DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

INRAE

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Nutrition et pathologies métaboliques*

Par

Amran DAHER ABDI

Etude de l'effet protecteur chez la descendance de la supplémentation maternelle en acide docosahexaénoïque (DHA) pendant la gestation et la lactation contre les altérations métaboliques et cognitives induites par une alimentation hypercalorique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 27 septembre 2021

Unité de recherche : UMR 1280 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN)

Composition du Jury :

Présidente :	
Odile SERGENT	Professeure des Universités - Université de Rennes
Rapporteurs :	
Rémi HOULGATE	Directeur de Recherche – INSERM Nancy
Luciano PIROLA	Chargé de Recherche – INSERM Lyon
Examinatrices :	
Frédérique SAVAGNER	Professeure des Universités - Praticien Hospitalier - Université de Toulouse
Virginie MIMOUNI	Maître de Conférences - Université de Le Mans
Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ	Professeure des Universités - Praticien Hospitalier - Université de Nancy
Directeur de thèse :	
Francisco BOLAÑOS-JIMÉNEZ	Chargé de Recherche - INRAE Pays de la Loire
Co-encadrant de thèse :	
Mikaël CROYAL	Ingénieur de Recherche - Université de Nantes

Titre : Etude de l'effet protecteur chez la descendance de la supplémentation maternelle en acide docosahexaénoïque (DHA) pendant la gestation et la lactation contre les altérations métaboliques et cognitives induites par une alimentation hypercalorique

Mots clés : obésité, dénutrition maternelle, gestation, DHA, descendance, lipides.

Résumé : La sous-alimentation ou la suralimentation maternelle sensibilise la progéniture au développement de maladies métaboliques et cognitives. Cependant, une supplémentation en nutriments spécifiques pendant la grossesse peut potentiellement inverser et/ou protéger contre les effets délétères d'une mauvaise alimentation. L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer dans quelle mesure et par quels mécanismes la supplémentation maternelle en acide docosahexaénoïque (DHA) pendant la gestation et la lactation, chez le rat, protège la progéniture contre les désordres cognitifs et métaboliques induits par la dénutrition maternelle ou par une alimentation hypercalorique. Les résultats obtenus montrent que la supplémentation maternelle en DHA prévient le développement, chez la progéniture, de l'intolérance au glucose et la stéatose hépatique associés à l'obésité en inhibant l'expression de gènes qui favorisent la glycolyse, la lipogenèse et la synthèse de triglycérides. En outre, les rats de mères dénutries supplémentées en DHA ont montré de meilleures performances cognitives dans les tests d'anxiété et d'interaction sociale que leurs congénères nés de mères dénutries supplémentées avec du placebo. Nous concluons que la supplémentation maternelle en DHA améliore le développement cognitif de l'enfant et favorise un état métabolique sain en protégeant contre les effets délétères d'un régime obésogène.

Title: Study of the protective effect in the offspring of maternal supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) during gestation and lactation against metabolic and cognitive alterations induced by high-calorie diet

Keywords: obesity, maternal undernutrition, gestation, DHA, offspring, lipids.

Abstract: Maternal under- or over-nutrition sensitizes the offspring to the development of metabolic and cognitive diseases. However, supplementation with specific nutrients during pregnancy can potentially reverse and/or protect against the deleterious effects of unhealthy feeding. The aim of this thesis was to determine to what extent, and by which mechanisms, maternal DHA supplementation during gestation and lactation, in rats, protects the offspring against cognitive and metabolic disorders induced by maternal undernutrition or by a hypercaloric diet. Our results show that maternal DHA supplementation prevents the development, in the offspring, of glucose intolerance and hepatic steatosis associated with obesity by inhibiting the expression of genes that promote glycolysis, lipogenesis, and triglyceride synthesis. In addition, rats from undernourished mothers supplemented with DHA showed better cognitive performance in anxiety and social interaction tests than their counterparts from undernourished mothers supplemented with placebo. These observations allow to conclude that maternal DHA supplementation may not only improve the child's cognitive development, but also promote a healthy metabolic state and exert a protective effect against the deleterious effects of an obesogenic diet.

Ce travail est dédié

à mes très chers parents, Daher et Safia.

REMERCIEMENTS

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il apparaît opportun de commencer ce mémoire de thèse par des remerciements, à ceux qui m'ont beaucoup appris et aidé au cours de ces trois belles années de thèse.

Dans un premier temps, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ***Dr Francisco BOLAÑOS JIMENEZ*** de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse, de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi. Merci également pour tout le savoir que vous m'avez transmis avec passion, pédagogie et calme. Un immense merci également à ***Dr Mikaël CROYAL*** pour m'avoir guidé dans certaines de mes expériences et pour m'avoir accompagné sur la dernière ligne droite avec une telle bienveillance. Je vous en suis reconnaissante et vous avez énormément contribué à mon épanouissement professionnel.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse en dépit de leur charge de travail. Ainsi, je remercie ***Professeure Odile SERGENT*** qui m'a fait honneur de présider ce jury de thèse. Un grand merci également au ***Dr Luciano PIROLA*** et au ***Dr Rémi HOULAGATE*** pour l'intérêt qu'ils ont porté pour mes travaux de thèse et à la lecture de mon manuscrit, en acceptant d'être rapporteurs. Je remercie enfin, ***Professeure Frédérique SAVAGNER, Professeure Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ*** et ***Dr Virginie MIMOUNI*** de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences, en acceptant d'examiner mes travaux.

C'est avec une sincère gratitude que je remercie ***Dr Justine BERTRAND-MICHEL*** et ***Dr José Juan ORDAZ-ORTIZ*** pour leur accompagnement mais surtout pour nos discussions scientifiques qui ont toujours été très instructives.

Un grand merci à ***Professeure Khadija Ouguerram*** de m'avoir fait bénéficier de ses compétences et pour ses précieux conseils dans cette étude ainsi que sa disponibilité.

Je souhaite également remercier ***Professeure Patricia PARNET*** et ***Professeur Dominique DARMAUN*** pour avoir eu la gentillesse de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche PhAN (Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles). Je remercie également toute ***l'équipe PhAN*** et plus particulièrement ***Isabelle GRIT*** pour toute l'aide apportée dans la réalisation de ce projet. Merci à toute l'unité, j'ai vraiment apprécié votre disponibilité, vos nombreux et précieux conseils scientifiques mais aussi lorsque j'ai pu rencontrer différents soucis techniques.

Je tiens également à remercier toute la « ***team*** » sans laquelle ces travaux n'auraient pas vu le jour. ***Dr Sandra*** et ***Dr Luis***, merci pour tout le savoir et compétences que vous m'avez transmis dans la joie et la bonne humeur. Je n'oublierai pas ces moments passés avec vous. Un spécial merci à mon binôme de tous les jours, ***Carla***, d'avoir rendu ces trois années de thèse plus « *fun* ». Je garderais toujours en tête nos fous rires à l'animalerie. Merci également à ***Juan*** pour l'aide dont je suis reconnaissante sur les dernières expériences de mes travaux de thèse. Ce fût un plaisir de travailler avec vous.

Sincères reconnaissances à mes ***parents*** envers qui je témoigne d'une gratitude sans commune mesure, vous êtes un modèle de force et de courage pour moi. J'espère que ce travail vous rendra fiers de moi et que je serai à la hauteur de vos attentes.

Ma très profonde gratitude à ***Amir*** de m'avoir toujours soutenu et donné la force d'aller au bout de mes rêves mais aussi d'avoir lu et corrigé mes travaux bien que ce n'était pas ton domaine d'expertise.

Un immense merci également à ***Souad*** pour ton amitié sincère et le soutien moral et intellectuel que tu m'as apporté tout au long de ces dernières années.

Enfin, **UN GRAND MERCI** à la grande famille ***DAHER ABDI*** de m'avoir encouragé et d'avoir cru en moi toute ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS **5**

LISTE DES FIGURES **9**

LISTE DES TABLEAUX **13**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **15**

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE **19**

II. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **23**

CHAPITRE I : L'OBÉSITÉ, UN PROBLÈME DE SANTÉ MAJEUR **25**

1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBÉSITÉ 27
   1.1. Définition et prévalence 27
   1.2. Étiologie 29
   1.3. Inflammation liée à l'obésité 31
2. COMORBIDITÉS ASSOCIÉES À L'OBÉSITÉ 31
   2.1. Maladies cardiovasculaires 31
   2.2. La stéatose hépatique non-alcoolique 33
      2.2.1. Définition et caractéristiques 33
      2.2.2. Prévalence et facteurs de risques 37
   2.3. Les déficits cognitifs 39
3. INTERVENTIONS THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE L'OBÉSITÉ 41
   3.1. Approches diététiques de l'obésité et exercices physiques 41
   3.2. Chirurgie bariatrique 43
   3.3. Avancées pharmacologiques dans le traitement de l'obésité 46

CHAPITRE II : LE CONCEPT DE PROGRAMMATION MÉTABOLIQUE 49

1. HYPOTHÈSE DES ORIGINES FŒTALES 51
2. RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTÉRIN (RCIU) 53
   2.1. Définition et Incidence 53
   2.2. Conséquences à long terme 55

CHAPITRE III : RÔLES DES LIPIDES DANS LES PATHOLOGIES MÉTABOLIQUES ET COGNITIVES 57

1. LES DIFFÉRENTES FAMILLES DES LIPIDES 59
2. LES SPHINGOLIPIDES 60
   2.1. Définition 60
   2.2. Les sphingomyélines 62
   2.3. Les céramides 64
      2.3.1. Synthèse et enzymes impliquées 64
      2.3.2. Rôles des céramides dans l'insulinorésistance 66
3. LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS 68
   3.1. Définition et structure 68
   3.2. Les aliments riches en acides gras polyinsaturés 70
   3.3. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 72
   3.4. L'acide docosahexaénoïque : l'allié du cerveau 74
4. SUPPLÉMENTATION EN OMÉGA-3 POUR LA PRÉVENTION DES ALTÉRATIONS COGNITIVES ET MÉTABOLIQUES 76
   4.1. La supplémentation en acide docosahexaénoïque (DHA) 76
   4.2. Mécanismes d'action du DHA 78

III. OBJECTIFS DE LA THÈSE 81

IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES 87

1. ANIMAUX 89
2. MODÈLE DE PROGRAMMATION MÉTABOLIQUE 89
3. COMPOSITIONS DES RÉGIMES 95
4. TEST DE RECONNAISSANCE DE NOUVEL OBJET (NOR) 95
5. TEST DE « *ELEVATED PLUS MAZE* » 96
6. TEST DES STÉRÉOTYPIES INDUITES PAR L'APOMORPHINE 98

7. TEST DE SOCIABILITÉ ET DE MÉMOIRE SOCIALE 99
8. ANALYSE QUANTITATIVE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 102
9. TEST DE TOLERANCE AU GLUCOSE 105
10. DOSAGE D'INSULINE, DE LEPTINE ET DES LIPIDES DANS LE SERUM 106
11. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL 106
12. WESTERN BLOT 107
13. RESONNANCE PARAMAGNETIQUE 109

V. RÉSULTATS ET DISCUSSION 111

Partie 1 "La supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation chez le rat protège la progéniture contre la stéatose hépatique induite par un régime alimentaire riche en calories." 113

a) RÉSULTATS 115

1. Quelles sont les conséquences métaboliques d'une supplémentation maternelle en DHA chez les descendants mâles âgés de 3 mois après un régime postnatal hypercalorique ? 115
2. Les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA observés chez les descendants mâles âgés de 3 mois perdurent-ils chez les animaux âgés de 6 mois et indépendamment du sexe ? 127

b) DISCUSSION 135

Partie 2 " Effet propre de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) : comparaison avec la supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6)" 147

a) RÉSULTATS 149

1. Les effets anti-stéatosiques de la supplémentation maternelle en DHA sont-ils liés aux propriétés spécifiques du DHA ou à sa charge lipidique ? 149
2. Quels sont les effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les profils lipidiques des descendants mâles âgés de 3 mois ? 167

b) DISCUSSION 173

Partie 3 “Effet de sexe dans les altérations cognitives et comportementales induites par l’obésité postnatale ou la dénutrition maternelle chez le rat et réversion par la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation.” 177

a) RÉSULTATS 179

1. Quel est l’effet de la supplémentation maternelle en DHA contre le déficit cognitif induit par l’obésité postnatale ? 179

2. Quel est l’effet de la supplémentation maternelle en DHA contre le retard de croissance postnatal induit par une dénutrition maternelle ? 182

3. La supplémentation maternelle en DHA peut- elle corriger les altérations comportementales induites par une dénutrition maternelle ? 184

b) DISCUSSION 197

VI. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 207

VII. CONCLUSION 217

VIII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 221

IX. ANNEXES 255

ANNEXE 1 : Résumés des communications et publications 257

ANNEXE 2 : Paramètres analytiques sélectionnés pour la quantification des sphingolipides 293

ANNEXE 3 : Illustration de l'électronébulisation 294

ANNEXE 4 : Schéma d'une source électrospray et exemples de spectres de masse 294

ANNEXE 5 : Détails des méthodes d'élution. 295

ANNEXE 6 : Détails des méthodes d'élution. 295

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Risque accru de maladies cardiovasculaires en cas d'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) 33

Figure 2 : Schéma de la progression de la stéatose hépatique non-alcoolique 34

Figure 3 : Images des coupes histologiques illustrant le contenu hépatique en lipides dans l'évolution de la stéatose hépatique non-alcoolique 35

Figure 4 : Métabolisme des triglycérides (TG) dans le foie. 36

Figure 5 : Prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et prévalence de l'obésité dans la population générale 38

Figure 6 : Effets de la surnutrition et de l'obésité sur le cerveau et la fonction cognitive 40

Figure 7 : Effets métaboliques bénéfiques de la chirurgie bariatrique et cross talk entre la chirurgie bariatrique, GLP-1 (peptide-1 de type glucagon) et FGF-19 (facteur de croissance des fibroblastes-19) 45

Figure 8 : Les causes multiples d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) 54

Figure 9 : Conséquences à long terme d'un retard de croissance intra-utérin 56

Figure 10 : Structure des sphingolipides 61

Figure 11 : Structure d'une sphingomyéline 63

Figure 12 : Structure d'un céramide 65

Figure 13 : Les différentes voies impliquées dans le métabolisme des céramides 65

Figure 14 : Inhibition du signal de l'insuline par les céramides 67

Figure 15 : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés : séries des oméga-3 et des oméga-6.. 69

Figure 16 : A : Structure de l'AAL ; B : Structure de l'EPA ; C : Structure du DHA 73

Figure 17 : Mécanismes d'action du DHA 80

Figure 18 : Modèle de programmation métabolique de l'expérimentation des animaux mâles âgés de 3 mois 90

Figure 19 : Modèle de programmation métabolique de l'expérimentation des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois 93

Figure 20 : Modèle de programmation métabolique d'une dénutrition maternelle de l'expérimentation des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois..... 94

Figure 21 : Illustration schématique du test de reconnaissance des nouveaux objets 96

Figure 22 : Configuration et dimensions du labyrinthe « Elevated plus maze (EPM) » pour le test d'anxiété chez le rat 97

Figure 23 : Comportement typique des rongeurs avec une anxiété faible ou élevée 98

Figure 24 : Représentation schématique du test de stéréotypie induite par l'apomorphine 99

Figure 25 : Configuration de la cage à trois chambres pour le test de sociabilité chez le rat..... 100

Figure 26 : Représentation schématique des tests de sociabilité et de reconnaissance sociale chez le rat 101

Figure 27 : Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse 104

Figure 28 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem, cas du triple quadripôle 105

Figure 29 : Représentation schématique de l'expérience du test de tolérance au glucose 105

Figure 30 : Spectre obtenu par RPE du 12-DSA inséré dans les membranes des échantillons..... 110

Figure 31 : Données anthropométriques et métaboliques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois 120

Figure 32 : Concentrations des lipides hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois ... 121

Figure 33 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les voies métaboliques hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois..... 126

Figure 34 : Test de tolérance au glucose chez les animaux mâles et femelles âgés de 6 mois 132

Figure 35 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les lipides hépatiques de la descendance mâle et femelle âgée de 6 mois 133

Figure 36 : Effet inhibiteur des AGPI sur l'activation et la translocation de ChREBP 143

Figure 37 : Régulation de l'activité de ChREBP et son impact dans la composition des lipides hépatiques 144

Figure 38 : Impact des acides gras polyinsaturés (AGPI) sur les voies du métabolisme hépatique des glucides et des lipides..... 145

Figure 39 : Test de tolérance du glucose par voie intrapéritonéal chez les descendants mâles âgés de 3 mois 152

Figure 40 : Concentrations des lipides hépatiques chez les mâles âgés de 3 mois..... 158

Figure 41 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les voies métaboliques hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois versus supplémentation maternelle en huile de Carthame 160

Figure 42 : Effet de la supplémentation maternelle sur les modifications des histones dans le foie des animaux âgés de 3 mois..... 162

Figure 43 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les triglycérides sériques et la production des VLDL..... 166

Figure 44 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les sphingolipides hépatiques chez les descendants mâles âgés de 3 mois..... 168

Figure 45 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur l'expression hépatique de TLR4 chez les animaux mâles âgés de 3 mois..... 170

Figure 46 : Effet de la supplémentation maternelle sur les variations de la fluidité membranaire dans le foie des animaux mâles âgés de 3 mois..... 171

Figure 47 : Le rôle du DHA dans la voie de dégradation des sphingomyélines et l'inflammation.... 176

Figure 48: Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur le déficit cognitif induit par l'obésité postnatale chez les animaux mâles et femelles âgés de 6 mois..... 181

Figure 49 : Évolution du poids corporel des rats mâles et femelles nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentées en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation 183

Figure 50 : Activité locomotrice spontanée dans une arène en plein champ de rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentées en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation 185

Figure 51 : Comportement anxieux dans le labyrinthe « Elevated plus maze (EPM) » des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation 188

Figure 52 : Score total de stéréotypie des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation 191

Figure 53 : Effet délétère de la dénutrition maternelle sur la sociabilité des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) et sa réversion par la supplémentation maternelle en DHA 193

Figure 54 : Mémoire de reconnaissance sociale de rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation 196

Figure 55 : Effets du DHA sur le développement de la mémoire d'apprentissage 204

Figure 56 : Effets du DHA sur le maintien de la mémoire d'apprentissage 205

Figure 57 : Récapitulatif des effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre les altérations métaboliques et cognitives induites par un régime obésogène et une dénutrition maternelle 216

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification internationale de la masse corporelle chez l'adulte en fonction de l'indice de masse corporelle selon l'OMS 28

Tableau 2 : Prévalence de la stéatose hépatique dans la cohorte Dionysos 38

Tableau 3 : Conséquence à long terme de l'exposition à la famine Hollandaise 52

Tableau 4 : Distribution géographique de l'incidence des RCIU 54

Tableau 5 : La classification des sphingolipides en fonction du groupement R2 61

Tableau 6 : Quelques sources alimentaires de DHA C22:6 (oméga-3) non-marines 71

Tableau 7 : Groupes expérimentaux et régimes alimentaires 91

Tableau 8 : Séquences d'amorces utilisées pour les analyses RT-PCR en temps réel 106

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés et leur dilution 108

Tableau 10 : Caractéristiques anthropométriques et métaboliques de rats mâles et femelles âgés de 6 mois 131

Tableau 11 : Caractéristiques phénotypiques des rats mâles de 3 mois nés de mères supplémentées avec du sérum physiologique, du DHA ou de l'huile de carthame et exposés à un régime FcHFHS ou nourris avec de la nourriture standard après le sevrage 153

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide eicosapentaénoïque
AL	Acide linoléique
TCA	Acide tricarboxylique
AAL	Acide α-linolénique
AGL	Acides gras libres
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AGPI-LC	Acides gras polyinsaturés à longue chaine
ATGL	Adipose triglycéride lipase
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CA	Céramidase-acide
CerS	Céramide synthase
CerS	Céramides synthases
Chylo	Chylomicron
DOHaD	Concept des origines développementales de la santé et de la maladie
DGAT2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2
TNF α	Facteur de Nécrose Tumorale α
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
Fas	Fatty acid synthase
GPAM	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
HAD	Hydroxy acyl-CoA dehydrogenase
IMC	Indice de Masse Corporel

JNK	Kinase c-Jun NH2-terminale
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
LDL	Lipoprotéines de Basse Densité
MA	Maladie d'Alzheimer
MCAD	Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinases
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
ω3	Oméga-3
ω6	Oméga-6
OMS	Organisation Mondiale de Santé
PAG	Petit pour l'Âge Gestationnel
PKB	Protein kinase B
PKR	Protéine Kinase activée par ARN double brin
PP2A	Protéine phosphatase 2
Prep1	Protéine régulatrice de Pbx 1
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase 4
PPAR	Récepteurs Activés par les Prolifférateurs de Peroxysomes
GPR	Récepteurs couplés à la Protéine G
TLR	Récepteurs de type Toll
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
SPT	Serine palmitoyltransférase
AKT	Serine/threonine kinase
SMase	Sphingomyélinase

SM	Sphingomyéline
SMS	Sphingomyéline synthase
IRS	Substrat Récepteur de l'Insuline
Glut4	Transporteur de glucose 4
TG	Triglycérides
TDAH	Trouble de Déficit de l'Attention avec Hyperactivité
VLDL	Very-Low Density Lipoprotein (Lipoprototéines de basse densité)
β-OX	β-Oxydation
FGF-19	Facteur de croissance des fibroblastes-19
COX-2	Cyclooxygénase 2
NPD-1	Neuroprotectine D-1
GLP-1	Peptide-1 de type Glucagon
SCD-1	Stéaroyl-CoA désaturase-1
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1c
Des 1	Désaturase 1
TAK 1	Kinase 1 activée par TGF-β
TAB 1	Protéine 1 de liaison de la kinase 1 activée par TGF-β
PKM 1	Pyruvate kinase m1
IL 6	Interleukine 6

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les facteurs environnementaux au cours de la grossesse, notamment l'alimentation et le mode de vie, ont des effets profonds et durables sur la santé à long terme et le risque de maladies à l'âge adulte de la progéniture, comme le reflète le concept des origines développementales de la santé et de la maladie (DOHaD) (1) (2). L'hypothèse du DOHaD, initialement issue d'études de cohortes humaines, a permis d'établir qu'une dénutrition maternelle, au début du développement, « programme » de façon permanente la structure et le métabolisme des organes de la descendance, conduisant plus tard à une vulnérabilité au développement des maladies cardiométaboliques et neurologiques. Le processus par lequel les altérations physiologiques résultent de l'exposition à des conditions intra-utérines défavorables est appelé « programmation prénatale ». Par ailleurs, comme la plupart des médiateurs neuroanatomiques et neurochimiques de la cognition et des émotions se développent *in utero*, une sous-alimentation maternelle pendant la gestation peut altérer le développement neurologique et augmenter le risque de maladies psychiatriques chez la descendance (3). De nombreuses études ont établi un lien entre la dénutrition maternelle et les problèmes de santé mentale et cognitifs plus tard dans la vie de l'enfant (4) (5) (6). Ainsi, les interventions nutritionnelles pendant la grossesse ont le potentiel d'améliorer le développement neurologique de la progéniture

L'alimentation pendant la période postnatale a aussi un impact sur la santé. La nutrition postnatale seule, indépendamment du milieu *in utero*, peut influencer le risque d'obésité. Au cours de ces dernières années, une plus grande attention a été accordée à l'obésité car sa prévalence mondiale a presque triplé entre 1975 et 2016 (7). L'obésité est associée à une durée de vie raccourcie et contribue à des complications et des problèmes de santé mentale et le développement de maladies métaboliques telles que la stéatose hépatique ou le diabète. Malgré les efforts constants de la recherche, la prévalence de l'obésité continue d'augmenter, faisant de cette pathologie une menace majeure pour la santé publique, ce qui souligne la nécessité d'initier de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques. Il est largement admis que l'obésité est principalement déterminée par une faible activité physique et une consommation excessive d'aliments riches en énergie, conduisant à terme à un bilan énergétique positif et à une accumulation de masse grasse. Cependant, l'échec des stratégies actuelles visant à favoriser la perte de poids à long terme indique que le poids corporel individuel n'est pas une solution suffisante.

Un grand nombre d'études observationnelles ont montré que la consommation d'aliments enrichis en oméga-3, principalement en acide docosahexaénoïque (DHA, oméga-3),

ou la supplémentation nutritionnelle en cet acide gras polyinsaturé, ont des effets positifs sur la santé, allant de la prévention des déficits cognitifs associés aux maladies neurologiques et au vieillissement, à l'amélioration et à la prévention du syndrome métabolique.

L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer les effets préventifs et thérapeutiques de la supplémentation maternelle en DHA. En administrant du DHA à des rates gestantes pendant la gestation et la lactation, nous avons examiné l'impact de cette supplémentation sur les capacités d'apprentissage, les altérations comportementales et le métabolisme de la progéniture en réponse à une dénutrition maternelle et à une alimentation postnatale hypercalorique.

Ce mémoire de thèse est divisé en plusieurs sections. En première partie, une étude bibliographique permettant d'établir le contexte de mes travaux et sectionnée en trois chapitres : 1) l'obésité, un problème de santé majeur ; 2) le concept de programmation métabolique ; 3) les rôles des lipides dans les pathologies métaboliques et cognitives. Dans la deuxième partie, les objectifs de mes travaux seront plus largement exposés. La méthodologie utilisée dans cette étude sera présentée dans une troisième partie. Ensuite, les travaux réalisés seront présentés et discutés en trois parties : 1) la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation chez le rat protège la progéniture contre la stéatose hépatique induite par un régime alimentaire riche en calories ; 2) effet propre de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) : comparaison avec la supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6) ; 3) effet de sexe dans les altérations cognitives et comportementales induites par l'obésité postnatale ou la dénutrition maternelle chez le rat et réversion par la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation. Enfin, dans la dernière partie, les principaux résultats présentés seront discutés ainsi que les perspectives qui en découlent.

II. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : L'OBÉSITÉ,

UN PROBLÈME

DE SANTÉ MAJEUR

1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBÉSITÉ

1.1. Définition et prévalence

L'obésité se définit par une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé et réduire l'espérance de vie. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a établi une classification de l'état de l'obésité en fonction de l'indice de masse corporel (IMC) (**Tableau 1**). Toute personne présentant un IMC supérieur ou égal à 30 kg/m^2 est considérée comme obèse alors qu'un individu présentant un IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m^2 est en surpoids. D'autres méthodes de classification sont également utilisées comme le tour de taille, mais l'OMS préconise le calcul de l'IMC afin de pouvoir estimer la corpulence d'un individu. Néanmoins, l'IMC ne donne pas une idée précise de la composition corporelle, comme la répartition en graisse qui influe sur les risques pour la santé (8). Par ailleurs, l'évaluation de l'obésité est plus délicate en raison des variations importantes de corpulence pendant la croissance. L'OMS a ainsi mis à disposition des courbes d'évaluation de la croissance de l'enfant afin de prévenir le risque de surpoids et d'obésité.

L'augmentation de l'incidence mondiale de l'obésité est un fardeau sanitaire et économique majeur (9). Selon les dernières estimations de l'OMS (avril 2020), le nombre d'individus atteints d'obésité a presque triplé depuis 1975. Par ailleurs, 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids en 2016, parmi lesquels près de 650 millions étaient obèses.

L'obésité concerne également les enfants car plus de 38 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses en 2019. La plupart de la population mondiale vit dans des pays où le surpoids et l'obésité tuent plus de personnes que l'insuffisance pondérale (10). Ces dernières années, l'obésité qui, autrefois était majoritairement associée aux pays développés, a atteint des proportions d'une épidémie mondiale où 2,8 millions de personnes décèdent chaque année du fait de leur obésité ou de leur surpoids (11) (12). Des nombreuses études épidémiologiques réalisées à travers le monde ont montré que l'obésité continuera d'être un facteur de risque important pour la santé durant les prochaines années. Au Canada, la prévalence de l'obésité est passée de 6.1% à 18,3% entre 1985 et 2011 (8). Selon une étude réalisée par Ginter et Simko, aux Etats-Unis jusqu'à 86% des adultes seront en surpoids ou obèses d'ici 2030 (13).

L'obésité pèse donc lourd dans le budget économique et sanitaire mondial sur le long terme et la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à son développement suscite l'intérêt de nombreux chercheurs.

Tableau 1 : Classification internationale de la masse corporelle chez l'adulte en fonction de l'indice de masse corporelle selon l'OMS.

Diagnostic	***Indice de Masse Corporelle (kg/m^2)***
Maigreur	IMC ≤ 18.5
Normal	18.5 ≤ IMC ≤ 24.9
Surpoids	**25 ≤ IMC ≤ 29.9**
Obésité modérée	**30 ≤ IMC ≤ 34.9**
Obésité sévère	**35 ≤ IMC ≤ 39.9**
Obésité morbide	**IMC ≥ 40**

1.2. Étiologie

L'évolution adaptative de l'Homme a équipé nos mécanismes de régulation pour lutter contre le déficit calorique plutôt que son excès. Notre système, habitué autrefois à des pénuries permanentes ou chroniques en nutriments, a connu une transition nutritionnelle en passant d'un mode de vie de chasse et de cueillette à celui de la sédentarité puis de l'industrie. Cela a conduit peu à peu à un environnement d'abondance nutritionnel (14). Une dérégulation sur le long terme de la balance énergétique, autrement dit un bilan positif entre l'apport et les dépenses énergétiques, favorise le développement de l'obésité. Ainsi, une modification de l'apport calorique peut conduire à long terme à une augmentation de la masse corporelle. Dans une étude réalisée par Rosenbaum et Leibel, il a été estimé qu'une balance énergétique excédentaire de 150 kcal/jour induirait un changement de 21,4 g/jour soit 1,8 kg/an (15). Il est difficile de lier l'obésité à une seule cause. Il semble néanmoins y avoir une relation complexe entre l'obésité et les facteurs biologiques, psychosociaux et comportementaux qui comprennent à la fois la constitution génétique, le statut socio-économique et les influences culturelles (16).

De manière générale, une suralimentation et une envie excessive de prise alimentaire combinées à une faible activité physique conduisent à l'obésité. Cependant, des facteurs sociaux et environnementaux, comme le lieu de travail ou l'environnement communautaire, peuvent aussi influencer les choix alimentaires et conduire à l'obésité. De plus, au cours de ces 100 dernières années, les progrès technologiques dans la transformation des aliments ont changé les habitudes alimentaires. Les aliments à teneurs réduites en fibres, en matières grasses, en sucres simples, en sel et en calories sont plus facilement disponibles et généralement moins chers que les alternatives plus saines. La consommation de ces aliments ultra-transformés a montré une augmentation de 205 calories de l'apport calorique quotidien moyen d'un individu depuis les années 1960 (17). Malgré un intérêt croissant pour les interventions visant à faire face à l'obésité et aux nombreuses pathologies qu'elle pourrait engendrer, les tendances croissantes de sa prévalence montrent peu de signes de ralentissement.

Au-delà des facteurs environnementaux, il a également été montré que la génétique est aussi liée à l'obésité. Les études sur l'hérédité estiment que les facteurs génétiques contribuent entre 45% et 85% de la variabilité de l'IMC (18). À l'heure actuelle, plus d'une centaine de gènes ont été associés au développement de la pathologie. La plupart d'entre eux sont impliqués

dans le métabolisme énergétique, le contrôle de la prise alimentaire, le développement du tissu adipeux ou encore les activités mitochondriales.

Une étude réalisée par Li et ses collègues a mis en évidence 12 *loci* sensibles à l'obésité en évaluant le lien entre ces *loci* et divers traits anthropométriques, notamment l'IMC et le tour de taille, mais aussi leur valeur prédictive dans la survenue de l'état d'obésité. Cette étude a montré que certains variants avaient un effet cumulatif sur les mesures de l'obésité et chaque allèle supplémentaire était associé à une augmentation du poids de 0,444 kg et un risque accru d'obésité de 10,8%, alors que les allèles combinés avaient une valeur prédictive limitée du risque d'obésité (19). D'autre part, l'étude de lignées d'animaux prédisposées à l'obésité a permis de comprendre l'implication des facteurs génétiques dans le développement de la maladie. Une étude réalisée par Levin en 2010 a ainsi mis en évidence la transmission du phénotype « prédisposition à l'obésité » par croisement entre des animaux résistants au développement de l'obésité et des animaux prédisposés (20).

La nutrition maternelle a également sa part d'influence puisqu'une dénutrition ou une alimentation riche en graisses de la mère pendant la grossesse peut entraîner chez l'enfant une prédisposition à l'obésité. Ainsi, la nutrition maternelle peut induire des modifications épigénétiques et par conséquent entraîner une transmission intergénérationnelle (21).

La prédisposition à l'obésité peut aussi impliquer des hormones qui influencent la prise alimentaire. L'hypothalamus *via* les neuropeptides régulateurs tels que la leptine, hormone anorexigène, ou la ghréline qui est une molécule orexigène, est reconnu comme le centre régulateur de la prise alimentaire (22). L'hypothalamus joue donc un rôle important dans le contrôle du poids corporel et ses circuits de régulation peuvent contribuer au développement de l'obésité. Néanmoins, des circuits cérébraux autres que ceux régulant la prise alimentaire sont également impliqués dans l'obésité.

L'obésité est donc une maladie chronique et multifactorielle résultant de l'interaction entre divers facteurs environnementaux et/ou génétiques conduisant à un dysfonctionnement métabolique.

1.3. Inflammation liée à l'obésité

L'obésité est associée à la présence de composants inflammatoires induisant le développement d'autres altérations métaboliques. Des nombreuses études ont montré que l'obésité pouvait induire une inflammation au niveau du tissu adipeux qui, à son tour, favorise une inflammation systémique de « *bas grade* » dans d'autres organes puisqu'elle contribue au développement de perturbations dans le foie, les muscles ou le système cardiovasculaire (23). Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNFα, a été observée dans les tissus adipeux de sujets obèses (24). De même, il a été montré chez les personnes obèses que l'expansion du tissu adipeux, notamment au niveau abdominal, s'accompagne d'une infiltration de macrophages jouant un rôle important dans l'expression des gènes pro-inflammatoires (25).

Ainsi, l'obésité augmente le nombre de plusieurs protéines inflammatoires telle que la protéine C réactive et bien d'autres. Par conséquent, l'inflammation induite réduit la sensibilité des récepteurs à l'insuline ce qui entraine le développement d'une résistance à l'insuline. Cet état d'insulinorésistance peut aussi favoriser l'inflammation et induire à long terme un risque accru de développer un diabète de type 2.

2. COMORBIDITÉS ASSOCIÉES À L'OBÉSITÉ

2.1. Maladies cardiovasculaires

L'obésité conduit à une diminution générale de la qualité de vie en augmentant la morbidité et en réduisant l'espérance de vie (26). Elle est associée à de nombreuses pathologies notamment les maladies cardiovasculaires (27). Selon une étude réalisée par Stein et Colditz, entre 20 et 30% de la mortalité cardiovasculaire est associée à une surcharge pondérale et le risque de développer des pathologies cardiovasculaires est presque trois fois plus élevé chez les individus en surpoids (28). De plus, l'obésité augmente le risque de maladies cardiovasculaires par son influence sur le développement et la gravité des comorbidités telles que l'hypertension

ou les dyslipidémies. La survenue des maladies cardiovasculaires associées à l'obésité peut également être présente en l'absence d'autres comorbidités et peut être liée à des modifications structurelles et fonctionnelles du myocarde notamment par un dépôt excessif de graisses dans les artères. Il a ainsi été décrit que le risque de décès prématuré est doublé chez les individus obèses par rapport aux personnes non obèses et que le risque cardiovasculaire est multiplié par cinq (29). L'obésité est également associée au développement d'autres évènements vasculaires aigus car il a été montré que l'incrément d'une unité d'IMC entrainait une augmentation de 4% du risque d'accident vasculaire cérébral ischémique et une augmentation de 6% du risque d'accident vasculaire cérébral hémorragique (**Figure 1**) (27) (30).

La durée de l'obésité est toutefois importante dans la compréhension du degré du risque de développement des maladies cardiovasculaires. Cependant, les études réalisées sur l'obésité et le lien avec les maladies cardiovasculaires se sont, principalement, intéressées à un état ponctuel. C'est pourquoi, Nakajima et ses collègues ont étudié la performance du ventricule gauche chez des patients obèses avec des méthodes non invasives comme l'échocardiographie. Ils ont ensuite séparé les patients en deux groupes selon la durée de l'obésité (groupe 1 : Obésité <15 ans ; groupe 2 : obésité >15ans) mais avec le même degré d'obésité et de cellularité du tissu adipeux. Les auteurs ont conclu que les altérations des performances cardiaques chez les patients obèses avec hypertrophie du ventricule gauche et épaississement de la paroi étaient non seulement attribuées au poids corporel élevé mais aussi à la durée de l'obésité (31). Il a également été montré que le risque de mortalité par maladie cardiovasculaire augmentait significativement de 7% pour tous les deux ans de vie supplémentaire en état d'obésité et cela indépendamment de l'IMC. Il est donc essentiel de prendre en compte la durée de l'obésité en plus de l'IMC comme facteur de risque de développement de maladies et de mortalité cardiovasculaires (32).

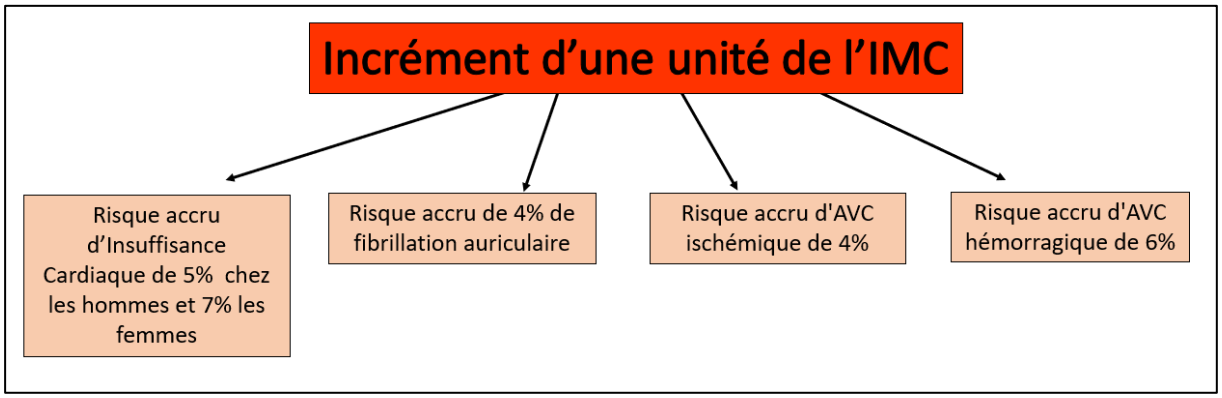


Figure 1 : Risque accru de maladies cardiovasculaires en cas d'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC). *Adaptée de* (27).

2.2. La stéatose hépatique non-alcoolique

2.2.1. Définition et caractéristiques

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) se définit par la présence d'une stéatose macrovésiculaire dans plus de 5% des hépatocytes chez les personnes consommant peu ou pas d'alcool (33). Elle fait référence à l'accumulation de graisses, et principalement de triglycérides, dans les hépatocytes, dépassant 5% du poids du foie et de façon non induite par l'alcool. La NAFLD, autrement dit la maladie du « *foie gras* », englobe un large spectre de troubles hépatiques allant de la stéatose hépatique à la stéatohépatite non alcoolique (NASH, non-alcoholic steatohepatitis) et pouvant à long terme conduire à une cirrhose (**Figure 2** et **Figure 3**). La prévalence de la NAFLD augmente considérablement à l'échelle mondiale et devient la cause prédominante des maladies chroniques hépatiques. Elle est généralement associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline. De plus, elle est considérée comme une conséquence majeure de l'obésité à cause de l'apport accru en acides gras libres du tissu adipeux vers le foie, de l'alimentation riche en graisses et en sucres et de l'augmentation de la lipogenèse hépatocytaire *de novo* (34). Ainsi, la NAFLD se caractérise par une

accumulation excessive de triglycérides dans le foie résultant d'un déséquilibre entre les différentes voies métaboliques suivantes (**Figure 4**) :

- Lipogenèse *de novo*
- β-oxydation
- Surproduction et sous-catabolisme de lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons intestinaux et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) hépatiques).

La NASH est la forme la plus sévère de la maladie. Elle est caractérisée par la présence d'une stéatose, d'une dégénérescence des hépatocytes par ballonnement, d'une inflammation et d'un dépôt de collagène pouvant induire divers degrés de fibrose (34). En cas d'obésité viscérale, l'insulinorésistance induite conduit à une libération d'acides gras libres par le tissu adipeux vers le foie conduisant à une saturation des capacités mitochondriales et de la β-oxydation entrainant la production des cytokines pro-inflammatoires sous-jacentes au développement de la NASH (35). Il s'agit de l'hypothèse à « *deux coups* » proposée par Day et James qui se base sur l'apparition d'une stéatose entrainant une inflammation en « *premier coup* », suivie d'une fibrose et des lésions hépatocytaires en « *deuxième coup* » (35).

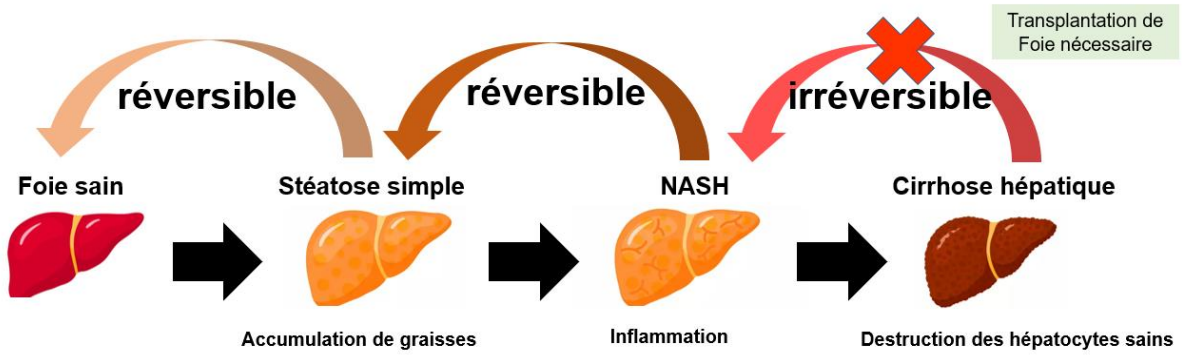


Figure 2 : Schéma de la progression de la stéatose hépatique non-alcoolique. *(Amran DAHER ABDI).*

La stéatose hépatique non-alcoolique est composée de différents stades d'évolution. Le premier stade est la stéatose dite « simple » et bénigne montrant une surcharge de graisses mais sans conséquences sur les fonctions du foie et peut être réversible s'il y a des améliorations dans le régime alimentaire. Sinon elle évolue vers une NASH où l'accumulation des graisses entraine une inflammation pouvant

aller jusqu'à une cirrhose (stade irréversible de la maladie) caractérisée par une perte des fonctions hépatiques entrainant un cancer du foie, le carcinome hépatocellulaire (à ce stade seule une transplantation de foie est efficace).

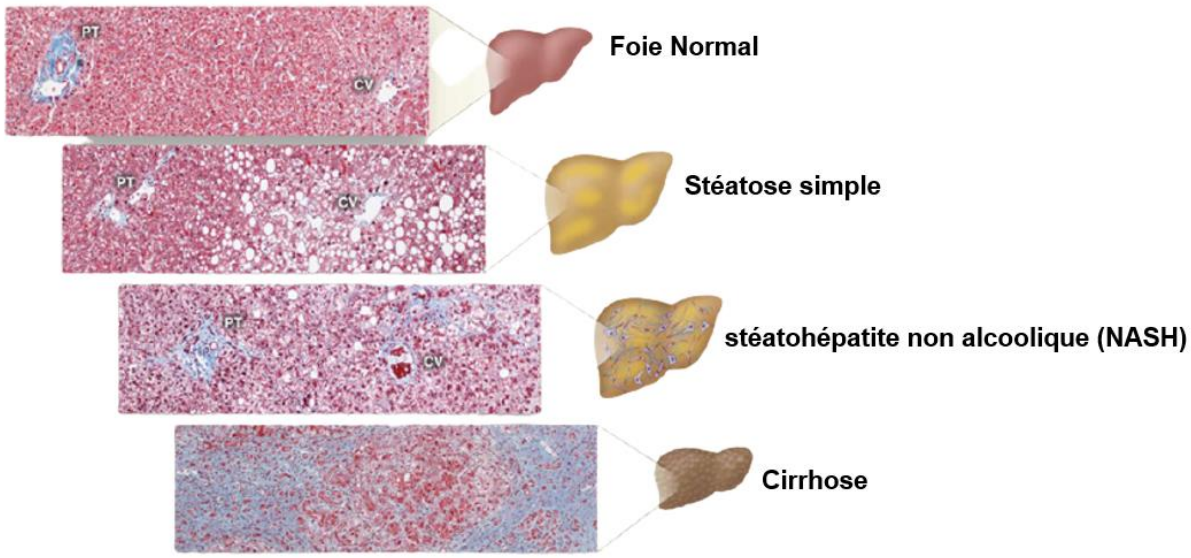


Figure 3 : Images des coupes histologiques illustrant le contenu hépatique en lipides dans l'évolution de la stéatose hépatique non-alcoolique. *Adaptée de* (34).

L'accumulation des triglycérides dans les gouttelettes lipidiques des hépatocytes provoque une stéatose associée à l'inflammation, à la fibrose et à la mort cellulaire qui évolue vers une cirrhose.

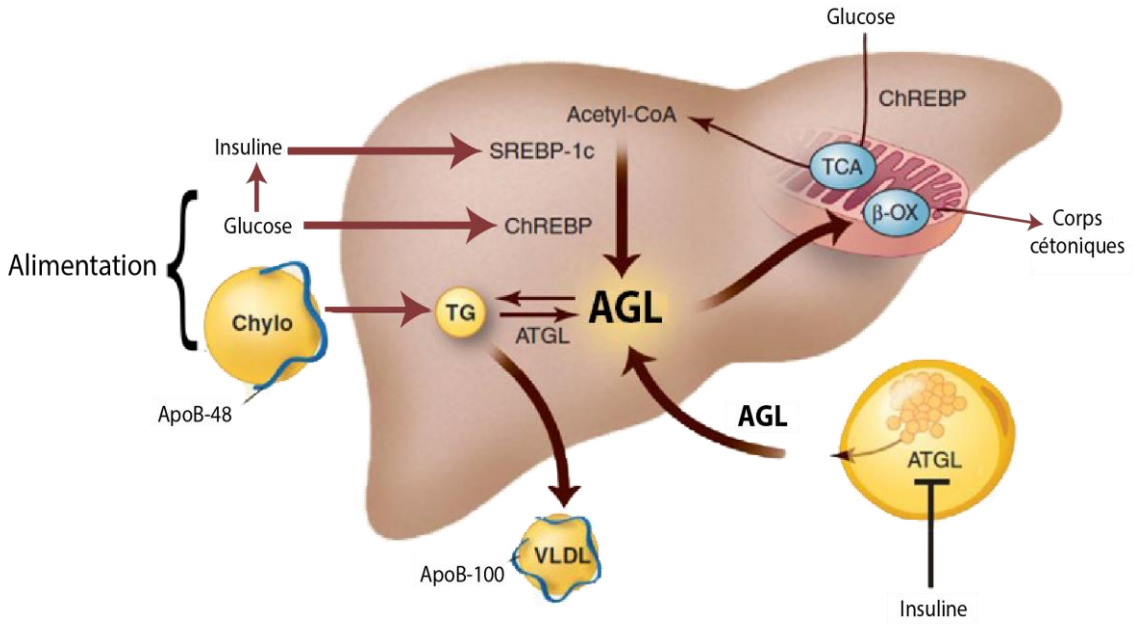


Figure 4 : Métabolisme des triglycérides (TG) dans le foie. *Adaptée de* (34).

Les trois principales sources d'acides gras libres (AGL) sont le régime alimentaire, la synthèse endogène et les tissus périphériques. Les AGL ont quatre destins possibles : ils peuvent être métabolisés par β-oxydation (β-OX) dans les mitochondries, estérifiés et stockés sous forme de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques, utilisés pour former d'autres lipides (non illustrés) ou conditionnés avec l'apoB100 pour former les VLDL qui seront sécrétées dans le sang. Les processus qui augmentent l'apport des AGL et des triglycérides (TG) provoquent une stéatose hépatique. L'apport en glucides augmente les niveaux de glucose et d'insuline qui activent deux facteurs de transcription dans le foie favorisant la lipogenèse de novo : ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) et SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding proteins-1c). L'insuline inhibe la lipolyse du tissu adipeux en supprimant l'ATGL (Adipose triglycéride lipase). Chylo : chylomicron ; TCA : acide tricarboxylique.

2.2.2. Prévalence et facteurs de risques

La stéatose hépatique est corrélée à la forte croissance de l'obésité (**Figure 5**). Elle est devenue un défi majeur en raison d'une forte augmentation de sa prévalence dans le monde et devrait être la principale indication de la transplantation hépatique aux États-Unis dans les dix prochaines années (36). De nombreuses études transversales ont rapporté une corrélation importante entre la graisse abdominale et le développement de NAFLD. Ces études ont montré que contrairement aux personnes saines, les individus atteints de la NAFLD avaient des IMC plus élevés (37). Selon l'étude réalisée par Dionysos, 94% des personnes obèses présentaient une NAFLD contre 67% des personnes en surpoids et 24,5% des personnes de poids normal (**Tableau 2**) (38). Il existerait donc une relation entre les niveaux d'obésité et les degrés de développement de la NAFLD avec des stades plus avancés de la maladie chez les personnes souffrant d'obésité morbide (IMC > 35 kg/m^2) (39). La stéatose hépatique est aujourd'hui reconnue comme l'une des causes les plus courantes des maladies chroniques du foie dans les pays développés où la prévalence de la NAFLD est de 20 à 33% chez les adultes de la population générale parmi lesquels 10 à 20% des cas évoluent vers la NASH et 2 à 3% des cas évoluent vers une cirrhose (40). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au Japon où la prévalence globale de la NAFLD était de 29,7% mais avec une augmentation de cette prévalence plus marquée chez les hommes (41).

Cependant, la prévalence reste plus faible dans certains pays d'Asie où la plupart de la population conserve une alimentation traditionnelle (42). Ces données suggèrent que l'adoption d'un mode de vie occidental, caractérisé par l'abondance de nourriture et la sédentarité, favoriserait la croissance de la prévalence de la NAFLD dans les pays en voie de développement. Ainsi, une intervention sur le mode de vie pourrait réduire l'incidence de la NAFLD. Néanmoins, la plupart des morbidités et la mortalité liées au foie sont observées chez les individus dont la maladie évolue vers un état avancé de fibrose et de cirrhose.

A cet égard, de nombreuses études ont rapporté une prévalence plus importante chez les patients d'origine hispanique et une prédominance de la maladie chez les hommes (43) (44). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapies validées et les stratégies thérapeutiques reposent sur la prise en charge des différentes composantes du syndrome métabolique.

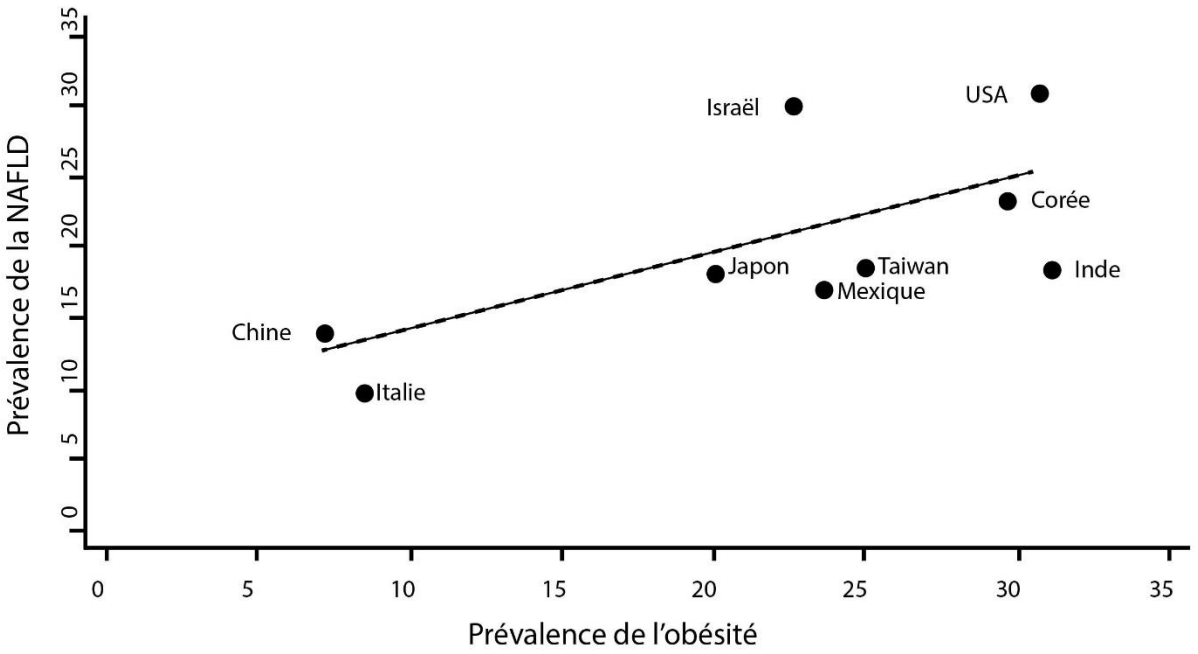


Figure 5 : Prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et prévalence de l'obésité dans la population générale. *Adaptée de* (45).

