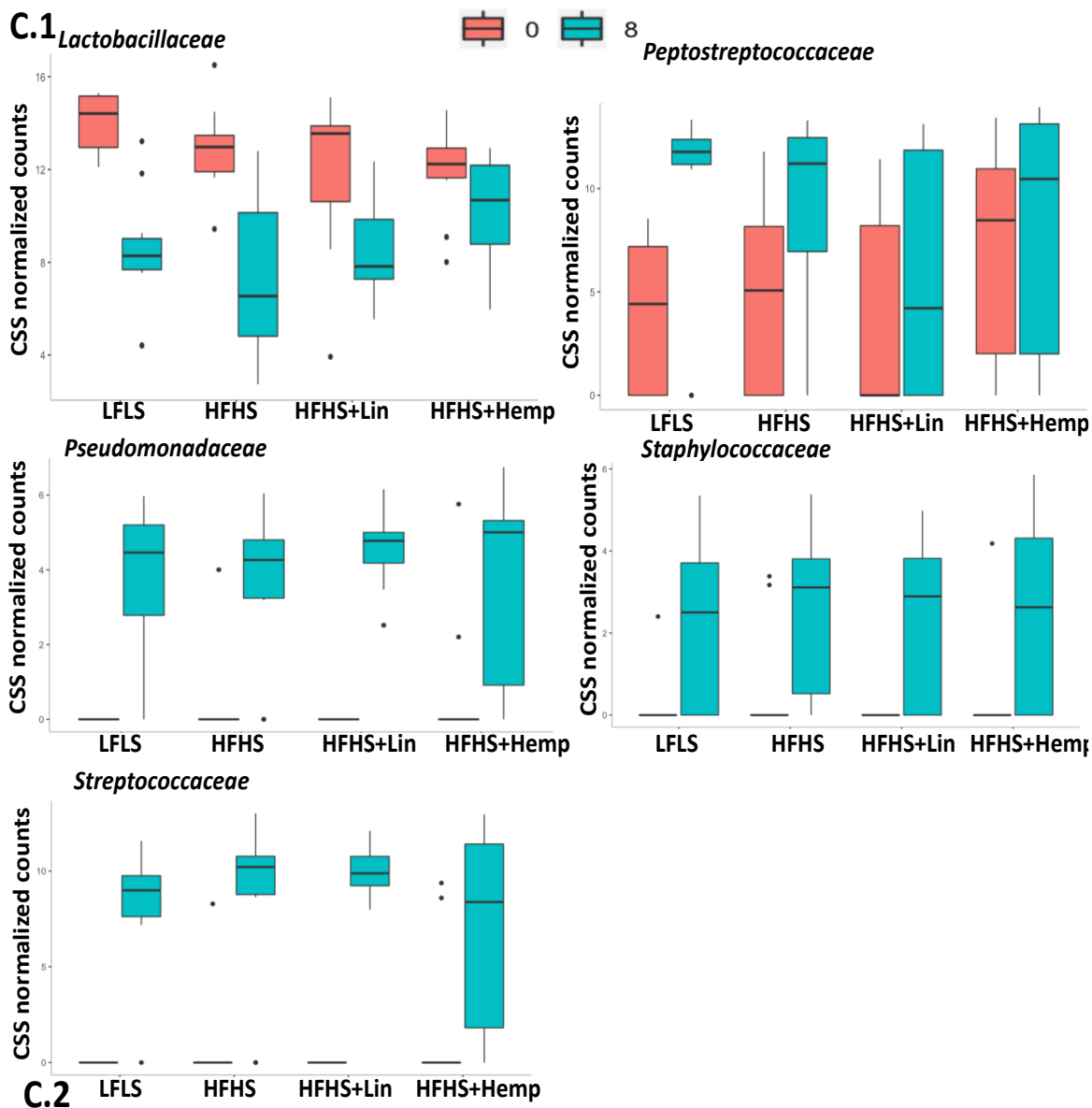


Suppl. Figure 4

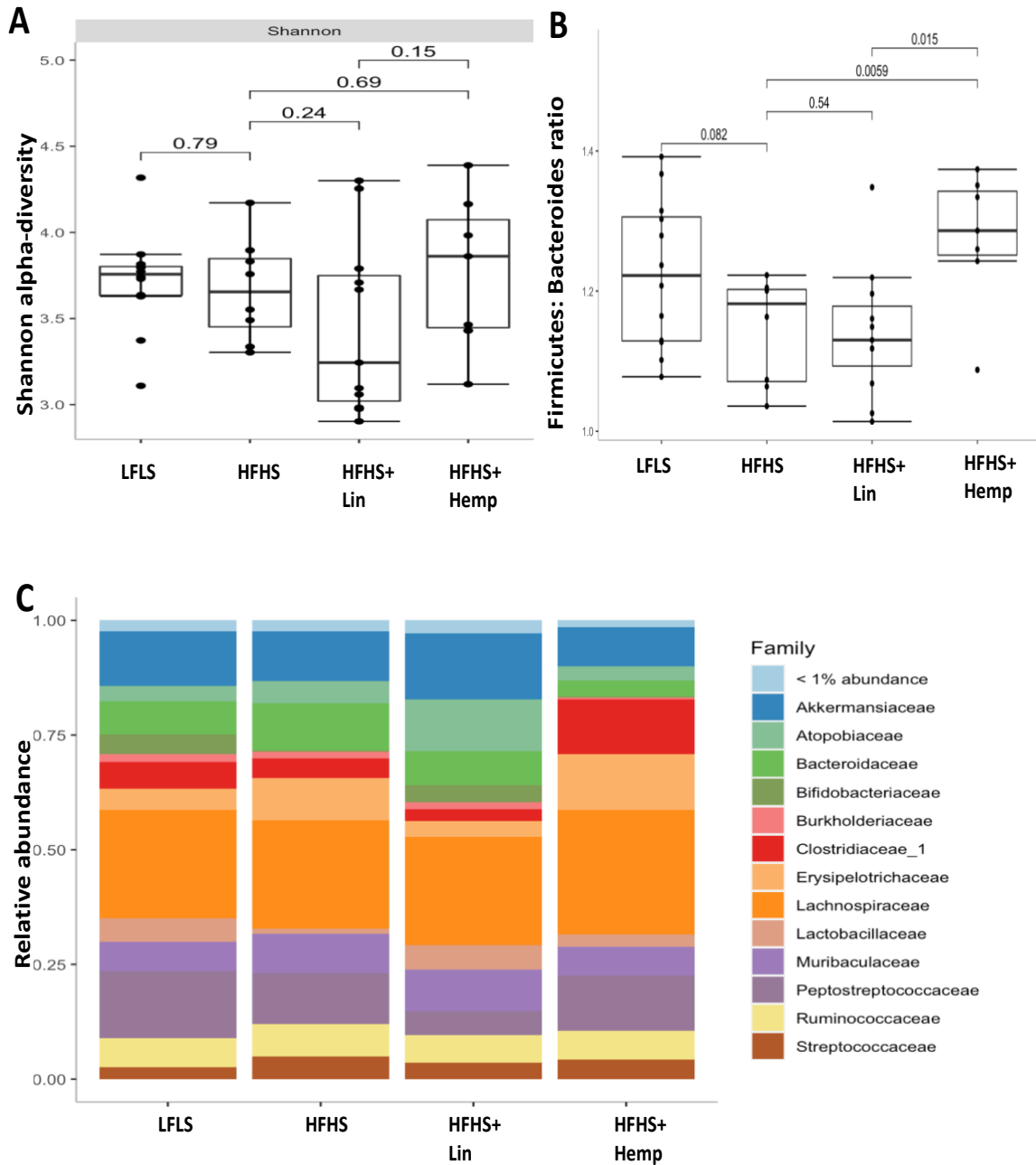
(A) Shannon alpha-diversity index evaluates gut microbiota richness and evenness before (day0) and after the dietary supplementations. Asterisks (if none: ns) displayed in top left corner represent Wilcoxon p-values * $p < 0.05$. **(B)** Firmicutes to Bacteroidetes ratio is often positively associated to diet-induced obesity and dysmetabolisms. Asterisks (if none: ns) displayed above the first box represent Wilcoxon p-values * $p < 0.05$. **(C)** The plots detail the relative abundances of the most prevalent bacterial taxa (at least 1%) shown for Family level.