Tableau 2 : Prévalence de la stéatose hépatique dans la cohorte Dionysos. *Adapté de* (38).

Classification d'IMC	**NAFLD (20 g d'alcool par jour) N/TOTAL**
NORMAL **(≤ 25)**	34/139 (24%)
SURPOIDS **(>25 MAIS <30)**	104/155 (67%)
OBESE **(≥ 30)**	61/67 (91%) * P<0.0001 versus obèse et normal

2.3. Les déficits cognitifs

Les déficits cognitifs se traduisent par une perte ou une réduction des capacités cognitives pouvant entraîner plusieurs conséquences. Ils regroupent un ensemble de symptômes incluant des troubles de la mémoire, de la perception ou des difficultés à résoudre des problèmes. Ils sont retrouvés à des degrés divers dans les maladies neurodégénératives. Le déclin cognitif a été utilisé comme partie intégrante de la définition de la fragilité. Il existe divers facteurs environnementaux qui sont à l'origine de ces troubles. L'obésité touche les individus de tout âge, y compris les personnes âgées. Cette évolution de l'obésité avec l'âge peut jouer un rôle dans le déclin cognitif mais peut aussi affecter le cerveau (**Figure 6**). Chez les enfants, les adolescents et les adultes, il existe une corrélation entre l'obésité et les déficits cognitifs en particulier dans la fonction exécutive (46).

Dans une étude réalisée par Maayan et ses collègues, il a été observé que les adolescents obèses avaient des performances inférieures aux tests cognitifs et un volume de cortex orbitofrontal plus faible en comparaison des adolescents maigres (47). De plus, il a été prouvé que de mauvaises performances de la fonction cognitive pourraient prédire une future augmentation de l'IMC (46). Cela suggère que l'obésité et les déficits cognitifs seraient positivement corrélés.

De surcroit, l'exposition à une malnutrition *in utéro* et au début de la vie postnatale est nuisible au développement du fœtus. Cela peut entrainer des altérations de la cognition pouvant aller jusqu'à des changements de préférences alimentaires chez la descendance (48). Cette suralimentation au début de la vie pourrait sensibiliser la réponse neuroinflammatoire du cerveau à des *stimuli* entrainant des dysfonctionnements cognitifs et immunitaires tout au long de la vie (49). Une étude réalisée par Holloway et ses collègues a montré chez les sujets ayant consommé un régime riche en graisses et faible en glucides, une altération de l'attention, de la vitesse et de l'humeur en comparaison à des sujets ayant consommé un régime standard (50).

Cependant, la sensibilité de l'obésité dépend des périodes critiques de développement. Une courte exposition à une alimentation riche en graisses chez des rats juvéniles entraine une altération de la mémoire dépendante de l'hippocampe et de la plasticité alors que cette exposition aux régimes riches en graisses n'a aucun effet néfaste chez les rats adultes (51). En effet, l'obésité induit un phénotype inflammatoire dans l'hippocampe, entrainant des troubles

d'apprentissage et de mémorisation. Ainsi, la surveillance de la composition des aliments consommés peut prévenir contre les déficits cognitifs et améliorer la cognition sur le long terme.

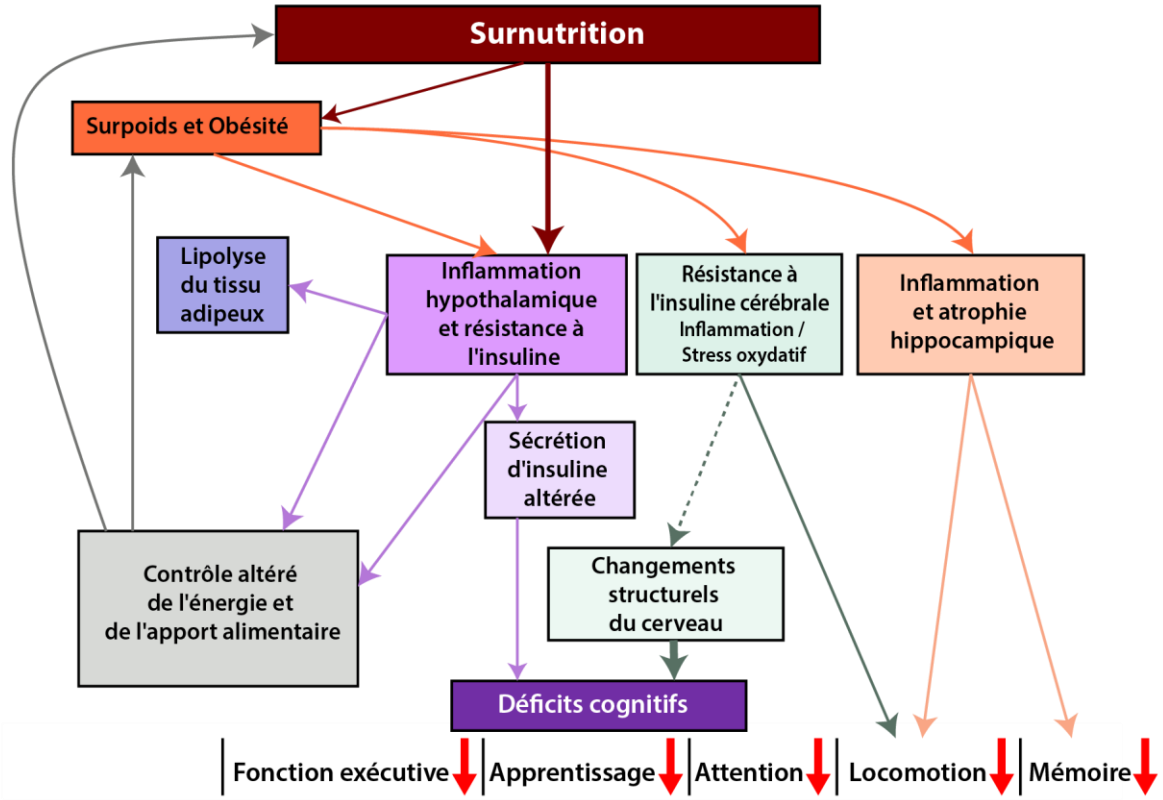


Figure 6 : Effets de la surnutrition et de l'obésité sur le cerveau et la fonction cognitive. *Adaptée de* (52). *Les lignes pointillées représentent des interactions hypothétiques.*

3. INTERVENTIONS THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE L'OBÉSITÉ

De nombreux traitements efficaces, pouvant être combinés ou utilisés en monothérapie, existent pour la prise en charge des patients obèses. Il s'agit principalement de thérapies diététiques, telles que les régimes pauvres en graisses et les régimes hypocaloriques, mais aussi de thérapies comportementales, pharmacologiques ou chirurgicales. Cependant, le traitement de cette pathologie chronique multifactorielle repose principalement sur la mise en place de règles alimentaires.

3.1. Approches diététiques de l'obésité et exercices physiques

Les principes du traitement de l'obésité sont de parvenir en premier lieu à une perte de poids cliniquement significative puis en second lieu de maintenir cette perte de poids. Cette dernière se produit lorsque la balance énergétique est négative. Cela peut être obtenu en réduisant la quantité d'aliments ingérés et/ou en faisant plus d'exercices physiques. Bien que les niveaux faibles d'activité physique soient une cause majeure de l'obésité, la restriction calorique est la méthode la plus couramment utilisée pour réduire l'obésité.

Il a été rapporté qu'une restriction calorique est associée à une amélioration de la santé et à une longévité accrue au-delà de la perte de poids. Des nombreuses études animales ont montré que la restriction calorique chez les rats obèses entraine, en plus d'une perte de poids, une réduction de la morbidité et de la mortalité (53) (54). Louala et ses collègues ont montré que chez les rats obèses, la restriction calorique a un rôle important dans la défense antioxydante du système cardiovasculaire en réduisant le cholestérol pro-athérogène (LDL cholestérol), la peroxydation lipidique et en augmentant l'activité antioxydante de certaines enzymes, entrainant une réduction du risque cardio-métabolique associé à l'obésité (53). De manière similaire, plusieurs études réalisées chez l'Homme ont montré que la restriction calorique réduit le poids corporel, la masse grasse viscérale, la pression artérielle et les taux plasmatiques en glucose, en triglycéride et en cholestérol total (55) (56) (57). Le contrôle des calories améliore également les comorbidités associées à l'obésité telles que l'état cardiovasculaire, la sensibilité à l'insuline et la fonction cognitive. Alors que le véritable objectif du traitement de l'obésité est

le maintien de la perte du poids sur le long terme, l'un des problèmes d'une restriction calorique est que la plupart des patients obèses reprennent le poids qu'ils ont perdu en raison d'un hypométabolisme secondaire lié à la restriction calorique entrainant une frustration. Par conséquent, la restriction calorique est difficile à pratiquer et peut même augmenter le risque de malnutrition. Par ailleurs, de nouvelles approches diététiques ont fait leur apparition récemment et les résultats observés suscitent la controverse. C'est le cas du jeûne intermittent qui fait référence à des fenêtres d'alimentation séparées par des périodes de jeûne. Cependant, la plupart des preuves rapportées par cette approche thérapeutique ne sont pas convaincantes à cause du faible nombre d'études réalisées à ce jour.

A l'heure actuelle, la controverse majeure semble se situer sur la qualité optimale de la composition du régime alimentaire pour perdre du poids. La question entre une alimentation faible en gras ou faible en glucide et l'importance des quantités de produits laitiers est toujours débattue à ce jour. D'après de nombreux essais randomisés, il n'existe pas de régime universel pouvant convenir à toutes les personnes obèses et chaque régime doit être prescrit sur une base individuelle pour mieux correspondre aux préférences personnelles de chaque patient. De plus, la nécessité d'une vigilance constante est importante pour soutenir les changements de comportement des patients obèses face aux pressions biologiques et environnementales impliqués dans la prise du poids.

Alors que la question du bénéfice d'une activité physique seule sur la perte de poids a été très débattue, certaines études ont rapporté que l'activité physique peut entrainer une modeste perte de poids indépendamment des effets de la restriction alimentaire (58) (59) (60). Bien que cette méthode soit fortement contestée, aucune étude à l'heure actuelle n'étaye l'observation selon laquelle l'exercice physique à lui seul n'est pas une méthode pour réduire l'obésité totale ou abdominale. Par ailleurs, plusieurs essais randomisés ont examiné la différence de perte de poids par une diminution de l'apport calorique ou par l'effort physique. Les sujets ont été divisés en deux groupes et les résultats ont montré une perte de poids similaire suggérant ainsi que le résultat est le même que les calories soient brulées par une activité physique accrue ou qu'elles ne soient jamais consommées. De plus, il a été montré que l'exercice aide à minimiser la perte de masse maigre (58) (59). Au-delà de la perte du poids, l'effort physique a des nombreux bienfaits sur le métabolisme, le bien-être, le comportement (humeur) et prévient les maladies cardiaques (61). Ainsi, l'activité physique est indispensable

dans la perte de poids et doit être une partie intégrante de tout programme de perte de poids quel que soit le traitement de lutte contre l'obésité que l'on choisit.

3.2. Chirurgie bariatrique

La physiopathologie de l'obésité étant complexe, une multidisciplinarité de sa prise en charge est nécessaire. Le traitement de l'obésité dépend de la gravité de la pathologie et des comorbidités qui lui sont associées. La chirurgie bariatrique est une option viable pour le traitement de l'obésité sévère pouvant entrainer une perte de poids à long terme et une amélioration du mode de vie et des facteurs de risque. Elle vise à modifier le système digestif pour réduire l'efficacité de la digestion et diminuer l'absorption des aliments. Il existe deux principaux dispositifs implantés chez le patient :

- Le by-pass-gastrique qui repose sur le principe de dérivation où l'on court-circuite une grande partie de l'estomac afin de dévier une partie des aliments qui seront moins digérés.
- l'anneau gastrique : un collier que l'on pose sur la partie supérieure de l'estomac créant une poche où s'accumulent les aliments provenant de l'œsophage. Cela entraine très rapidement une sensation de satiété grâce aux capteurs sensoriels détectant le remplissage de l'estomac. Le principe repose sur un raccourcissement du transit digestif et une diminution de la prise alimentaire et de la vitesse du transit car les aliments doivent être mâchés lentement pour éviter l'étouffement.

En France, la chirurgie bariatrique a connu un essor important où les interventions chirurgicales ont été multipliées par trois dans les années 2000 (62). Il a été démontré que la chirurgie bariatrique entraine une diminution significative et durable de l'IMC ainsi qu'une réduction de la mortalité (63). Une étude prospective réalisée en Suède sur des sujets adultes obèses ayant subi une chirurgie bariatrique, a montré une diminution du poids corporel, une activité physique plus élevée, une amélioration de la tension, une baisse des taux circulants en triglycérides ainsi que des faibles taux en cholestérol comparé aux sujets témoins obèses sans intervention chirurgicale (64). Par ailleurs, il a été montré que la chirurgie bariatrique ramenait à la normale assez rapidement les taux de glucose sanguins chez les personnes obèses atteintes de diabète de type 2. Sur le long terme, plus de 90% des sujets obèses n'étaient plus diabétiques

(65). Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'effet métabolique bénéfique de la chirurgie bariatrique sur la glycémie, ne sont pas complétement élucidés. Plusieurs hypothèses ont été avancées notamment le rôle des acides biliaires mais aussi le rôle bénéfique de la restriction calorique (**Figure 7**). Plus récemment, le rôle de la modification de la sécrétion du peptide-1 de type glucagon (GLP-1) dans l'effet métabolique de la chirurgie bariatrique a été étudié chez l'Homme et chez l'animal. Il a été montré que les cellules exprimant le GLP-1 sont situées dans l'estomac. Après chirurgie bariatrique chez des rats et des individus obèses, les cellules exprimant GLP-1 subissent des changements de plasticité et peuvent localement moduler les fonctions gastriques contribuant ainsi au contrôle de l'homéostasie du glucose (**Figure 7**) (66).

Malgré les complexités sous-jacentes et les complications post-opératoires qui peuvent survenir tardivement, les interventions bariatriques s'élargissent puisqu'elles sont maintenant également réalisées chez les adolescents obèses. La chirurgie bariatrique à l'adolescence n'est pas plus risquée que chez l'adulte et ses bénéfices sont importants car un traitement précoce permet l'amélioration des comorbidités et empêche même leur développement. Une étude réalisée chez des adolescents atteints d'obésité morbide a montré qu'après chirurgie bariatrique les adolescents avaient tous perdu du poids et les morbidités liées à l'obésité avaient disparu (67). Par ailleurs, une étude prospective sur la chirurgie bariatrique réalisée chez des adolescents obèses a montré, trois ans après l'intervention, une diminution significative du poids et des améliorations cardiométaboliques ainsi que la qualité de vie physique, psychologique et sociale. Malgré des effets bénéfiques conséquents, les auteurs ont souligné que des suivis pré et post opératoire des adolescents sont néanmoins indispensables (68). De plus, la sélection des adolescents pouvant prétendre à un traitement chirurgical est une étape cruciale reposant sur les critères suivants : « *une prise en charge médicale plus de six mois consécutifs précédant la chirurgie; un suivi et une compréhension des conseils diététiques; un IMC supérieur à 40 avec des comorbidités, ou supérieur et égal à 50 sans comorbidité; une implication de l'adolescent et des parents suffisante afin que les deux parties puissent donner un consentement éclairé; un développement staturopondéral qui doit correspondre à un stade quatre de Tanner (soit une croissance staturale développée au moins à 95 %. Il correspond à un âge osseux de 12,8 ans pour les filles et 14,5 ans pour les garçons. Il concorde avec une stadification clinique fondée sur la pilosité pubienne et le développement mammaire ou testiculaire)* » (69).

Enfin, la chirurgie bariatrique prend une place de plus en plus importante dans le traitement de l'obésité, mais il est important de continuer à explorer les mécanismes physiopathologiques modifiés par la chirurgie afin d'approfondir l'état des connaissances sur les risques et les bénéfices.

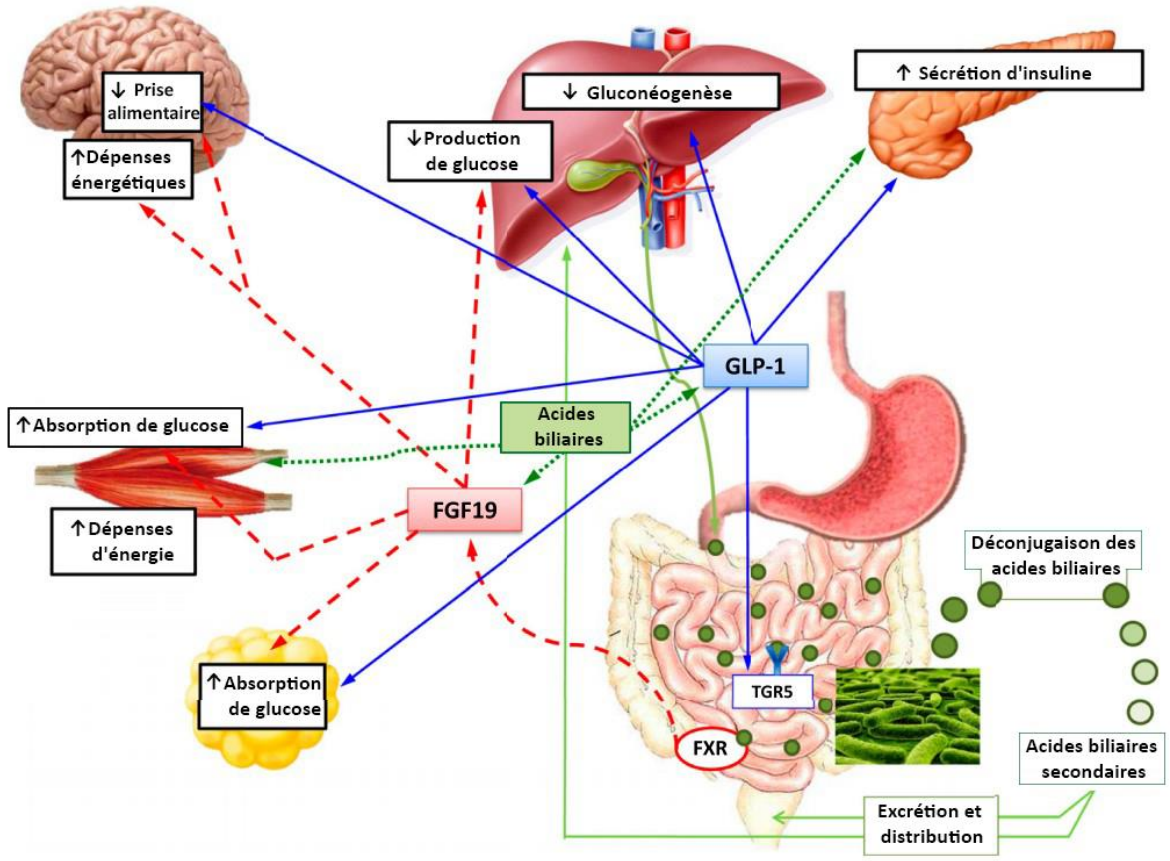


Figure 7 : Effets métaboliques bénéfiques de la chirurgie bariatrique et cross talk entre la chirurgie bariatrique, GLP-1 (peptide-1 de type glucagon) et FGF-19 (facteur de croissance des fibroblastes-19). *Adaptée de* (65).

3.3. Avancées pharmacologiques dans le traitement de l'obésité

La littérature scientifique sur le traitement médicamenteux de l'obésité est très limitée notamment en raison des méthodes de randomisation inadéquates et une forte attrition (70). Les modifications cinétiques des médicaments chez un sujet obèse prennent principalement en compte les modifications liées à leur distribution dans les différents tissus. Le problème est en réalité plus complexe d'autant que les modifications liées aux fonctions hépatiques et rénales intervenant dans l'élimination des produits sont à considérer fortement. De plus, les différentes étapes du devenir d'un médicament dans l'organisme au cours de sa distribution, de sa fixation protéique, de son métabolisme et de son élimination sont affectées par les modifications physiologiques de l'obésité (71).

Bien que les conséquences de la chirurgie bariatrique sur la cinétique des médicaments n'aient pas été beaucoup rapportées, plusieurs études ont montré que malgré le retard des vidanges gastriques et œsophagiennes dans l'obésité (72), la réabsorption des médicaments administrés par voie orale n'est que peu modifiée (73) (74) (75). Cependant, il reste très difficile de développer des molécules efficaces, malgré le problème grandissant que représente l'obésité à l'échelle planétaire, du fait de la complexité des rôles des différents tissus qui participent au développement de cette pathologie. La distribution tissulaire des médicaments dépend des changements induits par l'obésité dans la composition corporelle tout en prenant en compte le degré de liposolubilité du médicament. En outre, les effets indésirables graves des médicaments anti-obésité apparaissent lorsque le médicament est utilisé pendant des périodes assez longues ce qui limite la recherche médicamenteuse du traitement contre l'obésité car une fois installée, l'obésité nécessite un traitement à long terme (76).

Actuellement, en France, il n'existe qu'une seule molécule, l'orlistat, qui a reçu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'obésité pour une utilisation à long terme (IMC $\geq$ 30 ou en surpoids IMC $\geq$ 27 personnes ayant au moins une comorbidité associée au poids (diabète de type 2, hypertension, hyperlipidémie)) (76). L'orlistat est un inhibiteur de la lipase gastro-intestinale entrainant l'excrétion d'environ 30% des graisses ingérées (77).

Des essais cliniques sur l'orlistat ont montré une perte de poids cliniquement significative après une année de traitement chez les patients obèses en comparaison au placebo (76). En outre, une étude réalisée sur l'efficacité et l'innocuité de l'orlistat a montré que par

rapport au placebo, l'orlistat avait également des effets bénéfiques plus importants sur d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que la pression artérielle, les taux de lipides sériques et le tour de taille (78). Le traitement à l'orlistat favorise, en plus d'une perte de poids, une réduction des facteurs de risque cardiovasculaire plus importante que le régime seul chez les patients obèses à haut risque coronarien (79).

Cependant, il a été montré que les médicaments approuvés pour le traitement de l'obésité à long terme entrainent une perte de poids plus importante et une probabilité accrue d'obtenir une perte de poids cliniquement significative dès la première année de traitement lorsqu'ils sont utilisés en complément d'une intervention sur le mode de vie (76). Finer et ses collègues ont montré qu'un traitement à l'orlistat associé à un régime hypocalorique pendant une année entraine une perte de poids significative plus importante et une amélioration des paramètres lipidiques sériques pertinente en comparaison au placebo (80). Hanefeld et Sachse ont également montré que le traitement à l'orlistat associé à un régime entraine une perte de poids significative, un meilleur contrôle glycémique et une amélioration du risque cardiovasculaire chez les patients en surpoids atteints de diabète de type 2 (81).

Il existe d'autres médicaments dans le traitement de l'obésité sur le long terme tels que la lorcasérine, dont l'autorisation de mise sur le marché dans l'Union Européenne n'est pas approuvée mais utilisée aux États-Unis pour la perte de poids chez les adultes obèses ou en surpoids. La lorcasérine est un nouvel agoniste sélectif du récepteur de la sérotonine 2C. Il a été montré que la lorcasérine administrée avec un programme de modification du mode de vie entraine une perte de poids significative plus élevée que le placebo et de façon dose dépendante (82). De plus, la lorcasérine est associée à une amélioration du maintien de la perte du poids (83).

Par ailleurs, les données à grande échelle (grandes cohortes) sont souvent limitées par leurs taux d'attrition élevés pour fournir des informations sur les risques et les avantages à long terme (au-delà de deux ans) des autres médicaments de traitement de l'obésité. Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour déterminer les effets à long terme et sur des populations vastes et diversifiées pour élargir les traitements médicamenteux de l'obésité.

CHAPITRE II : LE CONCEPT DE PROGRAMMATION MÉTABOLIQUE

1. HYPOTHÈSE DES ORIGINES FŒTALES

La programmation métabolique est l'un des facteurs contribuant à l'étiologie de l'obésité et des maladies chroniques associées telles que le diabète et les maladies cardiovasculaires. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) reflète principalement une malnutrition maternelle contribuant au risque de maladies chroniques, en lien avec la programmation fœtale selon l'hypothèse des origines précoces de Barker. En effet, la programmation fœtale implique que des conditions intra-utérines défavorables pendant les périodes critiques de la croissance prénatale entrainent des changements permanents de la physiologie et du métabolisme de l'organisme. Ainsi, l'environnement intra-utérin a un rôle déterminant dans la croissance du fœtus. Une insuffisance utéro-placentaire, due à une dénutrition de la mère pendant la grossesse, peut altérer la croissance du fœtus. En outre, le placenta a un rôle déterminant dans l'apport nutritionnel pour le fœtus et un déficit nutritionnel pourrait altérer son développement. En effet, lorsque le fœtus est confronté à une restriction en apports nutritionnels, il s'adapte aux conditions du milieu maternel. Il met en place un système d'adaptation qui consiste à privilégier le développement des organes vitaux que sont le cœur et le cerveau, au détriment des autres organes. L'apport nutritionnel va donc essentiellement vers ces organes vitaux pour la survie de l'organisme : c'est l'hypothèse du phénotype économe (84). En outre, ces mécanismes ont des répercussions sur la structure des autres organes qui ne suivront pas un développement normal. C'est notamment le cas des muscles, d'où la naissance de bébés de faible poids. Ces adaptations peuvent augmenter les chances de survie du fœtus grâce à l'épargne du cerveau mais se traduisent par des difficultés sur le long terme face à l'abondance nutritionnelle à l'âge adulte.

Les principales études épidémiologiques concernant la famine hollandaise sont importantes dans la compréhension des conséquences à long terme d'une dénutrition maternelle. La famine hollandaise ayant duré 5 mois, cela a permis à certains scientifiques de mettre en évidence l'importance de la fenêtre d'exposition de la dénutrition maternelle sur les conséquences de la programmation fœtale (**Tableau 3**). Les conséquences de cette famine sont très différentes en fonction du trimestre de grossesse. Lorsque l'exposition à la famine a eu lieu en milieu ou en fin de gestation, la descendance présentait un faible poids de naissance, une taille réduite, un poids placentaire diminué et, à l'âge adulte, une tolérance réduite au glucose (85). La sous-nutrition maternelle prénatale est également liée à une augmentation du risque

d'hypertension artérielle, de pathologies cardiovasculaires (86) mais également au risque de développement d'un syndrome métabolique. Cependant, il semblerait que ce dernier risque soit augmenté principalement lorsque la dénutrition a lieu en début de gestation. En effet, les personnes qui étaient exposées à la famine au début de leur vie intra-utérine étaient plus enclins à devenir obèses plus tard (87).

Bien que la famine hollandaise ait souvent été décrite pour des pathologies métaboliques, elle a été aussi utilisée pour montrer le lien entre la restriction calorique *in utero* et le développement des pathologies neurologiques comme la schizophrénie (88) (89).

En outre, durant la période postnatale, cette insuffisance nutritionnelle ne persiste plus car l'enfant est confronté à un environnement différent de son milieu de développement fœtal qui était carencé et métaboliquement programmé. Or, dans ce nouvel environnement prévaut une alimentation non carencée, dense en énergie et de bas niveau de dépense énergétique. Ainsi, cette différence environnementale pourrait favoriser le risque de développement des maladies métaboliques à long terme.

Tableau 3 : Conséquence à long terme de l'exposition à la famine Hollandaise. *Adapté de* (90).

	Exposition			
	Pendant la grossesse			Pendant l'enfance
	Premier trimestre	*Deuxième trimestre*	*Troisième trimestre*	
Intolérance au glucose		X	X	
Obésité	X			
Maladie coronarienne	X			
Profil lipidique athérogène	X			
Augmentation du fibrinogène / diminution du facteur VII	X			
Hypertension			X	
Microalbuminurie		X		
Obstructions des voies respiratoires		X		
Schizophrénie	X			
Troubles du spectre de la schizophrénie	X			
Anomalies congénitales du SNC (système nerveux central)	X			
Troubles de la personnalité antisociale	X			
Troubles affectifs		X	X	
Cancer du sein				X
Début précoce de la ménopause				X
Modifications de la fonction reproductrice				X
IGF-1 (Facteur de croissance analogue à l'insuline-1)				X

2. RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTÉRIN (RCIU)

2.1. Définition et Incidence

On définit un petit poids de naissance par un poids dont la valeur est inférieure au 10ème percentile (ou inférieur à 2 500 g) de celui d'une naissance à terme par rapport aux courbes de croissance fœtale. Autrefois, cette même définition était également utilisée pour définir le RCIU. C'est avec l'apparition de la notion de « *petit pour l'âge gestationnel* (PAG)» avec Battaglia et Lubchenco en 1967, que la durée de gestation est devenue un facteur clé dans le diagnostic du poids de la naissance d'un nourrisson (91). En outre, la notion de PAG fait référence au poids à la naissance sans tenir compte de la croissance *in utero*. Or, le RCIU est défini comme un taux de croissance fœtale inférieur à la normale pour le potentiel de croissance d'un nourrisson spécifique en raison de facteurs génétiques et environnementaux et selon le sexe et l'origine ethnique du fœtus (92). Bien que les termes RCIU et PAG soient utilisés de manière interchangeable, il existe des différences subtiles entre les deux. En l'absence d'une évaluation placentaire prénatale adéquate, il est certes très difficile d'établir une différenciation. Les risques postnataux étant différents, il est néanmoins important de faire la différence entre un PAG et un RCIU.

Le RCIU est une notion plus large où le fœtus n'arrive pas à atteindre son potentiel de croissance par rapport à ce qui est attendu et qui se traduit aussi par un ralentissement, voire un arrêt, de sa croissance *in utero*. En effet, un nourrisson avec un RCIU peut avoir un faible poids de naissance approprié selon la gestation mais peut avoir souffert d'une décélération de croissance *in utero* à la suite d'altérations périnatales (92). De plus, les origines du RCIU sont multiples et peuvent avoir une cause fœtale, maternelle (tabagisme, alcoolisme, pathologie cardiaque) ou placentaire (**Figure 8**).

Selon les estimations de l'OMS, d'ici 2025, 125 millions d'enfants de moins de cinq ans présenteront un retard de croissance (93). En outre, les dernières estimations de l'UNICEF rapportent que le RCIU toucherait environ 26% des enfants de moins de cinq ans (94). Cependant, l'incidence de RCIU varie selon les régions du monde, les populations et les origines ethniques. Les estimations les plus importantes concernent les pays en développement.

L'incidence du RCIU est plus élevée en Asie, principalement en Asie du Sud (75%) suivie de l'Afrique (20%) et de l'Amérique latine (5%) (**Tableau 4**) (95).

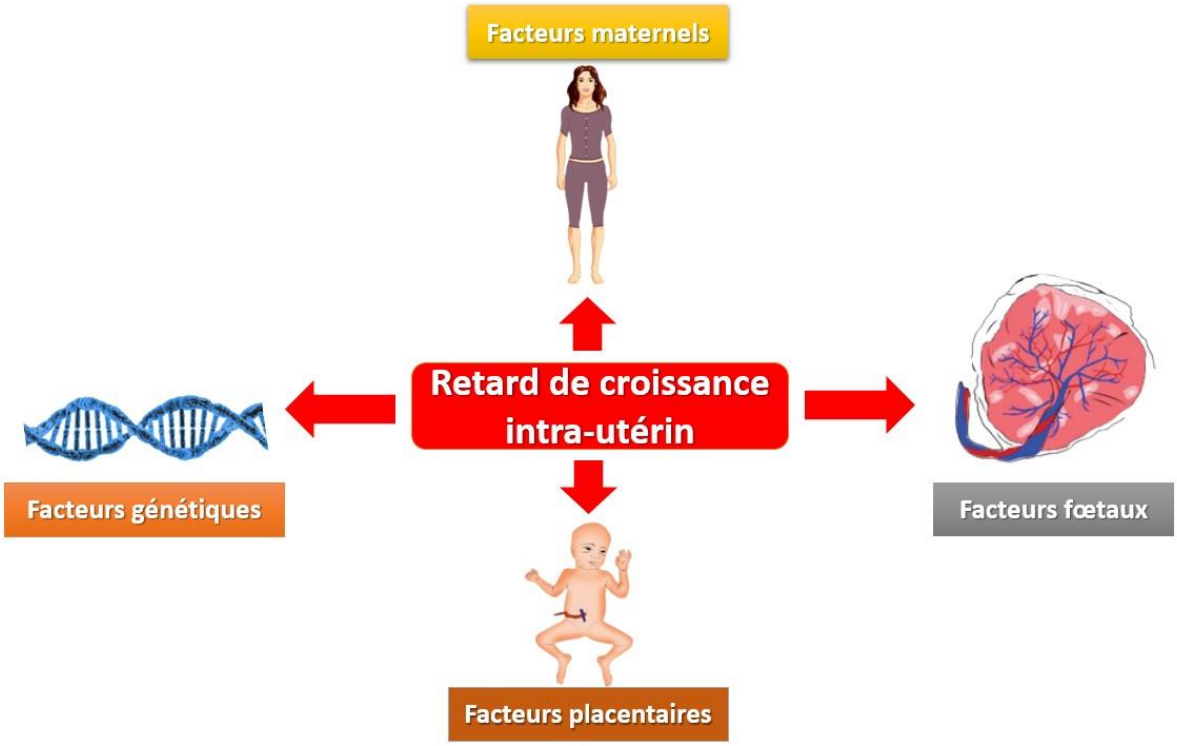


Figure 8 : Les causes multiples d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU). *Adaptée de* (92).

Tableau 4 : Distribution géographique de l'incidence des RCIU. *Adapté de* (96).

	Nombre estimé de nouveau-nés RCIU/an	Pourcentage de naissances d'enfants RCIU
Asie	7 116 000	26,9
Afrique	2 405 000	19,8
Amérique	866000	15,8
Europe	266000	7,6

2.2. Conséquences à long terme

Le RCIU est à l'origine des complications sur le développement mais aussi sur l'état de santé du nouveau-né. En effet, les nouveau-nés avec un RCIU présentent différents types de problèmes sur le court et le long terme ce qui les rend plus vulnérables à la mortalité et à la morbidité (97). Durant les dernières décennies, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une altération de la croissance du fœtus peut avoir des conséquences tout au long de sa vie future. Les risques cardiovasculaires ont été les premiers à être décrits comme présentant un lien avec un RCIU. En effet, le poids à la naissance est une mesure importante de la croissance fœtale mais aussi une donnée anthropométrique plus détaillée capable de déterminer si c'est la croissance fœtale disproportionnée ou plutôt une petite taille qui constitue un facteur de risque cardiovasculaire chez l'adulte (98) (99). En outre, dans plusieurs études de cohortes réalisées dans différents pays, il a été observé que la taille de naissance est inversement corrélée à la mortalité (100) (101) (102).

Dans les années 80, de nombreuses études observationnelles réalisées dans les pays Scandinaves et en Grande-Bretagne ont montré une association entre des faibles poids de naissance et des incidences élevées de maladies coronariennes (103).

Une première étude a mis en évidence, pour la première fois, que l'environnement intra-utérin a un effet important sur la pression artérielle et l'hypertension chez les adultes (104). Par la suite, l'épidémiologiste Barker a aussi montré que la pression artérielle était inversement corrélée au poids de naissance indépendamment de l'âge gestationnel, suggérant ainsi que cela pourrait avoir un lien avec un environnement intra-utérin délétère. Ces observations indiquent que l'environnement intra-utérin influence la pression artérielle au cours de la vie (105).

En outre, le RCIU contribue au risque de maladies chroniques par programmation fœtale, notamment dans le développement de pathologies regroupées sous le terme de syndrome métabolique, selon l'hypothèse des origines précoces de Barker. Par ailleurs, de nombreuses études observationnelles ont montré que le poids de naissance est associé au risque ultérieur d'obésité (106) (107). En effet, il semble que le poids de naissance exerce également une influence sur la morphologie à l'âge adulte. Un lien entre la résistance à l'insuline et la petite taille à la naissance a été observé dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. De plus, dans une étude portant sur des hommes âgés de 65 ans, la prévalence

du diabète non insulino-dépendant était élevée chez les hommes avec un petit poids à la naissance (108). Enfin, le RCIU est associé au développement de nombreuses pathologies à l'âge adulte (**Figure 9**)

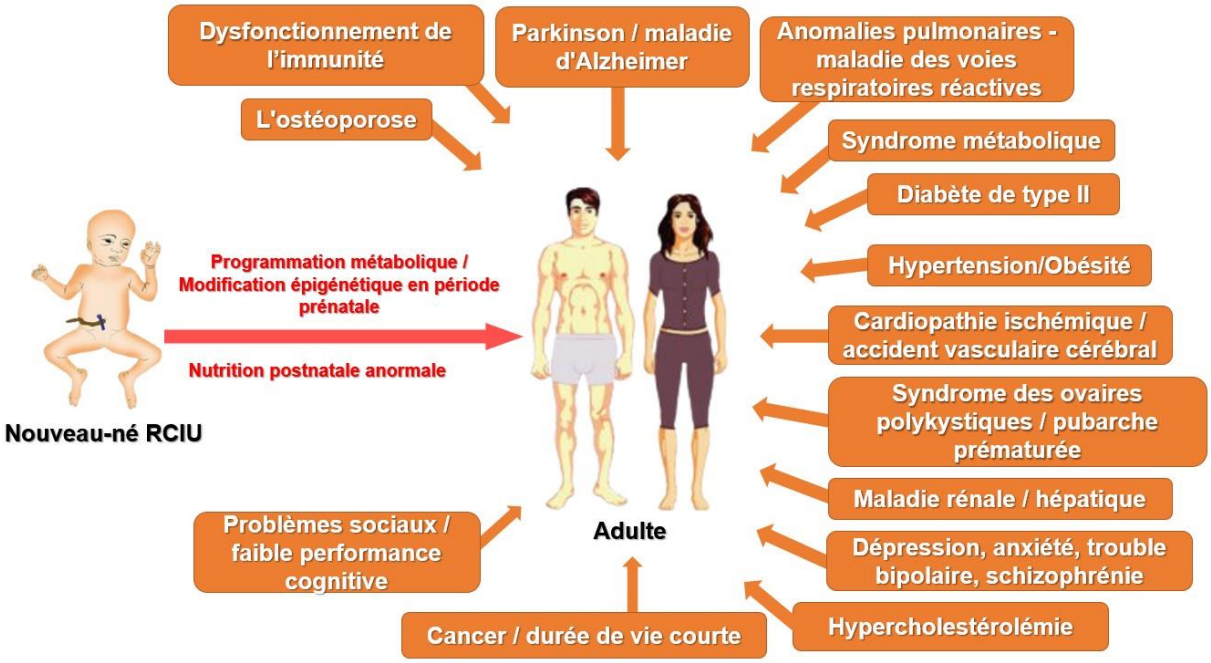


Figure 9 : Conséquences à long terme d'un retard de croissance intra-utérin. *Adaptée de* (97).

CHAPITRE III : RÔLES DES LIPIDES DANS LES PATHOLOGIES MÉTABOLIQUES ET COGNITIVES

1. LES DIFFÉRENTES FAMILLES DES LIPIDES

Les lipides constituent une vaste classe de molécules organiques très hétérogènes caractérisées par une solubilité faible ou nulle dans les milieux biologiques aqueux mais élevée dans les solvants organiques apolaires. Cependant, certains lipides amphiphiles présentent une polarité leur permettant de se diffuser facilement dans la phase aqueuse lors de l'extraction lipidique par solvant organique (109). Les lipides ont une diversité structurelle et peuvent être divisés en huit familles distinctes : les acyles gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les polykétides, les prénollipides, les saccharolipides, les sphingolipides et les stérols (110). Ils sont aussi caractérisés par la présence d'au moins un acide gras ou une chaîne d'acide gras dans leur structure. Les stéroïdes et la vitamine D sont aussi rattachés aux lipides en raison de leur insolubilité dans l'eau.

Les lipides constituent un groupe diversifié de molécules qui sont fondamentales pour l'organisation structurale et la régulation de la signalisation des cellules. Ils sont principalement divisés en 2 familles: les *lipides simples* tels que les stérols et les acides gras avec leur dérivés et *les lipides complexes* tels que les sphingolipides, les glycérolipides ou les glycérophospholipides (111). Leur grande diversité physico-chimique reflète entre autres leurs multiples fonctions au niveau cellulaire (112). De surcroit, les diverses variations de leur squelette, de la nature de leur groupe de tête et de leurs chaines acyles, donnent lieu à différents types de sous-famille et compliquent leur quantification spécifique. Même au sein d'une même famille, les différentes espèces peuvent avoir des propriétés physico-chimiques extrêmement diverses.

L'amélioration récente des techniques analytiques, telle que la spectrométrie de masse, permet une étude approfondie et beaucoup plus complète du profil lipidique de différents systèmes, des cellules aux tissus ou encore des organismes entiers, afin de comprendre le rôle des lipides dans la physiologie et dans les signalisations pathologiques.

Durant mes travaux de thèse, je me suis principalement intéressée à deux familles de lipides : les sphingolipides et les acides gras et leurs rôles dans les pathologies métaboliques et cognitives.

2. LES SPHINGOLIPIDES

2.1. Définition

Les sphingolipides sont des lipides complexes partageant une caractéristique commune qui est le squelette à partir duquel ils sont constitués, appelé « base sphingoïde » (**Figure *10***). La synthèse des sphingolipides est initiée par la condensation d'un acide gras (l'acide palmitique) à un acide aminé (la sérine) afin de former une sphinganine puis une sphingosine. La fixation d'un acide gras à longue ou très longue chaine sur le groupe amine (liaison amide du groupement R1, **Figure *10***) donne un céramide qui est la molécule précurseur des lipides de ce groupe. Les céramides peuvent être dérivés pour former des sphingolipides plus complexes, tels que les sphingomyélines, par l'ajout d'un groupe de tête, tel que la phosphocholine (113). On classe les sphingolipides en fonction de la nature du groupement R2 lié à l'hydroxyle (**Tableau 5** et **Figure *10***). Les sphingolipides sont à la fois des lipides structuraux et des molécules de signalisation (114). Il existe plusieurs formes de sphingolipides dont chacune a un rôle spécifique (115).

La voie métabolique des sphingolipides est complexe et englobe diverses molécules comme les céramides, qui représentent le noyau moléculaire de la biosynthèse et du catabolisme des sphingolipides. Ces derniers sont des composants moléculaires des membranes qui assurent leurs homéostasies. Par conséquent, des changements de la composition lipidique affectent d'une part la structure de la membrane et d'autre part l'organisation et la fonction des récepteurs.

De plus, il a été montré que les sphingolipides sont impliqués dans les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 et sont de plus en plus étudiés comme

biomarqueurs de ces pathologies au-delà des lipides traditionnels que sont le cholestérol ou les triglycérides (116).

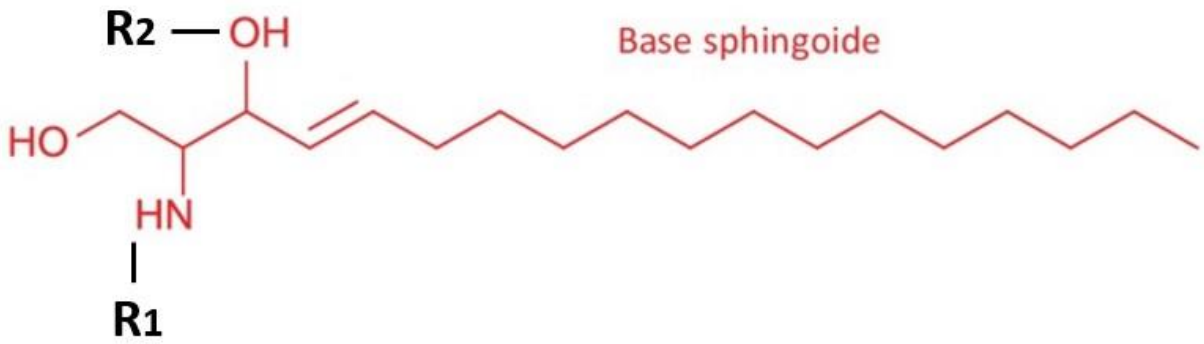


Figure 10 : Structure des sphingolipides.

Tableau 5 : La classification des sphingolipides en fonction du groupement R2.

Groupement R1	Groupement R2	Espèces de sphingolipides
H	H	Sphingosines et sphinganines
Acide gras	H	Céramides
Acide gras	Sucre (lactose, glucose)	Lactocéramides, hexosylcéramides
Acide gras	Phosphate	Céramides-1-phosphate
Acide gras	Phosphocholine	Sphingomyélines

2.2. Les sphingomyélines

Les sphingomyélines sont des phospholipides formés à partir d'un céramide lié à un groupement phosphocholine en première position. Elles doivent leur nom à leur première mise en évidence dans la gaine des axones myélinisés. Les sphingomyélines sont les sphingolipides les plus abondants. On les retrouve principalement dans les membranes et dans la gaine de myéline. La structure des sphingomyélines est spécifique en raison de l'alcool primaire de la sphingosine qui est estérifié par la partie phosphate de la phosphocholine (**Figure 11**).

Les sphingomyélines sont plus abondantes dans les cellules de mammifères et sont indispensables à la viabilité de ces dernières. Elles jouent un rôle crucial dans la formation de la membrane cellulaire pouvant avoir un impact sur le développement des pathologies métaboliques. Il existe de nombreuses preuves montrant l'implication des sphingomyélines dans la formation des radeaux lipidiques (117). Afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les sphingomyélines participent à la formation de ces radeaux, de nombreux chercheurs se sont intéressés à leur biosynthèse. Il a ainsi été montré que des défauts de biosynthèse des sphingomyélines peuvent avoir un impact direct ou indirect sur la physiologie de l'organisme (118).

La sphingomyéline synthase (SMS) est la dernière enzyme impliquée dans la biosynthèse des sphingomyélines. Il existe deux isoformes du gène de sphingomyéline synthase : la SMS-1 présente dans l'appareil de Golgi et la SMS-2 située sur la membrane plasmatique. Une étude réalisée par Van der Luit et ses collègues a montré qu'une régulation à la baisse de la SMS-1 entraine une carence en sphingomyéline dans les radeaux lipidiques. Ceci indique que l'enzyme SMS-1 est nécessaire pour la production des sphingomyélines (119). Il a également été montré qu'une inhibition de la SMS-1 et de la SMS-2 entraine une diminution significative du niveau de sphingomyélines dans les radeaux lipidiques mais aussi dans les membranes plasmiques et à l'intérieur des cellules (120). En effet, les enzymes SMS-1 et SMS-2 contribuent toutes les deux à la biosynthèse *de novo* des sphingomyélines.

En dehors de leur participation aux structures membranaires, il a été observé que certaines sphingomyélines jouaient un rôle dans les pathologies métaboliques. Dans une étude réalisée chez des souris n'exprimant pas de SMS-1, il a été constaté une diminution significative des sphingomyélines hépatiques, plasmatiques et macrophagiques. L'inhibition de la SMS-1 a

également réduit de 77 % l'activité des SMS, principalement dans les macrophages, indiquant que la SMS-1 est la principale sphingomyéline synthase dans ces cellules. Cette étude a également montré que l'inhibition de la SMS-1 conduit à une réduction de l'athérosclérose chez les souris SMS-1 (-/-) (121). De plus, une carence en SMS-1 atténue significativement l'activation de NF-κB médiée par le TLR4 après un traitement au lipopolysaccharide, indiquant un lien entre l'activité SMS-1 et la signalisation de l'inflammation (117). En outre, Mitsutake et ses collègues ont montré chez des souris knock-out (KO) SMS-2, que la carence en SMS-2 prévient l'obésité et la résistance à l'insuline induite par une alimentation enrichie en graisses (122).

Chez l'Homme, une étude réalisée chez des patients souffrant d'obésité sévère a montré que certaines espèces de sphingomyélines sériques étaient plus élevées chez les patients atteints de NASH en comparaison des patients développant une NAFLD. Cette étude a montré que les taux sériques de sphingomyélines pourraient être liés au stade de NASH et que certaines espèces de sphingomyélines pourraient être utilisées pour le suivi de l'évolution de la stéatose hépatique chez les patients obèses (123).

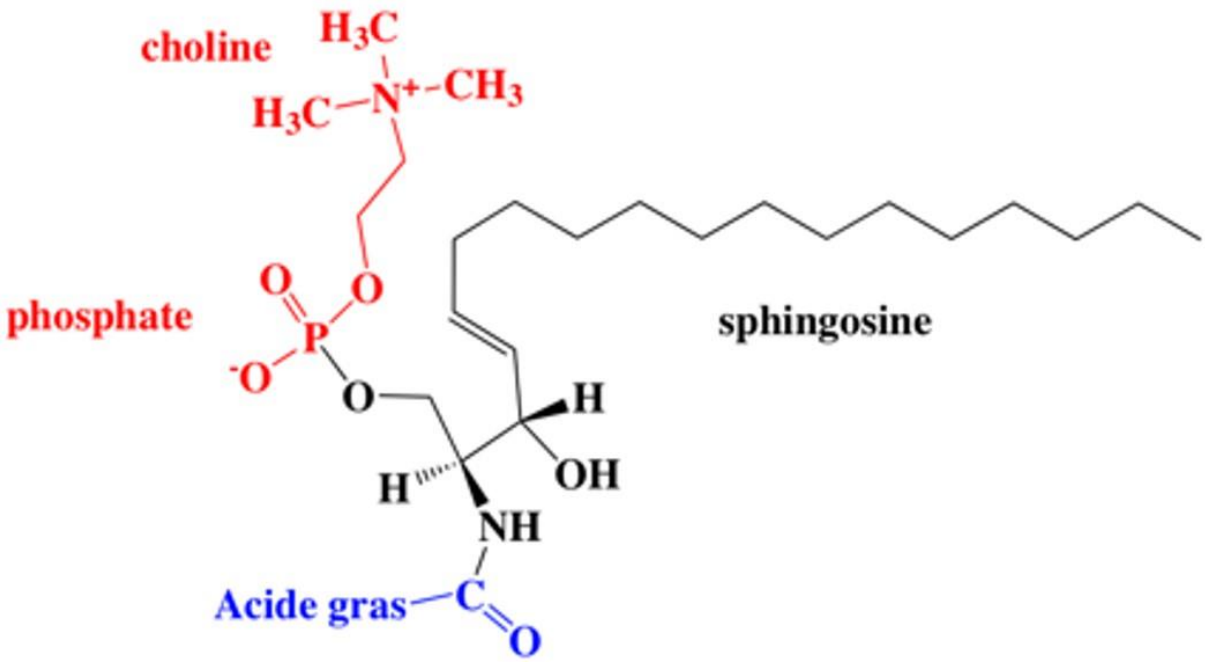


Figure 11 : Structure d'une sphingomyéline.