C.1





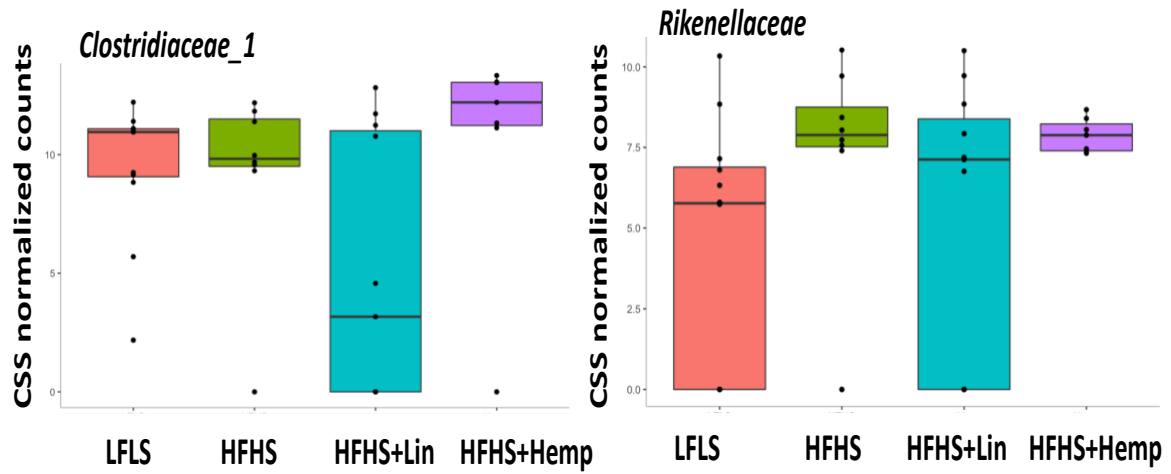
(C.1) Visualisation of individual taxa. (C.2) The table list two-way ANOVA (taxa ~ Group * Time) followed by TukeyHSD post-hoc p-values. Note that only $p < 0.1$ are displayed.



Suppl. Figure 5

(A) Shannon alpha-diversity index evaluates gut microbiota richness and evenness between the different dietary supplementations. Asterisks (if none: ns) displayed in top left corner represent Wilcoxon p-values * $p < 0.05$. **(B)** Firmicutes to Bacteroidetes ratio is often positively associated to diet-induced obesity and dysmetabolisms. Asterisks (if none: ns) displayed above the first box represent Wilcoxon p-values * $p < 0.05$. **(C)** The plots detail the relative abundances of the most prevalent bacterial taxa (at least 1%) shown for Family level.

C.1



C.2

Gut microbiota composition						
	HFHS- LFLS	Lin- LFLS	Hemp- LFLS	Lin- HFHS	Hemp- HFHS	Hemp- Lin
<i>Clostridiaceae_1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	0,049
<i>Rikenellaceae</i>	0,029	ns	0,014	ns	ns	ns

(C.1) Visualisation of individual taxa. (C.2) The table list two-way ANOVA (taxa ~ Group * Time) followed by TukeyHSD post-hoc p-values. Note that only p < 0.1 are displayed.

Suppl. Table 1: List of the lipid mediators used as internal standard for LC/MS-MS analyses

Lipid mediators symbol	Lipid mediators name
AEA	d4-Anandamide
PEA	d4- <i>N</i> -palmitoyl-ethanolamine
SEA	stearoyl ethanolamine
OEA	d4- <i>N</i> -oleoyl-ethanolamine
LEA	d4- <i>N</i> -linoleoyl-ethanolamine
EPEA	d4- <i>N</i> -eicosapentaenoyl-ethanolamine
DPEA.n.3	docosapentaenoyl ethanolamide
DHEA	d4- <i>N</i> -docosahexaenoyl-ethanolamine
DPEA.n.6	
1.2-AG	d5-Mono-arachidonoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-PG	Mono-palmitoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-OG	2-oleoyl-glycerol
1.2-LG	d5-Mono-linoleoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-SDG	stearidonoyl-glycerol
1.2-EPG	d5-Mono-eicosapentaenoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-DPG (n-3)	d5-Mono-docosapentaenoyl-glycerol 1(3) and 2 isomers
1.2-DHG	docosahexaenoyl-glycerol
AA	d8-Arachidonic acid
SDA	stearidonic acid
LA	linoleic acid
EPA	d5-Eicosapentaenoic acid
DPA	d5-Docosapentaenoic acid
DHA	d5-Docosahexaenoic acid
13.HODE.G	13-hydroxyoctadecadienoic acid
PGD2	d4-Prostaglandin D2
PGE2	d4-Prostaglandin E2
PGF1	d4-Prostaglandin F1
PGF2	d4-Prostaglandin F2
Arachidonoyl Serotonin	<i>N</i> -Arachidonoyl Serotonin