2.3. Les céramides

2.3.1. Synthèse et enzymes impliquées

Les céramides sont des sphingolipides peu abondants et sont dérivés des sphingosines par fixation d'un acide gras sur le groupe amine. Ils présentent une structure plus simple que celle des sphingomyélines et, les acides gras entrant dans la composition de ces molécules sont à nombre pair de carbones (16 à 24 carbones), saturés ou monoinsaturés et souvent α-hydroxylés (OH en C_2) (**Figure 12**). Le céramide peut être produit par plusieurs voies (**Figure 13**) :

- *Première voie* : Ils peuvent être générés à partir de l'hydrolyse des sphingomyélines au niveau de la membrane plasmatique par la sphingomyélinase (SMase).
- *Deuxième voie* : Ils sont aussi générés par la biosynthèse *de novo* dans le réticulum endoplasmique. Il s'agit de la voie métabolique la mieux caractérisée. Elle est initiée par une conversion médiée par le palmitoyl-CoA et la serine par la serine palmitoyltransférase (SPT) en 3-cetosphinganine. Cette dernière subit ensuite une série de réactions catalysées par les céramides synthases (CerS) pour finalement produire le céramide.
- *Troisième voie* : Les sphingolipides complexes peuvent également être dégradés par diverses enzymes et donner des céramides, qui sont ensuite convertis en sphingosine par la céramidase-acide (CA), et cette sphingosine peut rentrer dans le cytosol et être recyclée en céramide *via* la céramide-synthase (CerS). Il s'agit de la voie de récupération (**Figure 13**).
- Le stress oxydatif et les signaux inflammatoires peuvent également contribuer à la production des céramides par l'action des SMases (124).

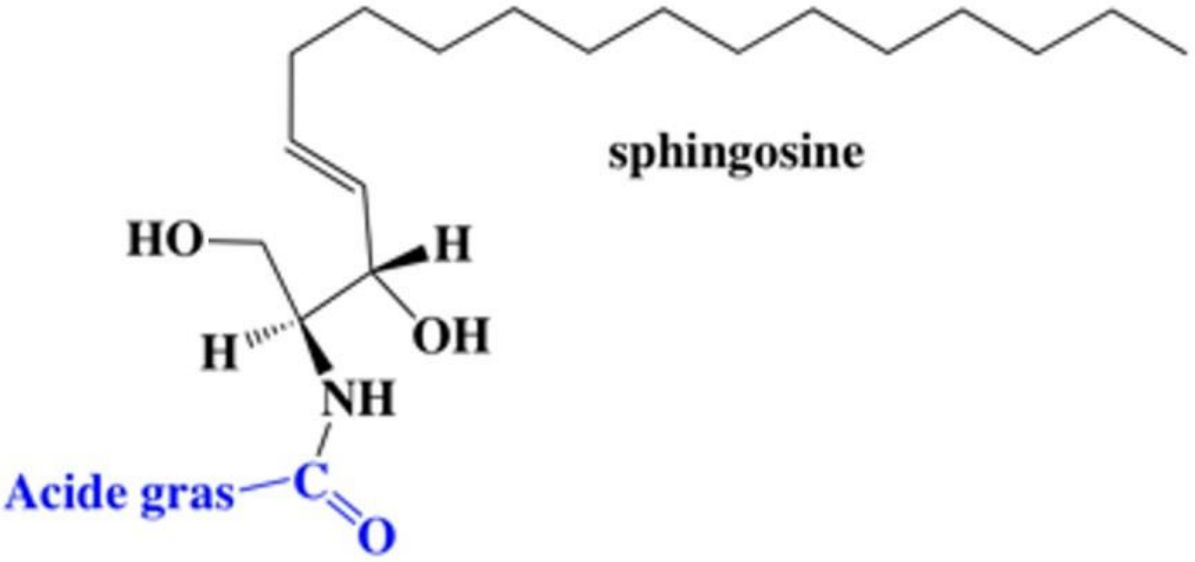


Figure 12 : Structure d'un céramide.

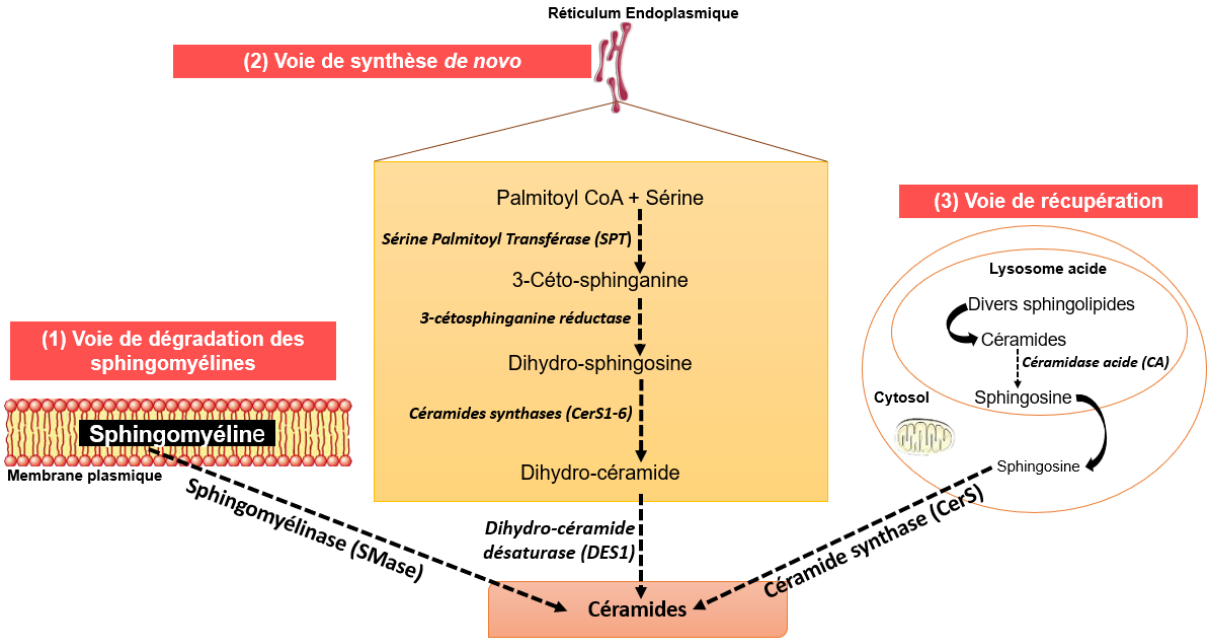


Figure 13 : Les différentes voies impliquées dans le métabolisme des céramides. (*Amran DAHER ABDI*).

2.3.2. Rôles des céramides dans l'insulinorésistance

L'obésité prédispose au développement d'une résistance à l'insuline. L'excès d'apport lipidique dans le foie ou les muscles, dont la fonction première n'est pas le stockage des graisses, entraine la formation de métabolites lipidiques qui inhibent l'action de l'insuline. L'augmentation de la masse graisseuse déclenche également une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des glucocorticoïdes inhibant l'action de l'insuline dans les tissus périphériques (125). Par conséquent, de nombreuses études ont montré que l'inflammation ou encore l'excès lipidique dans l'organisme induit par l'obésité, entraîne un taux élevé de céramides provoquant une résistance à l'insuline (126). Les céramides jouent un rôle important dans la progression des dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité. Adams et ses collègues ont montré chez l'Homme que la teneur en céramides est augmentée dans le muscle squelettique des patients obèses et résistants à l'insuline (127). De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation entre la diminution de la teneur en céramides et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (128). Les céramides régulent donc négativement l'action de l'insuline (**Figure 14**).

Il existe deux principales explications à l'action des céramides dans la résistance à l'insuline. D'une part, les céramides peuvent altérer la voie de la signalisation de l'insuline en favorisant les voies de signalisation initiées par les cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, les céramides bloquent la translocation d'AKT/PKB vers la membrane plasmique par phosphorylation (129). La capacité des céramides à interférer avec la signalisation des récepteurs d'insuline conduit alors au blocage de la capacité de ces récepteurs à activer la kinase effectrice PKB/AKT. En outre, les céramides inhibent l'absorption du glucose déclenchée par l'insuline en bloquant la translocation de Glut4 sur la membrane plasmatique mais aussi en interférant avec la synthèse du glycogène.

Les modèles d'obésité chez l'animal ont montré qu'une inhibition de la biosynthèse des céramides augmente la sensibilité à l'insuline dans les muscles, réduisant ainsi la gravité des pathologies associées à l'insulinorésistance (130). Des études réalisées sur des modèles cellulaires ont montré qu'une inhibition de l'enzyme désaturase 1 (Des 1), qui intervient à la dernière étape de la synthèse *de novo* des céramides, entraine une réduction de l'accumulation des céramides et peut être efficace dans le traitement de la résistance à l'insuline (128).

Il a été montré qu'un excès de lipides, plus particulièrement en acides gras saturés tels que le palmitate stimule la synthèse *de novo* des céramides induisant une accumulation de ces derniers. En outre, les inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la synthèse des céramides empêchent l'action du palmitate sur l'accumulation des céramides et par conséquent sur la stimulation de l'insuline (126). Cependant, le rôle des céramides dans la résistance à l'insuline reste controversé.

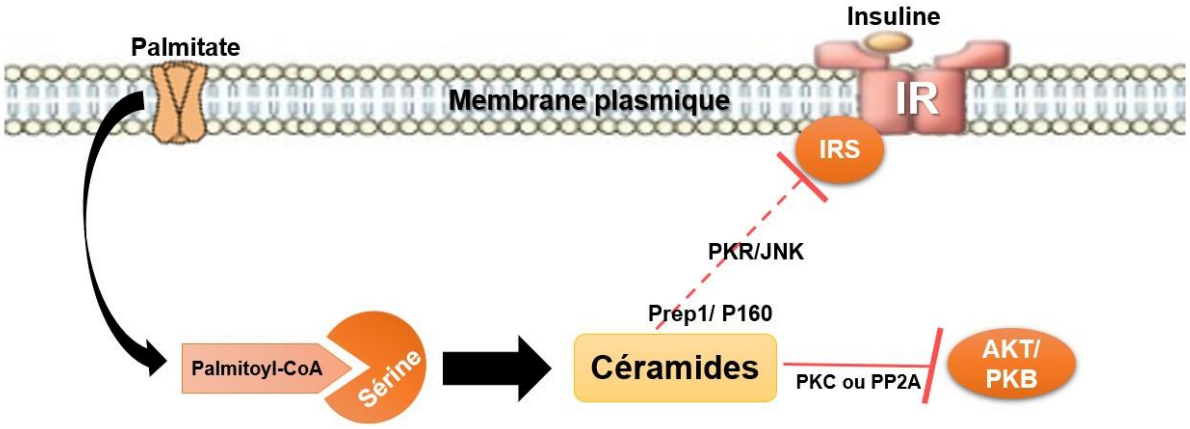


Figure 14 : Inhibition du signal de l'insuline par les céramides. *Adaptée de* (131).

Les céramides bloquent d'une part l'action d'AKT/PKB en activant la protéine phosphatase 2 (PP2A) et d'autre part le substrat récepteur de l'insuline (IRS) en induisant les axes PKR (protéine kinase activée par ARN double brin) /JNK (kinase c-Jun NH2-terminale) et ou Prep1(Protéine régulatrice de Pbx 1) /p160.

3. LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS

3.1. Définition et structure

Les acides gras insaturés sont des constituants lipidiques qui possèdent une ou plusieurs doubles liaisons, ce qui permet de distinguer respectivement les acides gras monoinsaturés et les acides gras polyinsaturés. On dénombre une quarantaine d'acides gras, mais les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les plus étudiés. Il existe quatre types de séries d'acides gras polyinsaturés (n-3, n-6, n-7 et n-9) mais deux d'entre elles ont suscité un intérêt particulier et ont été étudiés grâce à des expériences sur des souris ayant reçu une alimentation dépourvue en AGPI : la série des oméga-3 (n-3) et celle des oméga-6 (n-6). Ces numéros de série résultent de la position de la première double liaison à partir du groupement méthyle terminal.

En effet, le terme « oméga-3 » vient du fait que la première double liaison de la chaine carbonée est située à trois atomes de l'atome de carbone en comptant depuis l'extrémité de la molécule. Les oméga-3 sont des AGPI qui dérivent de l'acide gras appelé acide α-linolénique ou AAL (C18 :3 n-3). Les oméga-6 dérivent quant à eux de l'acide linoléique ou AL (C18:2, n-6). L'acide α-linolénique et l'acide linoléique sont des acides gras dits « essentiels » car les cellules des mammifères sont incapables de les synthétiser *de novo* à partir des précurseurs plus simples et doivent donc être apportés par l'alimentation.

Les oméga-3 sont les précurseurs des eicosanoïdes non-inflammatoires et sont en concurrence avec l'acide arachidonique qui est un oméga-6 précurseur des eicosanoïdes pro-inflammatoires (**Figure 15**). Cependant, un équilibre homéostatique existe. En outre, ces deux familles d'AGPI, oméga-3 et oméga-6, possèdent des enzymes communes pour leur synthèse et sont donc perpétuellement en compétition mais cette compétition révèle un avantage pour la synthèse des oméga-6. Ainsi, la synthèse de l'acide α-linolénique précurseur des oméga-3, est limitée d'où l'importance de l'apport en oméga-3 par l'alimentation.

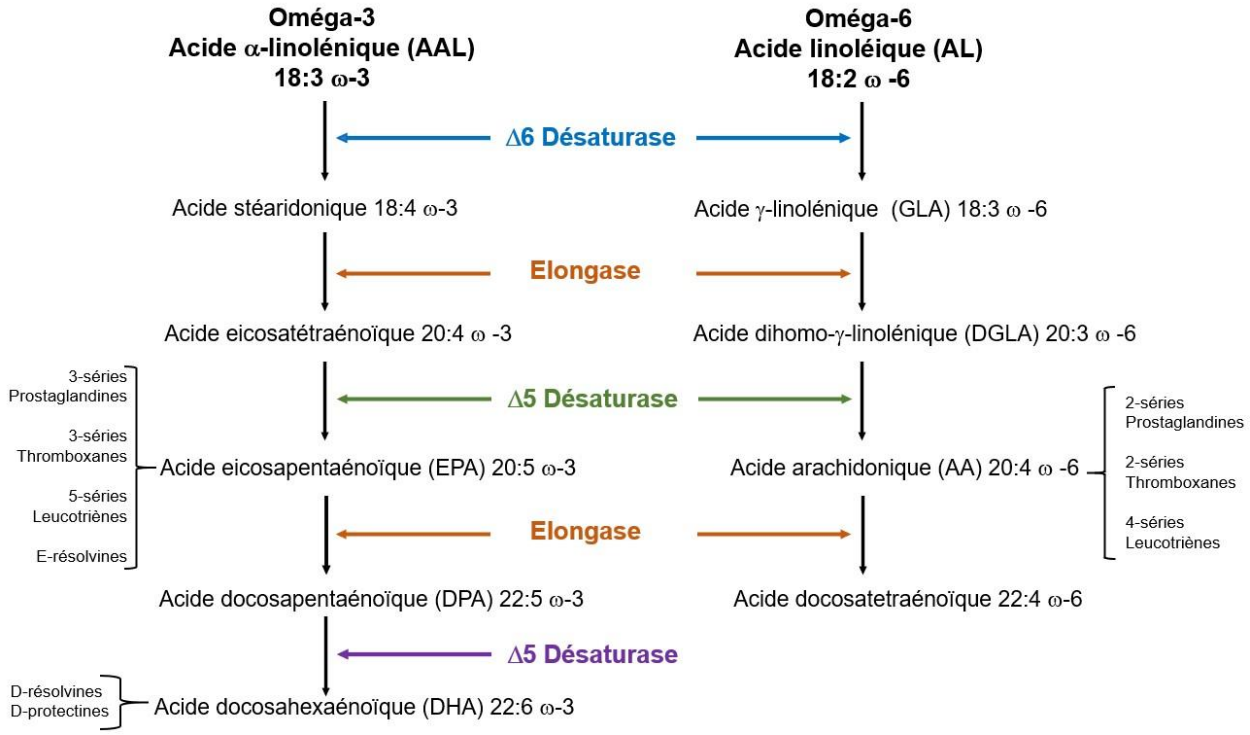


Figure 15 : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés : séries des oméga-3 et des oméga-6. (*Amran DAHER ABDI*).

3.2. Les aliments riches en acides gras polyinsaturés

Les AGPI sont des nutriments essentiels dans l'alimentation humaine et ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme pour maintenir un état optimal. Ils ont suscité un intérêt important ces dernières années en raison de leur rôle bénéfique dans la réduction du risque de développer des pathologies métaboliques. L'acide linoléique (précurseur des oméga-6) est beaucoup plus abondant que l'acide α-linolénique (précurseur des oméga-3) car sa synthèse est plus avantageuse.

On retrouve principalement les oméga-6 dans les graines de plantes comme les arachides, le tournesol ou encore le colza.

Les oméga-3 se trouvent le plus souvent dans les lipides complexes (triglycérides) de poissons gras tels que le saumon ou le thon. Les oméga-3 se retrouvent également dans les graines de plantes telles que les graines de lin. Bien que les oméga-3 proviennent principalement de producteurs primaires aquatiques tels que les algues, les ressources aquatiques sont de plus en plus limitées (**Tableau 6**). Afin de remédier à une éventuelle pénurie mondiale due à une forte demande en oméga-3, certaines plantes oléagineuses comme le canola ont été génétiquement modifiées par insertion de gènes dérivés des algues pour produire une teneur élevée en oméga-3 (132) (133).

Les sources d'AGPI peuvent varier considérablement d'un pays à un autre selon la disponibilité des aliments, les influences culturelles ou le statut socio-économique. En raison de l'agro-industrie et l'agriculture moderne, le régime alimentaire occidental actuel a montré une abondance des oméga-6 (ω6) au détriment des oméga-3 (ω3) entrainant une forte augmentation du rapport ω6/ω3 au-delà des recommandations (rapport 20:1 au lieu de 1:1) (134). Un équilibre du rapport ω6/ω3 demeure néanmoins essentiel pour la santé.

Tableau 6 : Quelques sources alimentaires de DHA C22:6 (oméga-3) non-marines. *Adapté de* (135).

Catégorie	***Produit***	***Teneur en DHA (mg/100g)***
Lait	- Lait de vache, régime basal - Lait de vache, régime spécial - Lait de vache, enrichi	- 0-10 - 10-30 - 30-50
Œufs	- Œufs de poule, régime basal - Œufs de poule, enrichi	- 20-40 - 90-180
Viande	- Agneau, muscle - Porc, muscle - Du bœufs - Lapin, muscle - Poulet, régime basal - Poulet, régime aux graines de lin	- 10-20 - 10-50 - 10-20 - 10-30 - 10-30 - 20-50
Sous-produits animaux	- Porc, graisse sous-cutanée - Porc, viscères	- 60-320 - 10-50

3.3. Les acides gras polyinsaturés oméga-3

Il existe de nombreux effets bénéfiques des AGPI oméga-3 à longue chaine (AGPI ω-3 LC) sur la santé chez l'Homme. Les deux principaux AGPI de la série des oméga-3 sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 ; **Figure *16***) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 ; **Figure *16***). Ces derniers sont les plus étudiés notamment en raison de leurs effets anti-inflammatoires (136). L'EPA, en compétition avec l'acide arachidonique (AA, C18:3) pro-inflammatoire, agit comme un inhibiteur compétitif favorisant ainsi la production des eicosanoïdes anti-inflammatoires. En outre, le DHA et l'EPA jouent un rôle physiologique important du fait de leur implication dans la fluidité membranaire mais aussi dans la synthèse des récepteurs et des transporteurs membranaires. De plus, des études conduites chez l'Homme et l'animal ont montré qu'une supplémentation en EPA et DHA peut protéger contre le développement de l'obésité en réduisant le gain de poids chez les individus obèses (137). Ils contribuent également aux effets anti-obésité en modifiant les processus métaboliques notamment en augmentant l'oxydation des acides gras. L'effet protecteur des oméga-3 est aussi observé dans plusieurs pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (136).

Parmi les AGPI de la série des oméga-3, le DHA reste le plus étudié en raison de son importance dans la neurogenèse ainsi que dans d'autres processus physiologiques tels que la mémorisation.

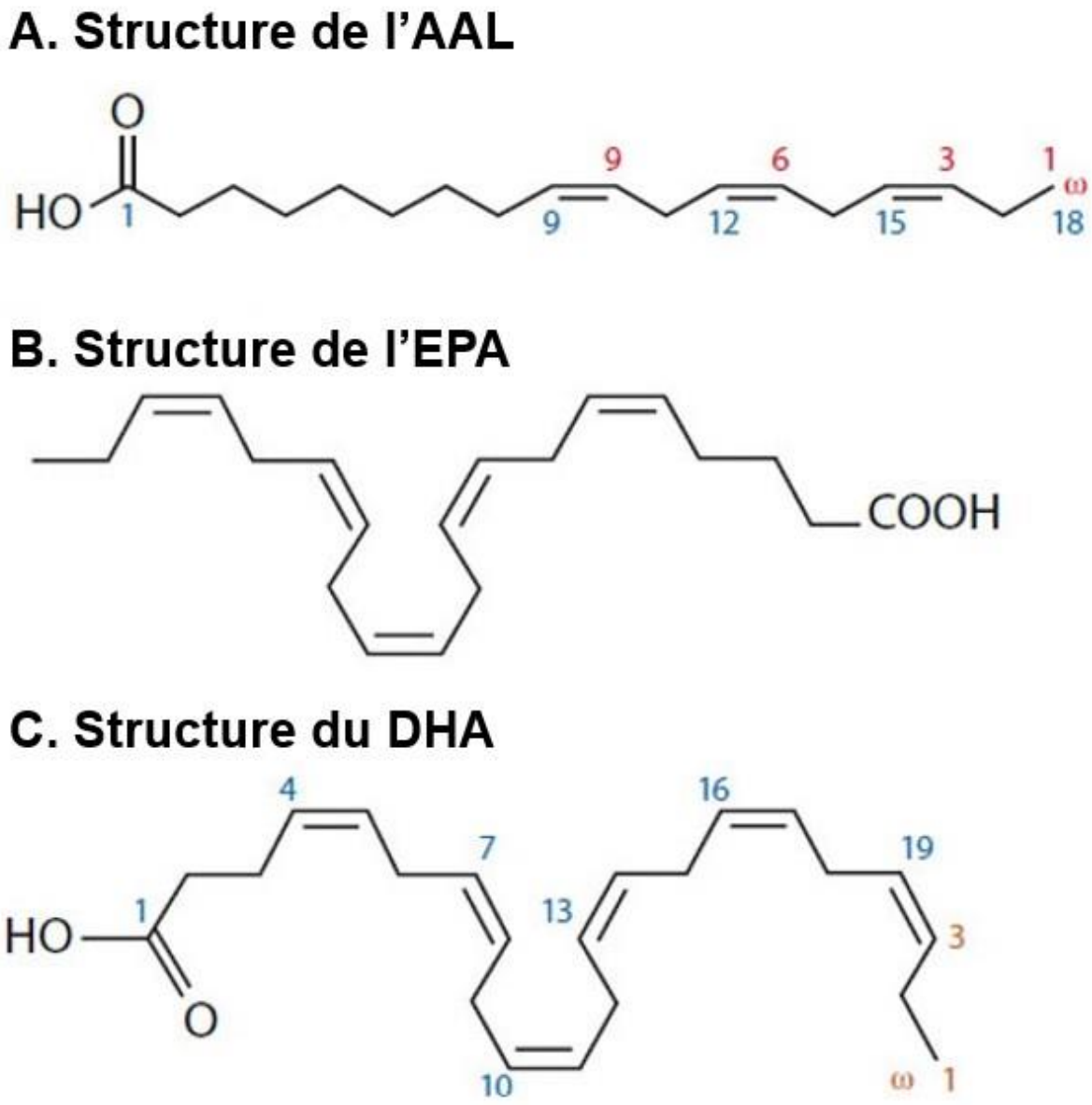


Figure 16 : A : Structure de l'AAL ; B : Structure de l'EPA ; C : Structure du DHA.

3.4. L’acide docosahexaénoïque : l’allié du cerveau

Le DHA est un acide gras de la famille des oméga-3 dont le précurseur est l’acide α-linolénique (AAL) (**Figure 15**). La conversion de ce dernier est cependant très limitée du fait de la compétition dans la conversion de l’acide linoléique (AL) et de l’AAL car les enzymes qui sont impliquées dans la voie de synthèse des oméga-3 et des oméga-6 sont identiques (**Figure 15**). Le DHA est un acide gras essentiel c'est à dire qu'il provient essentiellement de l'alimentation en raison de l’absence de synthèse *de novo* des AGPI. On retrouve le DHA à l’état naturel dans les algues. Il est l’un des AGPI oméga-3 les plus importants en raison de son influence importante sur la santé cérébrale.

Des preuves solides du rôle du DHA sur la physiologie et la croissance du système nerveux central ont émergé avec l’observation d’une transition alimentaire conduisant à la consommation d’aliments d’origine marine comme le poisson, les algues ou les crustacés. Cette hypothèse provient des résultats obtenus à partir d’études faites sur des fossiles (138). Autrefois, la consommation était axée sur un type alimentaire terrestre contenant très peu de matières grasses et surtout très faibles en AGPI à longue chaine (AGPI-LC), alors que les aliments d’origine marine étaient riches en graisses, spécifiquement en AGPI oméga-3. C’est dans ce contexte que certains chercheurs se sont intéressés aux effets de la consommation des oméga-3. Crawford a émis un lien de cause à effet entre le régime alimentaire d’origine marine et la taille importante du cerveau (139). A l’inverse, il a été observé qu’un déclin dramatique de la capacité cérébrale relative serait associé à une faible quantité de DHA dans le cerveau suggérant que l’évolution de la taille du cerveau humain dépendrait d’une source riche en DHA ayant eu lieu lors de la transition alimentaire terre/eau (140).

Le DHA est présent dans la plupart des tissus, où il assure des fonctions importantes, mais son incorporation est très élevée dans le système nerveux central car il est fondamental pour la formation et le fonctionnement de ce dernier. Le cerveau est l'un des tissus les plus riches en lipides. Il est également capable d’incorporer rapidement les AGPI pour son développement, notamment le DHA. Ce dernier est un constituant essentiel des membranes des cellules et en particulier des neurones. Par conséquent, un apport alimentaire élevé en DHA peut améliorer les fonctions et les comportements cognitifs.

En outre, le DHA est indispensable à la croissance et au développement du cerveau pendant la période fœtale et pendant l'enfance. Le DHA est considéré comme un nutriment essentiel pendant la grossesse et l'allaitement pour sa participation active au développement cérébral et de la fonction cognitive au début de la vie. La croissance cérébrale ayant lieu pendant la période intra-utérine et néonatale, l'accumulation du DHA dans le cerveau a lieu pendant cette période et son niveau est maintenu tout au long de la vie. De surcroît, l'incorporation du DHA dans le cerveau est plus importante au cours du troisième trimestre de grossesse notamment pour favoriser la croissance cérébrale et le développement visuel (141). L'apport du DHA au début de la vie dépend fortement de l'alimentation maternelle pendant la période intra-utérine et l'allaitement. Dans une étude réalisée en Australie sur des nourrissons subissant des examens post-mortem (EPM) à la suite d'une mort subite, il a été montré qu'il existait un lien entre les concentrations élevées en DHA et une amélioration du développement neurologique chez des nourrissons nourris au lait maternel en comparaison de nourrissons nourris au lait artificiel (142). De plus, une concentration élevée en DHA dans le cerveau des nourrissons allaités était liée à une amélioration du développement neurologique (142). Cependant, cela n'exclut pas la nécessité des sources exogènes de DHA dans le régime alimentaire pour répondre aux besoins des nourrissons en croissance.

Par ailleurs, il existe différentes formes de troubles cérébraux en plus des démences pouvant s'élargir dans les années à venir, dépassant probablement celui des maladies cardiovasculaires et du cancer pris ensemble (143). L'accumulation de preuves suggère que le DHA peut être efficace dans les troubles psychiatriques majeurs. Le DHA joue un rôle neuroprotecteur permettant de ralentir le vieillissement cérébral et de diminuer les risques de développement des maladies neurodégénératives. La neuroprotectine D-1 (NPD-1), dérivé structurel du DHA, présente des actions neuroprotectrices importantes notamment dans la préservation de la structure et de la physiologie des neurones mais aussi des cellules gliales (144). Le DHA se trouve en grande quantité dans les neurones en raison de sa grande fluidité.

En effet, le DHA est enrichi dans les membranes synaptiques et serait capable de changer leur fluidité ainsi que la densité des neurotransmetteurs et des récepteurs. En Australie, une étude sur des essais contrôlés et randomisés a montré que le DHA peut améliorer l'alphabétisation et le comportement des enfants atteints de trouble de déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) (145). Notre cerveau et nos neurones ont quotidiennement besoin de

DHA en raison de ses propriétés pouvant favoriser le processus de mémorisation et comme traitement potentiel de prévention des maladies neuro-dégénératives.

4. SUPPLÉMENTATION EN OMÉGA-3 POUR LA PRÉVENTION DES ALTÉRATIONS COGNITIVES ET MÉTABOLIQUES

4.1. La supplémentation en acide docosahexaénoïque (DHA)

Les études sur la supplémentation alimentaire en DHA ont monté en puissance ces dernières années, principalement en période de grossesse et de petite enfance où la supplémentation en DHA a montré une importance clinique.

Les premières preuves de la supplémentation en DHA s'appuyaient sur ses effets bénéfiques contre la dégénérescence des maladies neurocognitives. Le DHA est important pour la fonction cérébrale et un apport alimentaire plus élevé est inversement corrélé au risque relatif de la maladie d'Alzheimer. De plus, une supplémentation en DHA de 2 g/jour chez des sujets ayant une déficience cognitive légère semble améliorer la fonction cognitive et ralentir la progression de l'atrophie hippocampique (146). Cela a été également montré dans des études réalisées sur des modèles animaux, suggérant que le DHA peut exercer des effets pléiotropes sur la maladie d'Alzheimer, notamment en limitant la production et l'accumulation de la toxine peptidique amyloïde β atténuant ainsi les troubles comportementaux associés (147). La supplémentation en DHA semble également avoir un effet protecteur contre les autres démences notamment le déclin cognitif lié à l'âge.

Plus récemment, l'effet durable du DHA chez la descendance a montré que l'apport et le statut en DHA de l'enfant étaient liés à l'apport de la mère pendant la grossesse. En outre, il a été démontré que l'apport maternel en DHA améliore les performances de leur descendance sur les tests cognitifs, le langage et la mémoire à court terme (148). De façon similaire, une autre étude a montré que le quotient intellectuel (QI) élevé était corrélé à l'apport maternel en

DHA chez des enfants âgés de quatre ans (149). Le développement du fœtus et du nouveau-né dépendant fortement de l'apport maternel, une supplémentation maternelle en DHA semble donc améliorer le bon développement neuronal de l'enfant.

C'est au début des années 1980, que des études épidémiologiques ont évalué la relation entre la consommation de poissons et les maladies coronariennes. Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, sur la consommation des poissons chez des hommes sans antécédents de maladie coronarienne, les auteurs ont montré que la mortalité par maladie coronarienne était réduite de moitié chez ceux qui consommaient du poisson contrairement à ceux qui n'en consommaient pas, suggérant ainsi que la consommation quotidienne d'au moins 30 g de poisson avait un effet préventif contre ces pathologies (150). Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que la supplémentation en DHA a des effets antiathérogènes et antithrombotiques potentiellement importants et améliore la fonction vasculaire (151) (152) . Des essais cliniques ont également démontré plus récemment une diminution de l'incidence des maladies coronariennes s'expliquant par une diminution des triglycérides plasmatiques et une inhibition de la thrombose (153) (154) (155) (156) (157) (158).

La supplémentation maternelle en DHA améliore également le développement visuel. Il a été montré que les nourrissons de quatre mois, dont les mères avaient consommé une alimentation enrichie en DHA pendant la grossesse, présentaient des scores d'acuité visuelle plus élevés en comparaison des témoins (159). La consommation du DHA de la mère pendant le dernier semestre de grossesse entraine également une réduction des naissances prématurées précoces et une taille du nourrisson plus grande (160). La supplémentation maternelle en DHA est donc importante en raison de son rôle dans le développement neuronal, visuel et cognitif.

La supplémentation en DHA améliore aussi plusieurs anomalies métaboliques sous-jacentes à l'obésité, notamment le développement du diabète de type 2. Dans une étude réalisée chez le rongeur, la supplémentation en DHA inhibe l'inflammation et améliore la sensibilité à l'insuline induite par l'obésité (161). Vemuri et ses collègues ont également montré que la supplémentation en DHA chez la souris réduisait la résistance à l'insuline médiée par des niveaux circulants élevés d'adiponectine (162). Cependant, les études cliniques chez l'Homme restent controversées sur les effets de la supplémentation en DHA sur l'insulinorésistance et mentionnent un effet dose-dépendant. En outre, une amélioration des effets délétères de la stéatose hépatique chez les rongeurs a été corrélée à une supplémentation en DHA dont les

effets bénéfiques tendent à réduire les triglycérides hépatiques par une forte β–oxydation et une inhibition de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de la lipogenèse *de novo* (163). Les données chez l'Homme suggèrent que la supplémentation en DHA peut être efficace dans les premiers stades de la NAFLD mais pas chez les patients atteints de NASH plus sévères (164).

4.2. Mécanismes d'action du DHA

Bien que les mécanismes sous-jacents impliqués ne soient pas complétement compris, le DHA a des propriétés polyvalentes avec un large éventail d'actions qui peuvent aller de la participation aux processus d'oxydation cellulaire et de la signalisation intracellulaire aux rôles modulateurs dans l'expression des gènes et dans la fluidité membranaire. Entre autres, ce sont les propriétés anti-inflammatoires du DHA qui ont le plus été étudiées. Le DHA interagit avec plusieurs récepteurs tels que les récepteurs de la famille Toll-like (TLR), les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) et les récepteurs couplés à la protéine G (GPR).

Les TLR sont l'une des principales familles de récepteurs de reconnaissance de formes jouant un rôle important dans l'induction de réponses immunitaires innées et adaptatives (165). En outre, la liaison de TLR (2 et 4) à son ligand active les voies pro-inflammatoires en aval qui incluent NF-κB et les MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases). Une étude sur modèles cellulaires a montré que l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) induite par un lipopeptide synthétique, agissant comme un agoniste de TLR2, est principalement inhibée par le DHA. Cela était corrélé à une suppression de NF-κB. Les auteurs ont montré que l'action inhibitrice de NF-κB par le DHA vise directement le TLR lui-même et non les composants de signalisation en aval, influant ainsi sur la cascade de signalisation qui en découle (166). Dans une autre étude, la même équipe a montré que le DHA module l'action des TLR en inhibant l'activation du TLR2 induite par les lipopeptides (167). Cependant, les mécanismes sous-jacents de cette modulation ne sont pas encore connus.

Il est maintenant bien établi que le TLR4 est recruté et dimérisé dans les fractions des radeaux lipidiques après traitement au lipopolysaccharide (LPS). Les radeaux lipidiques servent de plate-forme pour l'initiation de la transduction du signal médié par les récepteurs. Le DHA pourrait modifier la composition lipidique du radeau, voire empêcher leur formation, ce qui entrainerait un déplacement des récepteurs de signalisation au niveau de ces zones de la membrane plasmique (radeaux lipidiques). Cela conduirait donc à la suppression de la signalisation inflammatoire médiée par les TLR. Par ailleurs, il a été montré que le DHA inhibe la dimérisation du TLR4 induite par le LPS et le recrutement de TLR 4 dans les radeaux lipidiques qui sont les premières étapes des voies de signalisation médiée par le TLR4 (**Figure 17**) (168).

Des nombreuses études ont montré que le mécanisme par lequel le DHA inhibe les réponses pro-inflammatoires implique l'activation de plusieurs récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes tels que PPARɣ (169). En effet, des niveaux élevés de DHA augmentent la transcription de PPARɣ modulant les réponses inflammatoires médiées par le facteur de transcription NF-κB, un activateur clé de la cascade de signalisation pro-inflammatoire (**Figure 17**) (170) (171).

Plus récemment, il a été montré que les récepteurs couplés à la protéine G fonctionnent comme des récepteurs capteurs des AGPI oméga-3, principalement le GPR120. Ce dernier interagit avec le DHA et peut moduler les voies anti-inflammatoires. Oh et ses collègues ont montré que l'activation de GPR120 par le DHA nécessitait le recrutement de β-arrestine-2 avec son ligand formant un complexe qui peut se lier à TAB 1 (Protéine 1 de liaison de la kinase 1 activée par TGF-β) bloquant par conséquent la liaison TAB 1 avec TAK 1 (kinase 1 activée par TGF-β). Ce phénomène entraine une inhibition de la phosphorylation et de l'activation de TAK1. Le DHA inhibe donc les signaux d'entrée *via* une interaction GPR120/β-arrestine-2 inhibant à la fois les réponses pro-inflammatoires médiées par TLR4 et TNFα (**Figure 17**) (161).

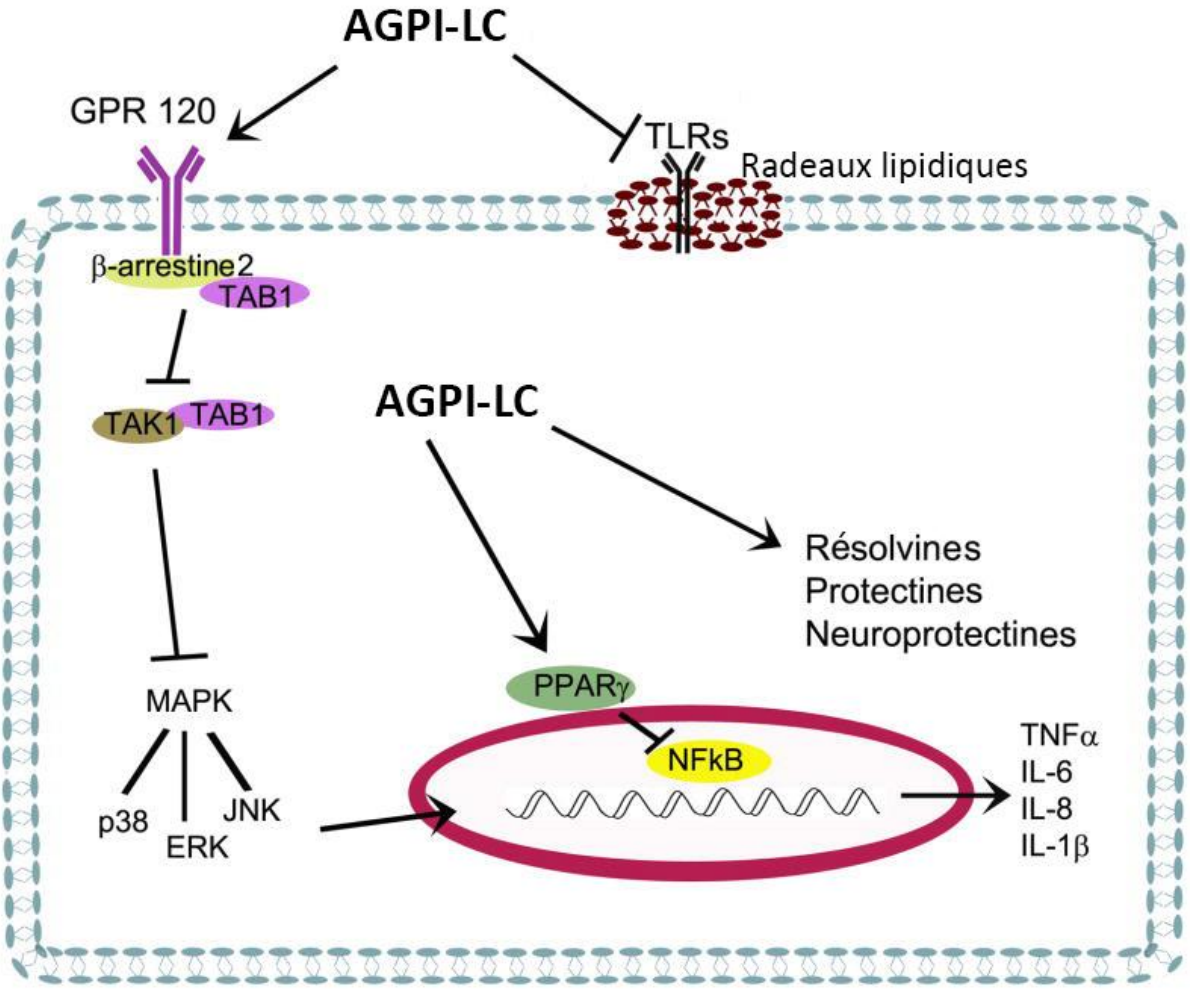


Figure 17 : Mécanismes d'action du DHA. *Adaptée de* (172).

III. OBJECTIFS

DE LA THÈSE

L'environnement intra-utérin auquel un fœtus est exposé peut avoir un impact à long terme sur la santé après la naissance. Lors du développement intra-utérin, le fœtus est vulnérable à divers facteurs, principalement affectés *via* la mère. L'état mental de la mère, l'environnement auquel elle est exposée, son activité physique et ses habitudes alimentaires peuvent affecter de façon permanente la santé et l'état physique de l'enfant en pleine croissance. Par conséquent, les facteurs les plus importants impliqués dans la programmation fœtale dépendent de l'état nutritionnel de la mère. Ainsi, des troubles alimentaires durant la grossesse, comme un régime hypocalorique, ont des effets néfastes sur la croissance et le développement fœtal. Un apport insuffisant en éléments essentiels au développement, notamment la pénurie de nutriments pendant la grossesse, entraine un retard de croissance intra-utérin. La dénutrition intra-utérine active des processus d'adaptation qui permettent une gestion optimale des nutriments par un apport économe et sélectif aux organes primordiaux (cerveau et cœur). Néanmoins, ces altérations salvatrices entraînent une restriction de croissance et ont des conséquences néfastes sur le développement mais aussi l'efficacité des fonctions d'autres organes (173). L'influence d'un régime maternel hypocalorique sur le développement fœtal a été reconnue pour la première fois lors de la famine hollandaise. L'étude des cohortes a montré que les sujets dont les mères avaient connu la famine étaient prédisposés aux maladies coronariennes et même à la schizophrénie (174) (175). La probabilité d'apparition d'un syndrome particulier à l'âge adulte dépendait du moment de la grossesse au cours duquel le facteur nocif était apparu : plus le stade de grossesse était précoce, plus le risque de complications graves était élevé (176). Les résultats de la programmation nutritionnelle à long terme dépendent non seulement de la perturbation des conditions intra-utérines optimales, mais aussi du moment où cette perturbation se produit, du fait que certains organes sont caractérisés par diverses « périodes critiques » de développement. Enfin, l'environnement intra-utérin dépend de l'état nutritionnel de la mère et détermine non seulement le risque d'apparition de la maladie mais aussi le moment de l'apparition de la pathologie et l'intensité du processus pathologique.

Par ailleurs, une importance particulière est aussi accordée au mode de vie alimentaire tout au long de la vie. De nos jours, la disponibilité illimitée d'aliments hautement transformés ainsi que la diminution de l'activité physique est un problème particulièrement important. Cela interfère avec l'équilibre énergétique et conduit à l'épidémie d'obésité. De plus, un statut socio-économique élevé dans la société devient de plus en plus courant, élargissant la taille de population piégée dans ce cercle vicieux (177). Comme l'a écrit Hippocrate « *la corpulence n'est pas seulement une maladie en elle-même, mais le signe avant-coureur des autres* »,

reconnaissant que l'obésité est une pathologie grave qui entraine également des nombreuses comorbidités. Au cours de ces dernières années, la prévalence mondiale de l'obésité a nettement augmenté et le nombre de décès annuel attribuable à l'obésité ne cesse d'accroitre. L'OMS a décrit l'obésité comme l'un des problèmes de santé publique le plus manifestement visible, mais le plus négligé, qui menace de submerger les pays les plus développés comme les pays les moins développés (178). Les problèmes d'obésité et de surpoids n'ont été mondialement reconnus qu'au cours de ces dix dernières années, contrairement à la dénutrition maternelle, l'insuffisance pondérale et les maladies infectieuses qui ont toujours dominé la réflexion. Bien que les connaissances sur l'obésité s'améliorent chaque année, de nombreuses questions concernant la prévention et le traitement restent encore ouvertes.

Grâce à une modification ou à une supplémentation appropriée de l'alimentation, les femmes enceintes transmettent un impact positif au phénotype de leur enfant non seulement sur leur poids corporel, mais aussi, *via* une action épigénétique, sur des effets à long terme sur leur santé, y compris sur la fonctionnalité du système nerveux tout en long de leur vie et sur la réduction des syndromes métaboliques liés aux risques d'obésité. Les AGPI, principalement le DHA, présentent un intérêt important pendant la grossesse car ils peuvent améliorer les résultats de la grossesse tels que sa durée, et parce qu'ils peuvent également augmenter la croissance du nourrisson et améliorer sur le court et le long terme le développement de la descendance.

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier les effets de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation sur les altérations métaboliques et cognitives que pourraient entrainer une obésité ou une dénutrition maternelle chez la descendance. Nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation protégerait la descendance des effets délétères de l'obésité et de la dénutrition maternelle sur le long terme. Afin de tester notre hypothèse, nous avons utilisé un modèle de programmation fœtale chez le rat basé sur un régime maternel hypocalorique à 50% et, d'autre part, un modèle d'obésité basé sur une alimentation postnatale de choix riche en sucres et en graisses.

Comme une supplémentation en DHA possède des effets protecteurs contre l'accumulation des triglycérides hépatiques, je me suis principalement intéressée à l'effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les altérations des différentes voies métaboliques induites par l'obésité au niveau du foie de la descendance. J'ai en particulier déterminé si la supplémentation maternelle en DHA protégeait la descendance contre le développement d'une stéatose hépatique, le but étant de savoir si les effets protecteurs du DHA perduraient chez la

descendance et s'il y avait un effet du sexe, tout en apportant de nouveaux éléments quant aux mécanismes d'action du DHA.

Etant donné que le DHA est avant tout un lipide, j'ai également cherché à savoir si les effets du DHA dans la stéatose hépatique de la descendance étaient liés à sa charge lipidique ou à ses propriétés spécifiques. Nous avons donc comparé les effets du DHA à un autre lipide. Nous avons ensuite élargi nos investigations en évaluant les effets de la supplémentation maternelle en DHA chez la descendance, sur les familles de lipides autres que les triglycérides en réalisant une analyse quantitative ciblée des sphingolipides, reconnus pour leur rôle dans les pathologies métaboliques liées à l'obésité.

Enfin, le DHA est connu pour avoir des effets bénéfiques dans les altérations cognitives. Dans le but de proposer un traitement thérapeutique non invasif et de savoir si les effets neuroprotecteurs du DHA perdurent chez la descendance, je me suis intéressée au rôle du DHA dans les altérations comportementales de la descendance. J'ai en particulier déterminé si la supplémentation maternelle en DHA était capable de contrecarrer les altérations du comportement induites par l'effet programmateur d'une dénutrition maternelle.

IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. ANIMAUX

Les modèles animaux qui ont été utilisés dans les différentes expériences sont des rats mâles et femelles WISTAR (Charles River). Les animaux ont été acclimatés à l'animalerie pendant une semaine avant chaque expérimentation avec l'accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, un cycle nuit/jour inversé et une température de 20°C.

2. MODÈLE DE PROGRAMMATION MÉTABOLIQUE

- **1ère série expérimentale des animaux mâles âgés de 3 mois : impact de l'obésité postnatale et supplémentation maternelle en DHA**

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*.

À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à huit petits par portée. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard ou exposés à de la nourriture standard en même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre (*free choice High-Fat High-Sugar : fcHFHS).* Six groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: *Saline-standard diet*; *Saline-fcHFHS diet*; *DHA-standard diet*; *DHA-fcHFHS diet* ; *Carthame-standard diet* et *Carthame-fcHFHS diet* (se référer à la **Figure 18** et au **Tableau 7**).

Les caractéristiques anthropométriques et métaboliques de la progéniture ont été évaluées à trois mois.

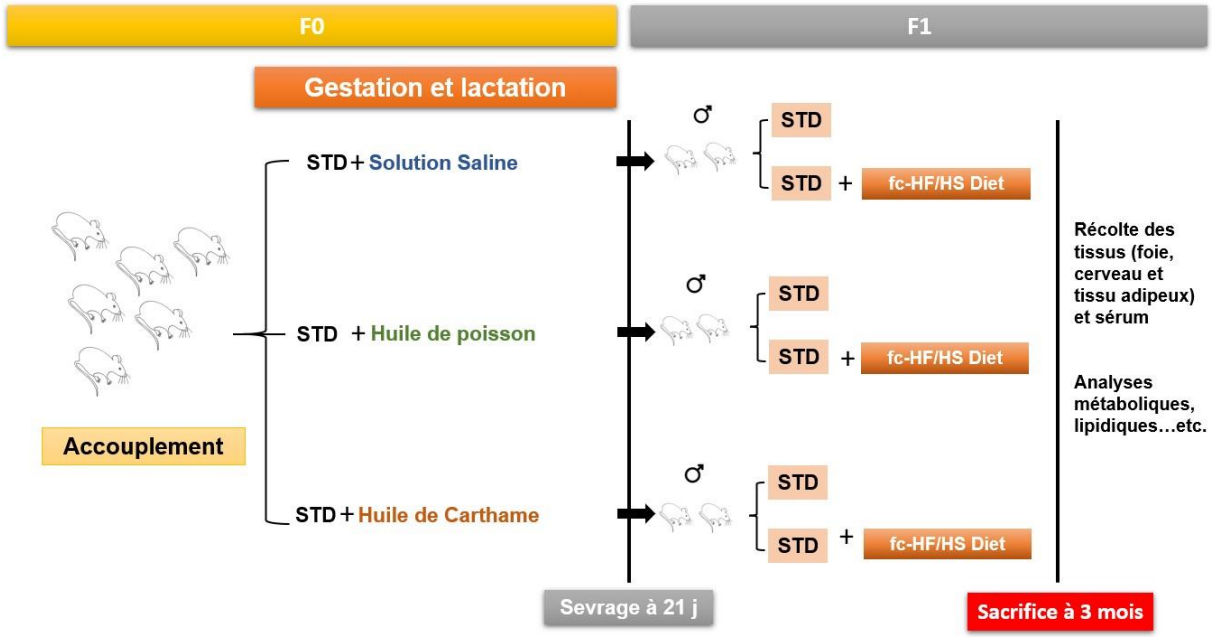


Figure 18 : Modèle de programmation métabolique de l'expérimentation des animaux mâles âgés de 3 mois.

STD : *régime standard;* ***fc-HFHS Diet :*** *free choice-High-Fat High-Sugar (régime riche en sucres et en graisses au choix).*

Tableau 7 : Groupes expérimentaux et régimes alimentaires.

Génération FO (femelles)	***Génération F1 (mâles)***
- ♀ *ayant reçues une* ***solution saline*** *et nourries avec une* ***alimentation standard*** *ad libitium durant la* ***gestation et la lactation***	♂ nourris au régime standard *ad libitium* (**Saline-standard diet**)
	♂ nourris au choix avec un régime standard et un régime riche en sucres et en graisses *ad libitium* (**Saline-fcHFHS diet**)
- ♀ *ayant reçues un extrait* ***d'huile de poisson*** *et nourries avec une* ***alimentation standard*** *ad libitium durant la* ***gestation et la lactation***	♂ nourris au régime standard *ad libitium* (**DHA-standard diet**)
	♂ nourris au choix avec un régime standard et un régime riche en sucres et en graisses *ad libitium* (**DHA-fcHFHS diet**)
- ♀ *ayant reçues un extrait* ***d'huile de carthame*** *et nourries avec une* ***alimentation standard*** *ad libitium durant la* ***gestation et la lactation***	♂ nourris au régime standard *ad libitium* (**Carthame-standard diet**)
	♂ nourris au choix avec un régime standard et un régime riche en sucres et en graisses *ad libitium* (**Carthame-fcHFHS diet**)

- **2ème série expérimentale des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois : impact de l'obésité postnatale et supplémentation maternelle**

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*.

À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à huit petits par portée. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard ou exposés à de la nourriture standard en même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre (*free choice High-Fat High-Sugar : fcHFHS).* Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: *mâles saline-standard diet*; *mâles saline-fcHFHS diet*; *mâles DHA-standard diet*; *mâles DHA-fcHFHS*; *femelles saline-standard diet*; *femelles saline-fcHFHS diet*; *femelles DHA-standard diet*; *femelles DHA-fcHFHS.*

Les caractéristiques métaboliques de la progéniture ont été évaluées à six mois (**Figure 19**).