Suppl. Table 2: List of the genes analyzed by qPCR array

Gene symbol	Gene name	Function
<i>Adgrf1</i>	adhesion G protein coupled receptor F1	receptor
<i>Cacna1b</i>	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1B subunit	receptor
<i>Cacna1h</i>	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	receptor
<i>Cnr1</i>	cannabinoid receptor 1	receptor
<i>Cnr2</i>	cannabinoid receptor 2	receptor
<i>Gpr119</i>	G protein-coupled receptor 119	receptor
<i>Gpr18</i>	G protein-coupled receptor 18	receptor
<i>Gpr55</i>	G protein-coupled receptor 55	receptor
<i>Ppara</i>	peroxisome proliferator activated receptor alpha	receptor
<i>Pparg</i>	peroxisome proliferator activated receptor gamma	receptor
<i>Ptgfr</i>	prostaglandin F receptor	receptor
<i>Trpa1</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1	ligand-activated channel
<i>Trpm8</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	ligand-activated channel
<i>Trpv1</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	ligand-activated channel
<i>Trpv2</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	ligand-activated channel
<i>Trpv4</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	ligand-activated channel
<i>Abhd4</i>	abhydrolase domain containing 4	anabolic enzyme for NAEs
<i>Akr1b3</i>	aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)	anabolic enzyme for prostamides, catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Fam213b</i>	family with sequence similarity 213, member B	anabolic enzyme for prostamides, catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Gdel</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	anabolic enzyme for NAEs
<i>Gdpd1</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	anabolic enzyme for NAEs

<i>Glyat13</i>	glycine-N-acyltransferase-like 3	anabolic enzyme for N-acyl-glycines
<i>Hrasls5</i>	HRAS-like suppressor family, member 5	anabolic enzyme for NAEs
<i>Inpp5d</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	anabolic enzyme for NAEs
<i>Napepld</i>	N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D-like enzyme	anabolic enzyme for NAEs
<i>Pla2g10</i>	phospholipase A2, group X	anabolic enzyme for NAEs
<i>Pla2g4e</i>	phospholipase A2, group IVE	calcium-dependent N-acyltransferase that generates NAE biosynthetic precursors
<i>Pla2g5</i>	phospholipase A2, group V	AA-releasing enzyme possibly involved in phospholipid remodeling and hence biosynthesis of eCB precursors
<i>Ptgs2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	anabolic enzyme for prostamides, catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Ptpn22</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	anabolic enzyme for AEA
<i>Ptges</i>	prostaglandin E synthase	anabolic enzyme for prostamides, catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Comt</i>	catechol-O-methyltransferase	catabolic enzyme for N-acyl-dopamines
<i>Faah</i>	fatty acid amide hydrolase	catabolic enzyme for NAEs, primary fatty acid amides, N-acyl-taurines and N-acyl-glycines
<i>Naaa</i>	N-acylethanolamine acid amidase	catabolic enzyme for saturated NAEs
<i>Pam</i>	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	anabolic enzyme for primary fatty acid amides, catabolic enzyme for N-acyl-glycines
<i>Dagla</i>	diacylglycerol lipase, alpha	anabolic enzyme for 2-acylglycerols

<i>Daglb</i>	diacylglycerol lipase, beta	anabolic enzyme for 2-acylglycerols
<i>Dgke</i>	diacylglycerol kinase, epsilon	anabolic/catabolic enzyme for 2-acylglycerols
<i>Enpp2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	autotaxin- a LysoPLD: produces LPA.
<i>Plala</i>	phospholipase A1 member A	anabolic enzyme for 2-acylglycerols
<i>Plcb1</i>	phospholipase C, beta 1	anabolic enzyme for 2-acylglycerols
<i>Abhd12</i>	abhydrolase domain containing 12	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Abhd16a</i>	abhydrolase domain containing 16	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Abhd6</i>	abhydrolase domain containing 6	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Agk</i>	acylglycerol kinase	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Alox12</i>	arachidonate 12-lipoxygenase	catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Alox15</i>	arachidonate 15-lipoxygenase	catabolic enzyme for AEA and 2-AG
<i>Ces1d</i>	carboxylesterase 1D	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Ces2h</i>	carboxylesterase 2H	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Mgll (Magl)</i>	monoglyceride lipase	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Mogat1</i>	monoacylglycerol O-acyltransferase 1	catabolic enzyme for monoacylglycerols
<i>Ppt1</i>	palmitoyl-protein thioesterase 1	catabolic enzyme for 2-AG
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	reference gene
<i>Hprt</i>	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	reference gene
<i>Rps13</i>	ribosomal protein S13	reference gene
<i>Tbp</i>	TATA box binding protein	reference gene