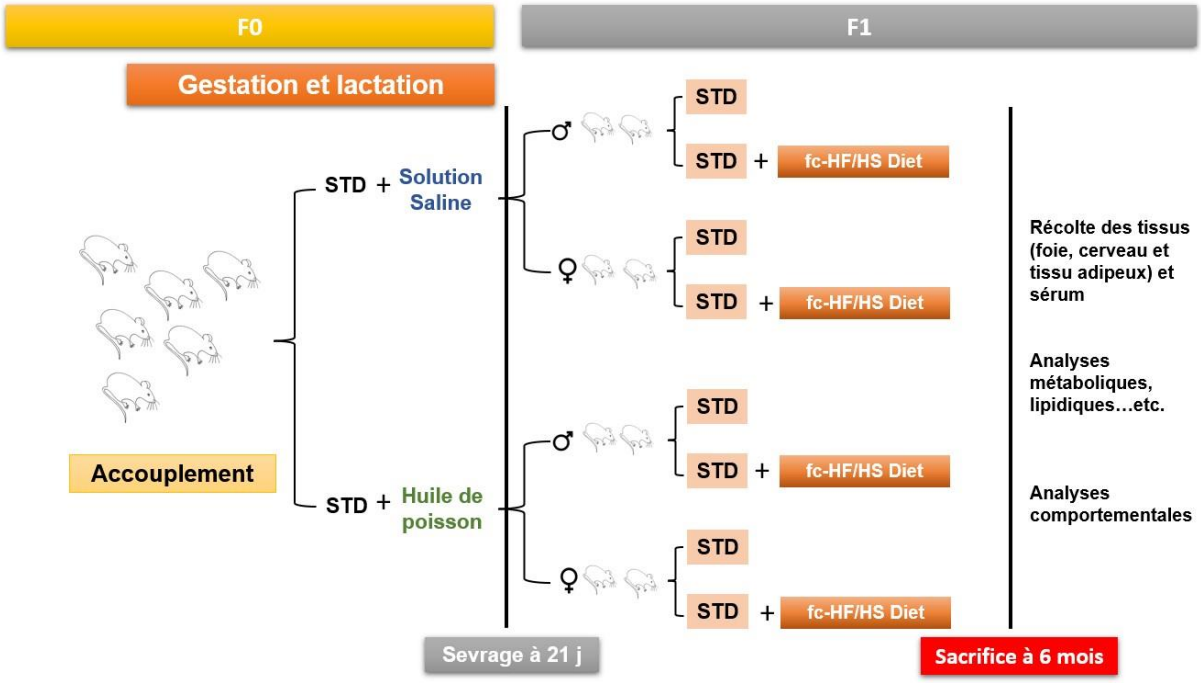


Figure 19 : Modèle de programmation métabolique de l'expérimentation des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois.

STD : *régime standard;* ***fc-HFHS Diet :*** *free choice-High-Fat High-Sugar (régime riche en sucres et en graisses au choix).*

- **3ème série expérimentale des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois : impact de la dénutrition maternelle et la supplémentation maternelle en DHA**

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme

placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition).

À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits par portée. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: *mâles contrôles-saline* ; *mâles dénutris-saline*; *mâles contrôles-DHA*; *mâles dénutris-DHA*; *femelles contrôles-saline*; *femelles dénutries-saline*; *femelles contrôles-DHA*; *femelles dénutries-DHA*.

Les changements comportementaux de la progéniture ont été évalués à six mois (**Figure 20**).

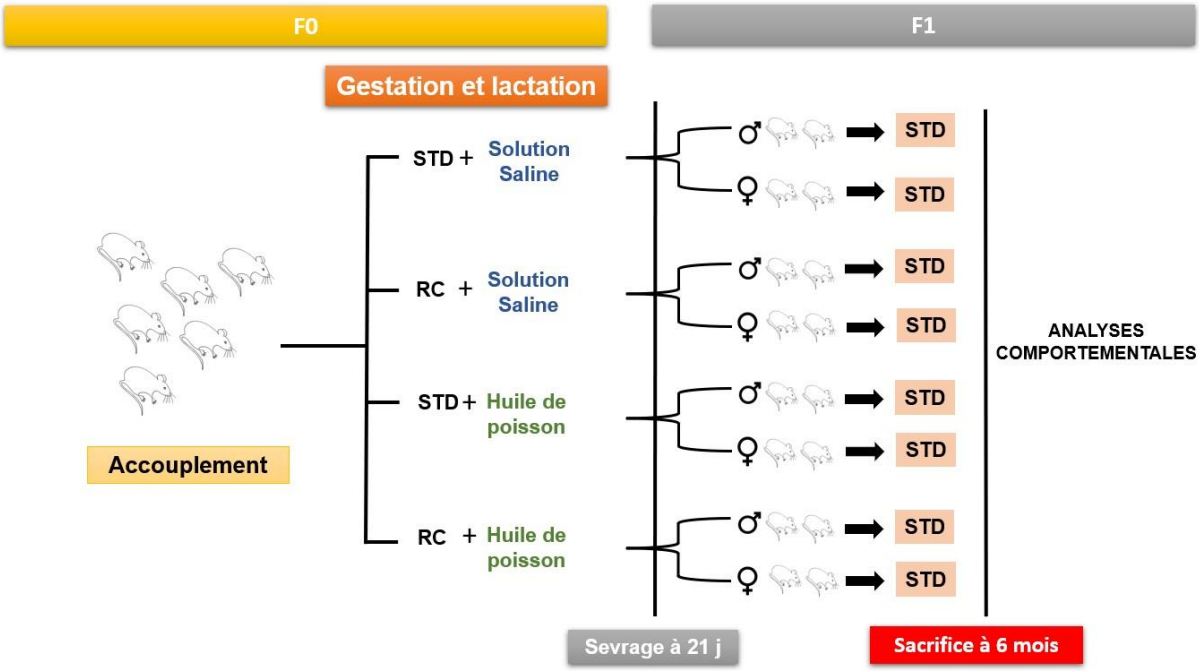


Figure 20 : Modèle de programmation métabolique d'une dénutrition maternelle de l'expérimentation des animaux mâles et femelles âgés de 6 mois.

STD : *régime standard;* ***RC :*** *Restriction calorique.*

3. COMPOSITIONS DES RÉGIMES

Le régime standard pour les femelles gestantes et allaitantes était composé de croquettes de type A03 (69,20% de céréales ; 20,20% de protéines végétales ; 4,60% de mélange vitaminique et minéral ; 6% de protéines animales).

Pour les femelles dénutries ayant reçu le régime a*d libitum* à 50%, la consommation des croquettes des femelles contrôles a été pesée quotidiennement tout au long de la gestation et la lactation et la moitié a été donnée aux femelles dénutries pendant la gestation et la lactation pour induire une restriction calorique.

Le régime standard postnatal des animaux était composé des croquettes de type A04 (83,90% de céréales ; 8% de protéines végétales ; 4,10% de mélange vitaminique et minéral ; 4% de protéines animales).

Le régime postnatal riche en sucre et en graisses était composé de 30% de sucres et de graisses. Il a été donné aux animaux adultes pendant 3 mois (mâles) pour la première série d'expérimentation et pendant 6 mois (mâles et femelles) pour la deuxième série d'expérimentation.

4. TEST DE RECONNAISSANCE DE NOUVEL OBJET (NOR)

Le test de reconnaissance d'objets est l'un des tests comportementaux le plus couramment utilisé chez les rongeurs. Il est basé sur le comportement spontané des rongeurs et l'exploration différentielle d'objets familiers et nouveaux. Dans la première session, les rats ont été exposés à deux objets identiques puis l'un des objets a été remplacé par un nouvel objet lors de la deuxième session (**Figure 21**). Le temps pris pour explorer le nouvel objet fournit un indice sur la mémoire de reconnaissance. Les rats contrôles ont fait la distinction entre les deux objets et ont passé plus de temps à explorer le nouvel objet que l'objet familier. Au contraire, les animaux présentant des déficits cognitifs n'ont pas distingué le nouvel objet de l'objet familier et ont passé un temps similaire sur les deux objets.

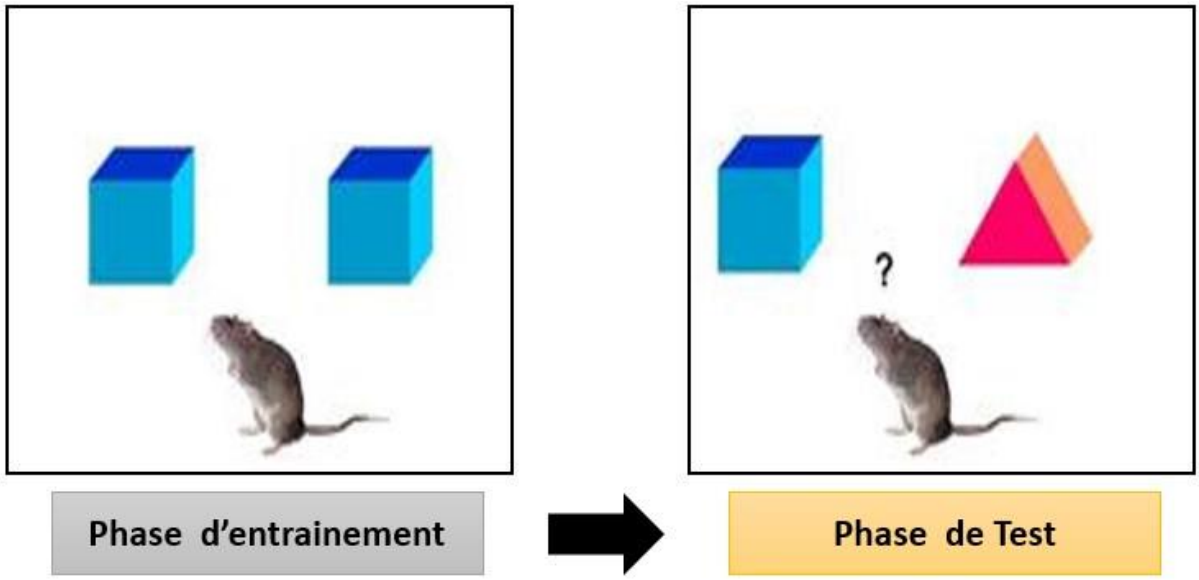


Figure 21 : Illustration schématique du test de reconnaissance des nouveaux objets.

5. TEST DE « *ELEVATED PLUS MAZE* »

Le test d'« *Elevated plus maze* » est l'un des modèles le plus utilisé pour mesurer le comportement anxieux chez les rongeurs. Ce test est basé sur le comportement spontané des rongeurs. Le labyrinthe est composé de quatre bras surélevés et reliés à une plateforme centrale pour former un « Y ». Deux des bras opposés sont fermés et les deux autres bras sont ouverts en dehors de la plateforme centrale (**Figure 22**). Chaque rat a été placé dans la zone centrale du labyrinthe puis laissé libre de l'exploration du labyrinthe pendant une courte durée de temps défini (environ 10 minutes). Ensuite, le nombre d'entrée dans chaque compartiment (bras ouverts, bras fermés et zone centrale) et le temps passé dans chacun des compartiments ont été enregistrés avec un système d'imagerie vidéo (Point Grey) puis mesurés. Le temps passé dans

les bras fermés a été par la suite comparé au temps passé dans les bras ouverts comme mesure de peur ou d'anxiété. Le principe du test repose sur les tendances naturelles du rat à explorer des zones qui lui sont nouvelles. Théoriquement, un rat moins anxieux aura tendance à explorer plus fréquemment les bras ouverts du labyrinthe alors qu'un rat anxieux va passer plus de temps dans les bras fermés (**Figure 23**).

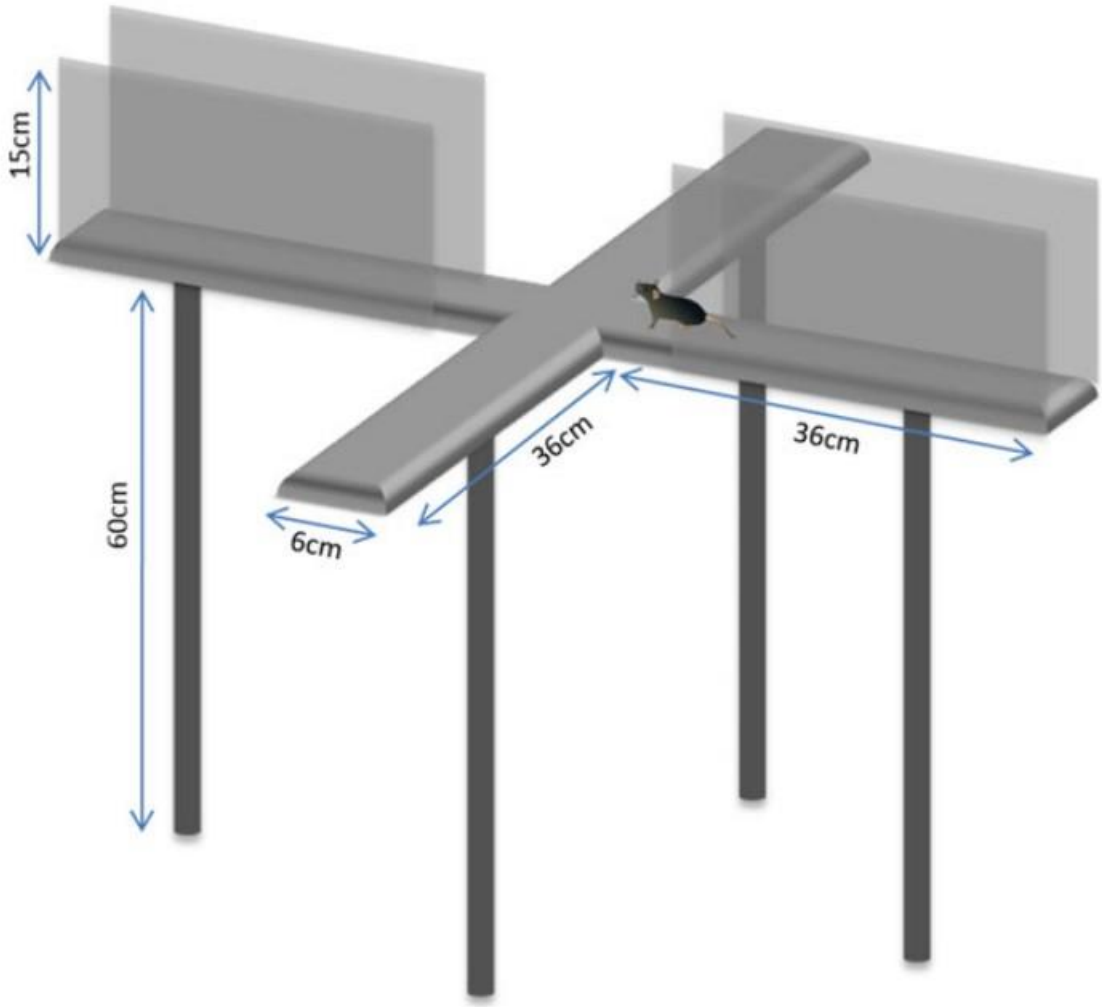


Figure 22 : Configuration et dimensions du labyrinthe « *Elevated plus maze (EPM)* » pour le test d'anxiété chez le rat. *Adapté de* (179).

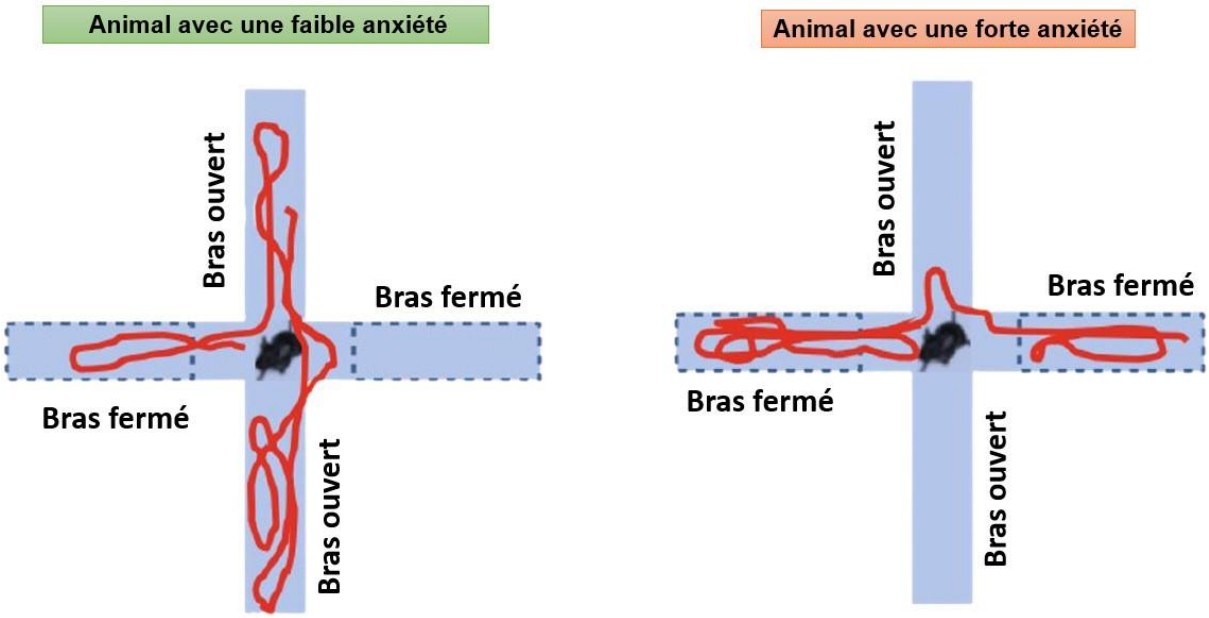


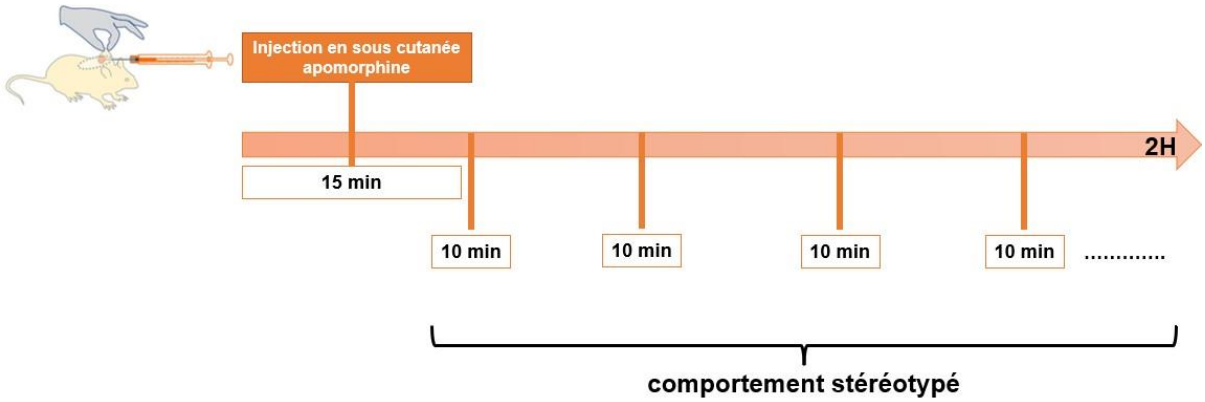
Figure 23 : Comportement typique des rongeurs avec une anxiété faible ou élevée. *Adapté de* (179).

Le déplacement de l'animal est représenté par une trace rouge. L'animal anxieux montre une préférence pour rester dans les espaces fermés alors que l'animal qui ne présente pas d'anxiété passe plus de temps dans les bras ouverts.

6. TEST DES STÉRÉOTYPIES INDUITES PAR L'APOMORPHINE

La stéréotypie induite par l'apomorphine est due à des stimulations des récepteurs de la dopamine et a été utilisée comme méthode pratique pour le dépistage *in vivo* des agonistes ou antagonistes de la dopamine et l'évaluation de l'activité dopaminergique (180) (181). Les animaux ont été placés dans des cages individuelles en plexiglas (20 x 18 x 18 cm) pendant 15 minutes après l'administration d'une solution de chlorhydrate d'apomorphine (0.0625-1.0 mg/kg) (182). Les signes des stéréotypies ont été observés et notés comme suit : 0 = comportement observé chez des animaux normaux après administration de solution saline ; 1 = comportement locomoteur continu, reniflement discontinu ; 2 = activité locomotrice

discontinue, reniflement continu ; 3 = léchage, rongement ou morsure discontinus accompagnés d'une activité locomotrice sporadique ; 4 = léchage, rongement ou morsure continus avec seulement une activité locomotrice occasionnelle (**Figure *24***) (182).



SCORES	
0	comportements normaux observés chez les animaux après administration de solution saline
1	comportement locomoteur continu, reniflement discontinu
2	activité locomotrice discontinue, reniflement continu
3	léchage, rongement ou morsure discontinus accompagnés d'une activité locomotrice sporadique
4	léchage, rongement ou morsure continus avec seulement une activité locomotrice occasionnelle

Figure 24 : Représentation schématique du test de stéréotypie induite par l'apomorphine.

7. TEST DE SOCIABILITÉ ET DE MÉMOIRE SOCIALE

Les tests de comportement social et de mémoire sociale ont été réalisés dans une boîte rectangulaire à trois chambres (deux chambres latérales et une chambre centrale). Le rat testé a été d'abord placé dans la chambre centrale et laissé libre d'exploration pendant 30 minutes pour une période d'acclimatation.

Après la période d'adaptation, un rat étranger du même sexe que l'animal testé a été placé à l'intérieur d'une cage dans l'une des chambres latérales, l'autre chambre étant restée

vide (**Figure 25**). L'animal testé a été autorisé à explorer pendant 10 minutes l'ensemble de la boite à trois chambres. L'entrée a été considérée lorsque le rat avait mis ses 4 pattes dans la chambre. Le score de sociabilité a été mesurée en fonction du temps passé dans la chambre avec l'animal étranger ou dans la chambre vide. Théoriquement, un animal n'ayant pas d'altération de sociabilité aura tendance à passer plus de temps dans la chambre avec l'animal étranger alors qu'un animal ayant une altération de la sociabilité aura une préférence pour la chambre vide (**Figure 26**).

La capacité de reconnaissance sociale a été mesurée par la suite. Un rat inconnu par l'animal testé a été introduit dans le dispositif et mis dans la chambre latérale auparavant vide. Ainsi, les deux chambres latérales étaient occupées soit par un rat étranger soit par un rat familier à l'animal testé. Le test de reconnaissance sociale a été mesuré en fonction du temps passé dans chaque chambre. En théorie, les rats ayant une mémoire sociale passent plus de temps avec l'animal inconnu que l'animal familier, montrant une préférence naturelle pour la nouveauté sociale (**Figure 26**).

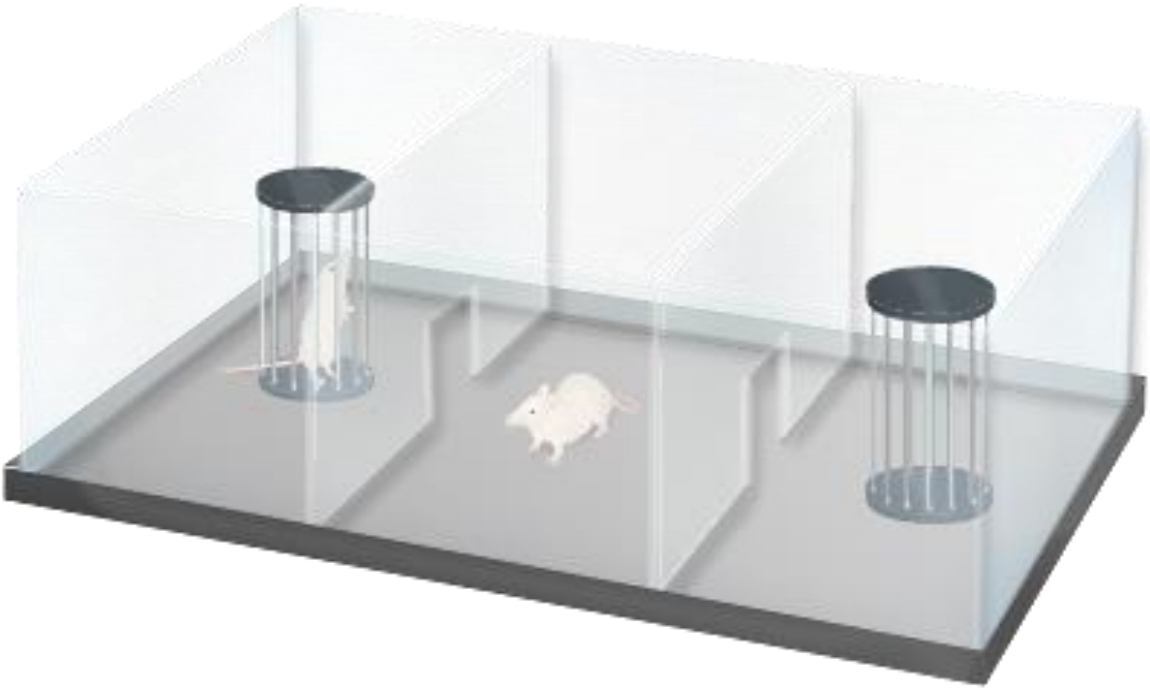


Figure 25 : Configuration de la cage à trois chambres pour le test de sociabilité chez le rat.

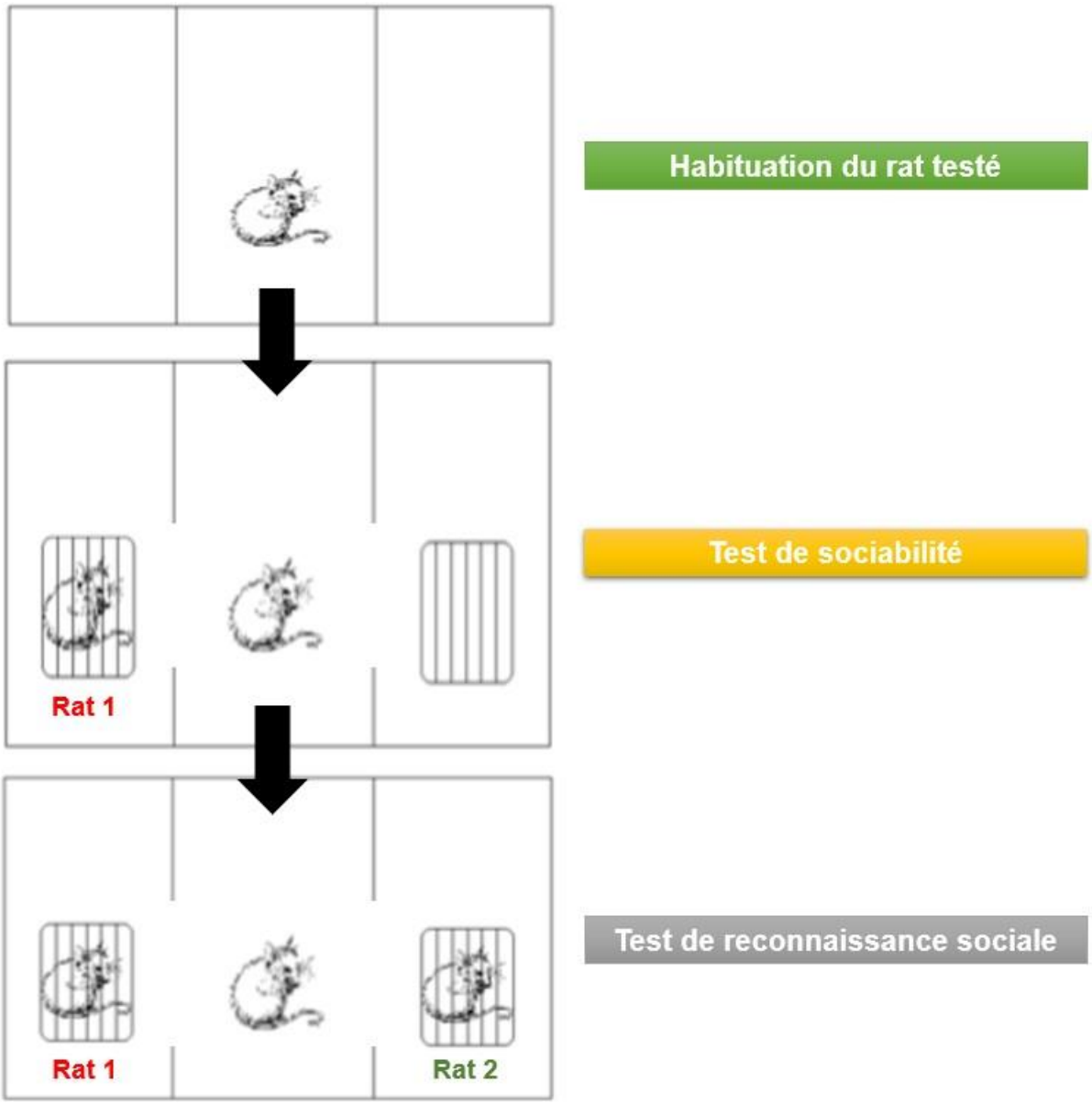


Figure 26 : Représentation schématique des tests de sociabilité et de reconnaissance sociale chez le rat.

8. ANALYSE QUANTITATIVE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

- **Préparation des échantillons**

L'extraction des lipides a été faite par la méthode « Bligh & Dyer » qui est une méthode de référence pour l'extraction globale des lipides dans les échantillons biologiques. Les lipides ont été extraits des échantillons à l'aide d'un solvant organique constitué d'un mélange méthanol/chloroforme (2 :1, v : v) dans lequel des standards internes (sphingolipides exogènes C17 :0) ont été ajoutés. Le solvant permet d'extraire les lipides en formant deux phases, les lipides migrant vers la phase organique.

- **Préparation des courbes d'étalonnages**

En parallèle, des solutions standards contenant plusieurs espèces de céramides, plusieurs espèces de sphingomyèlines et la sphingosine-1-phosphate ont été préparées par dilutions en séries à partir d'une solution mère concentrée. Ces solutions ont ensuite été extraites en suivant le même protocole que les échantillons à analyser. Ces échantillons standards serviront à générer les courbes d'étalonnage pour quantifier l'ensemble des espèces ciblées.

- **Séparation des lipides par chromatographie en phase liquide (UPLC)**

Les lipides ont été ensuite séparés par chromatographie en phase liquide qui est une technique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases : l'une stationnaire (colonne de phase inverse de type C18) et l'autre mobile (mélange de solvants). La chromatographie peut être analytique ou préparatoire et peut être couplée à un détecteur pour une analyse qualitative ou quantitative (dans notre étude, la spectrométrie de masse). Dans le cas de la chromatographie en phase liquide, la phase mobile est généralement constituée de deux solvants de polarités différentes et miscibles. On peut également ajouter des additifs afin d'améliorer la rétention des composés et leur ionisation. Les conditions chromatographiques utilisées lors de cette étude sont disponibles en annexe (**ANNEXE 2**).

- **Détection et quantification des lipides par spectrométrie de masse**

  - ***Définition***

La spectrométrie de masse est une méthode permettant de séparer des ions à l'état gazeux suivant leur rapport masse sur charge (*m/z*). Il est ainsi possible de déterminer la masse d'espèces atomiques ou moléculaires. Elle fournit des indications sur la nature, la structure et la composition de composés présents dans un échantillon. Les molécules sont analysées à l'état d'ions gazeux (source d'ions), filtrées en fonction du déplacement de leur rapport *m/z* au travers d'un champ électrique et/ou magnétique (analyseur en masse) et sous vide (pompes). Ensuite, un détecteur va transformer le courant ionique généré en courant électrique permettant de mesurer l'abondance de chaque ion (photomultiplicateur). Les résultats sont présentés sous la forme d'un spectre de masse (abondance en fonction des rapports *m/z*) qui est une empreinte caractéristique de l'échantillon d'intérêt (**Figure 27**).

  - ***Electronébulisation***

L'échantillon subit une électronébulisation (ou électrospray, ESI) qui entraine la dispersion du liquide (couplage à la chromatographie liquide) sous forme de gouttelettes chargées électriquement. L'électronébulisation est une source d'ionisation douce où le processus a lieu à pression atmosphérique (*Voir* **ANNEXE 3**). Il existe deux modes d'ionisation : le mode négatif (ESI-) et le mode positif (ESI+). Dans ce dernier, il est possible de former des ions multichargés de types $[M+nH]^{n+}$ où les charges sont apportées le plus souvent par des protons. Cette étape d'ionisation est nécessaire pour la détection par spectrométrie de masse. Elle permet de transformer le composé élué dans la phase liquide en ion gazeux (*voir illustration en* **ANNEXE 4**).

  - ***La spectrométrie de masse en tandem***

Enfin, les molécules sont identifiées par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La MS/MS consiste à combiner plusieurs analyseurs en masse. Un ion précurseur de rapport *m/z* est sélectionné dans le premier système. Cet ion est ensuite dirigé vers une cellule de collision où, sous l'influence d'un gaz inerte (Argon, Hélium), son énergie interne sera

augmentée par collision jusqu'à sa dissociation. Un second analyseur mesure les rapports *m/z* des fragments générés (**Figure 28**). Le mode MS/MS est souvent utilisé pour les systèmes utilisant une source d'ionisation douce ne générant que très peu d'ions fragments lors de l'ionisation (ESI). Le système utilisé lors de cette étude est un triple quadripôle (QqQ). L'analyse MS/MS peut être menée selon différents modes en fonction de l'information recherchée (183). Lors de cette étude, nous avons utilisé le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) où l'ion parent est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision. Le second analyseur est focalisé sur un ion produit. Ce mode présente une double sélectivité, au niveau de l'ion parent et de l'ion produit. En outre les deux analyseurs étant fixés à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification. Les paramètres utilisés lors de cette étude sont disponibles en Annexe (**ANNEXE 5**).

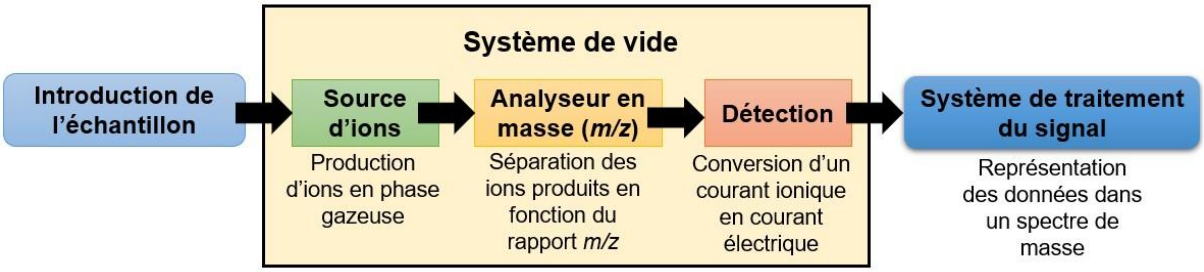


Figure 27 : Représentation schématique d'un système de spectrométrie de masse. (*Amran DAHER ABDI*).

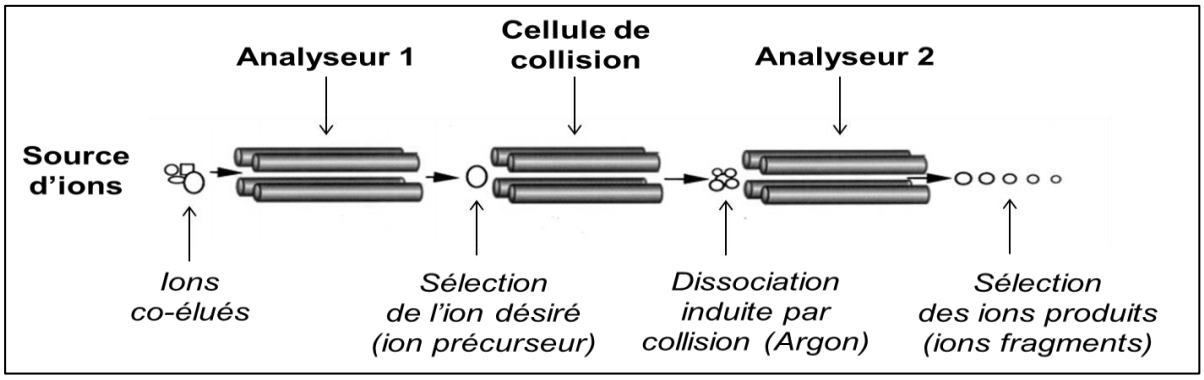


Figure 28 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem, cas du triple quadripôle. *Adaptée de* (184).

9. TEST DE TOLERANCE AU GLUCOSE

Les rats ont été mis à jeun pendant 6h tout en leur donnant accès à l'eau. Leur glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre sur une goutte de sang prélevée à partir de la queue par ponction avec une aiguille. La glycémie basale a été mesurée à l'aide d'un glucomètre, au temps zéro puis toutes les trente minutes (30, 60, 90 et 120 minutes) après une injection intrapéritonéale (IP) de solution de glucose à 30% (**Figure 29**).

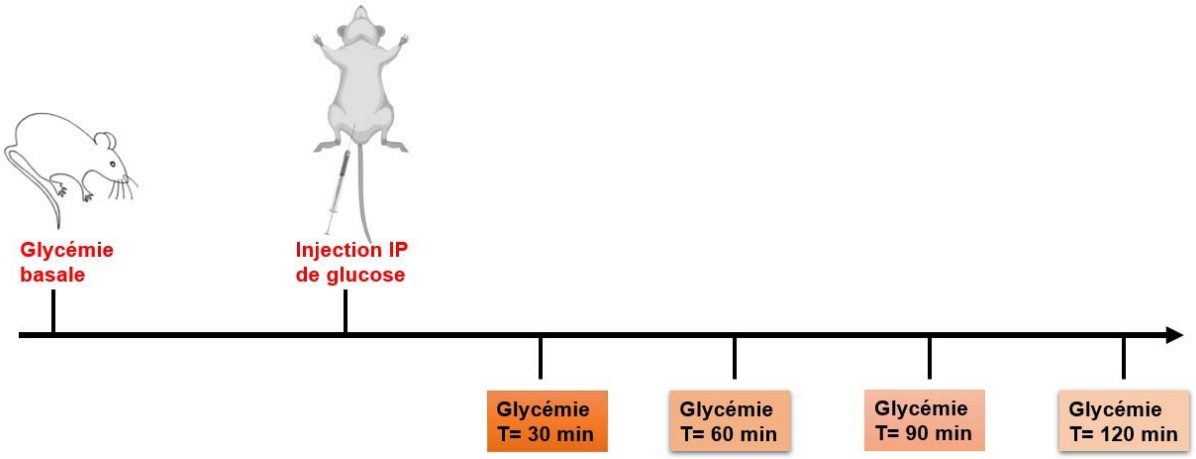


Figure 29 : Représentation schématique de l'expérience du test de tolérance au glucose.

10. DOSAGE D'INSULINE, DE LEPTINE ET DES LIPIDES DANS LE SERUM

Les concentrations sériques d'insuline et de leptine dans le sérum ont été déterminées par des dosages immuno-enzymatiques directs tandis que les concentrations de cholestérol et des triglycérides ont été évaluées à l'aide de kits diagnostiques enzymatiques.

11. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Les niveaux d'expression de gènes ont été estimés par la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel (RT-PCR) en utilisant la *β-actine* comme gène de référence et les niveaux d'expression chez les rats contrôles des mères traitées à la solution saline avec un régime témoin comme valeur de base selon la méthode 2-ΔΔCt (185).

Tableau 8 : Séquences d'amorces utilisées pour les analyses RT-PCR en temps réel.

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
ChREBP	GTACTGTTCCCTGCCTGCTCTC	CCCTCTGTGACTGCCCTTGTG
FAS	CGCCGTGGTGCTGGAGATTG	CTTGCCGAGGTTGGTGAGGAAG
SCD1	GGAGCCACAGGACTTACAAGG	CGCACAAGCAGCCAACCC
GPAM	TGGAGTGTGGCAAGAGGCGTTATC	TTCGGCAGCAGCAGCATCAGG
DGAT2	CCTCATCGCTGCCTACTCC	TGAGCCAGGTGACAGAGAAG
MCAD	GAGGCTAGAAGGTCCTGAGAAGTG	TCTGCTGCTCCGTCAACTGG
HADH	CTCCATGTCCTCCTCTTCCTCTGC	CAGCCCGCCGCCGATGAC
PPARϒ	GGAATTAGATGACAGTGACTTGGC	GGAGCACCTTGGCGAACAG
PKMI	CAGCACCTGATAGCTCG	ACATTTATAAGAGGCCTCCA
PDK4	GGTGGCGGTCTTCCTCTGAG	TGAATTGTCCATCACAGGCGTTG
β -actine	CTATCGGACATGAGCGGTTCC	GCACTGTGTTGGCATAGAGGT

12. WESTERN BLOT

- **Extraction des histones**

Les extraits de foie ont été broyés dans 1 mL de tampon d'homogénéisation (250 mM de sucrose, 50 mM de tampon Tris, pH 7.5, 25 mM de KCl, 0.5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle, 1% d'inhibiteur de protéase (Sigma), 0.9 mM de butyrate de sodium). Les homogénats de tissus ont ensuite été centrifugés à 7700 x *g* pendant 1 min à 4°C. Le culot (fraction nucléaire) a été remis en suspension dans 1 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,4 N et conservé sur glace pendant 30 min. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 14000 x *g* pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un tube frais et les protéines ont été précipitées avec l'addition de 250 µL d'acide trichloracétique (à 100% contenant 4 mg/mL d'acide désoxycholique) sur glace pendant 30 min. Les protéines précipitées ont été recueillies par centrifugation à 14 000 x *g* pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot protéique lavé avec 1 mL d'acétone acidifié (0,1% HCl) et centrifugé pendant 5 min à 14000 x *g* à 4°C. Un second lavage a été réalisé avec 1 mL d'acétone pendant 5 min à 14000 x *g* à 4°C. Les protéines purifiées résultantes ont été remises en suspension dans du Tris 10 mM (pH 8) puis conservées à –80 °C jusqu'à leur dosage et leur analyse par Western Blot.

- **Séparation des protéines par électrophorèse SDS PAGE**

Après dosage protéique, les échantillons ont été dilués à une concentration finale de 1µg de protéine/µL de tampon. Ensuite, 5 µg/µL d'histones ont été mélangés avec 5µL de tampon de charge (2X). Les échantillons ont été dénaturés et séparés sur un gel de polyacrylamide de 10% (*acrylamide 10%, Tris 1M, pH 8.8, SDS 10% (Biorad) ; tampon de migration : Tris 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1%, pH 8,3*). La migration a été effectuée à 100V sur 1h30. Le contrôle de la migration a été réalisé à l'aide de marqueurs de poids moléculaires pré-colorés (fabriquant Biorad).

- **Transfert des protéines sur membrane**

Le gel a été placé sur une membrane de nitrocellulose en formant un « sandwich » et le transfert des protéines a été effectué en sept minutes à l'aide du système Trans-Blot Turbo.

- **Immuno-détection des protéines**

Les membranes ont été saturées pendant une heure dans une solution de TBS-T (150mM de NaCl, 20 mM de Tris, pH 7,5, 0,05% Tween 20) contenant 3% de BSA (*bovine serum albumin*). Les modifications des histones choisies dans notre étude sont : H3K9me3, H3K27me3 liées à la répression de la transcription et H3K4me, H3K14me3 liées à l'activation de la transcription. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (**Tableau 9**) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été lavées avec la solution de blocage pendant 3 min (3 fois). Ensuite, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires. La présence des protéines est visualisée à l'aide du Li-COR Odyssey.

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés et leur dilution.

Anticorps	Dilution	Espèce	Fournisseur	Numéro du lot
H3K9me3	1/1000	Lapin	Cell Signaling	13969
H3K27me3		Lapin		9733
H3K4me3		Lapin		9751
H3K14me3		Lapin		7627
Histone H3		Souris		14269

13. RESONNANCE PARAMAGNETIQUE

Les variations de la fluidité membranaire sont suivies par Résonnance Paramagnétique Electronique (RPE). La méthode est basée sur l'incorporation d'un « spin label » dans les membranes à étudier. Il s'agit d'un acide gras greffé d'un radical nitroxyde, ce qui lui confère deux propriétés essentielles : premièrement, il est très lipophile et s'insère donc facilement dans les membranes ; deuxièmement, le radical nitroxyde le rend détectable en RPE. Le spectre RPE révèle ainsi l'état dynamique de la bicouche lipidique *in situ*. Le « spin label » utilisé, l'acide 12-doxylstéarique (12-DSA), permet l'examen de la zone hydrophobe de la membrane. La forme du spectre dépend de la mobilité du « spin label » en fonction de son environnement. Moins la membrane est fluide, plus le spectre se déforme.

Les échantillons de foie ont été lavés au PBS puis centrifugés à 1000 tr/min pendant 3min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les échantillons ont été repris dans 60 µL de PBS avant l'addition de 10 µL de spin label (50 µg/mL). Les échantillons ont été placés à 37°C pendant 15 minutes, puis centrifugés à 1000 tr/min pendant 3 min à 4°C et le surnageant a été éliminé. Ils ont ensuite été lavés au PBS par centrifugation, puis repris dans 60 µL de PBS pour la lecture en RPE à température ambiante au moyen d'un spectrophotomètre BRUKER Elexsys 500. Le réglage a été défini comme suit : puissance de 20 mW, fréquence de 9,86 GHz, amplitude de modulation de 1,77G, fréquence de modulation de 100 kHz.

La fluidité membranaire a été évaluée par le calcul du paramètre d'ordre S selon la formule suivante :

$$S = (43{,}7 - 3T_{\perp})/46{,}1 \times 1{,}723$$

$3T_{\perp}$ représente la distance entre deux raies. Le paramètre d'ordre S est inversement proportionnel à la fluidité (**Figure 30**).

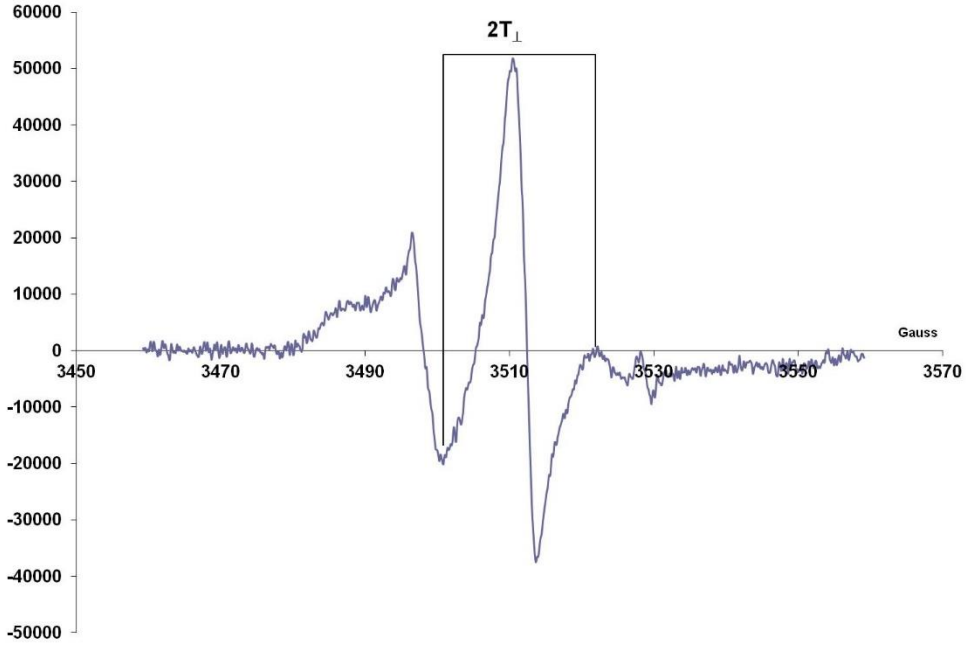


Figure 30 : Spectre obtenu par RPE du 12-DSA inséré dans les membranes des échantillons.

V. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie 1

“La supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation chez le rat protège la progéniture contre la stéatose hépatique induite par un régime alimentaire riche en calories.”

a) RÉSULTATS

1. Quelles sont les conséquences métaboliques d'une supplémentation maternelle en DHA chez les descendants mâles âgés de 3 mois après un régime postnatal hypercalorique ?

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LES CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES ET METABOLIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS : POIDS CORPOREL, MASSE GRAISSEUSE ET CONCENTRATIONS SERIQUES EN LEPTINE

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact d'une supplémentation maternelle en DHA au cours de la gestation et de la lactation sur le métabolisme de la progéniture après exposition à un régime hypercalorique. Pour cela, nous avons utilisé un régime riche en sucres et en graisses en libre choix *ad libitum* (*FcHFHS Diet*) afin d'imiter étroitement l'obésité induite chez les humains. Une étude réalisée par la Fleur et ses collègues a montré que ce régime entraine une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose (186).

Nous avons confirmé ces résultats en montrant que les animaux mâles soumis à un régime *FcHFHS* avaient pris plus de poids corporel (**Figure 31A**) et accumulé plus de masse graisseuse (**Figure 31B**) par rapport aux rats soumis à un régime standard, et cela indépendamment de la supplémentation maternelle. De façon similaire, les concentrations sériques en leptine (**Figure 31C**) étaient également augmentées chez les rats soumis à un régime *FcHFHS* en comparaison des rats soumis à un régime standard, quelle que soit la supplémentation maternelle. Ces premiers résultats ont montré que la supplémentation maternelle en DHA n'a pas eu d'effet protecteur sur la masse graisseuse, le poids corporel et les concentrations sériques en leptine chez la descendance mâle adulte.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LES CONCENTRATIONS DES LIPIDES SERIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Les rats mâles soumis au régime *FcHFHS* présentaient une hypertriglycéridémie (**Figure 31G**) liée au régime par rapport aux rats soumis à un régime standard quelle que soit la supplémentation maternelle. Néanmoins, nous n'avons pas observé de différence significative pour les concentrations sériques en cholestérol (**Figure 31H**) entre les rats soumis à un régime *FcHFHS* et ceux soumis à un régime standard, indépendamment de la supplémentation maternelle. Ces résultats montrent que la supplémentation maternelle en DHA ne semble pas avoir d'effet protecteur contre l'hypertriglycéridémie induite par le régime chez la descendance.

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR L'HOMEOSTASIE DU GLUCOSE DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Bien qu'il n'y ait aucune protection de la supplémentation maternelle en DHA contre la prise de poids, l'augmentation de la masse graisseuse et l'accumulation des lipides circulants, nous avons voulu déterminer l'impact de la supplémentation maternelle en DHA sur l'homéostasie glucidique. Pour cela nous avons réalisé un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale.

Comme attendu, les rats soumis à un régime *FcHFHS*, nés de mères supplémentées en solution saline pendant la gestation et la lactation, présentaient une forte intolérance au glucose (**Figure 31D**). En revanche, les animaux soumis au régime *FcHFHS* et nés de mères supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation, présentaient une tolérance au glucose proche de celle des animaux contrôles. Le régime hypercalorique n'a donc pas entrainé d'intolérance au glucose chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA. Ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA protège la progéniture contre l'altération

du métabolisme du glucose que pourrait entrainer un état d'obésité. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations sériques en glucose (**Figure 31E**) entre les rats soumis à un régime *FcHFHS* et ceux soumis à un régime standard indépendamment de la supplémentation maternelle. En revanche, les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline avaient des concentrations d'insuline fortement élevées en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA (**Figure 31F**). La forte sécrétion de l'insuline chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline rejoint les résultats de la quantification du glucose sérique montrant le rôle fonctionnel de l'insuline qui a pu internaliser le glucose dans les tissus cibles (foie, muscles et tissu adipeux), raison pour laquelle il n'y avait pas de fortes concentrations en glucose dans la circulation. Ces résultats suggèrent que les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ne sont pas insulino-résistants malgré le fait qu'ils soient intolérants au glucose. En revanche, les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA ne présentaient pas d'hyperinsulinémie et n'avaient pas de concentrations élevées en glucose circulant. La supplémentation maternelle en DHA protège donc probablement la descendance de l'accumulation de glucose sérique indépendamment de la sécrétion d'insuline. En outre, la supplémentation maternelle en DHA prévient contre l'intolérance au glucose chez les descendants mâles obèses.

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LA COMPOSITION DES LIPIDES HEPATIQUES CHEZ LES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Il a été rapporté dans la littérature que le DHA permet d'induire des effets bénéfiques contre l'accumulation des lipides hépatiques. Il a été montré qu'une supplémentation en DHA en association avec un régime hypercalorique était capable de prévenir la progression d'une stéatose hépatique, notamment en réduisant les lipides hépatiques chez les rats (187). C'est dans ce sens, et dans le but de poursuivre nos observations sur les effets bénéfiques d'une supplémentation maternelle en DHA, que nous avons quantifié les lipides hépatiques de la descendance mâle adulte.

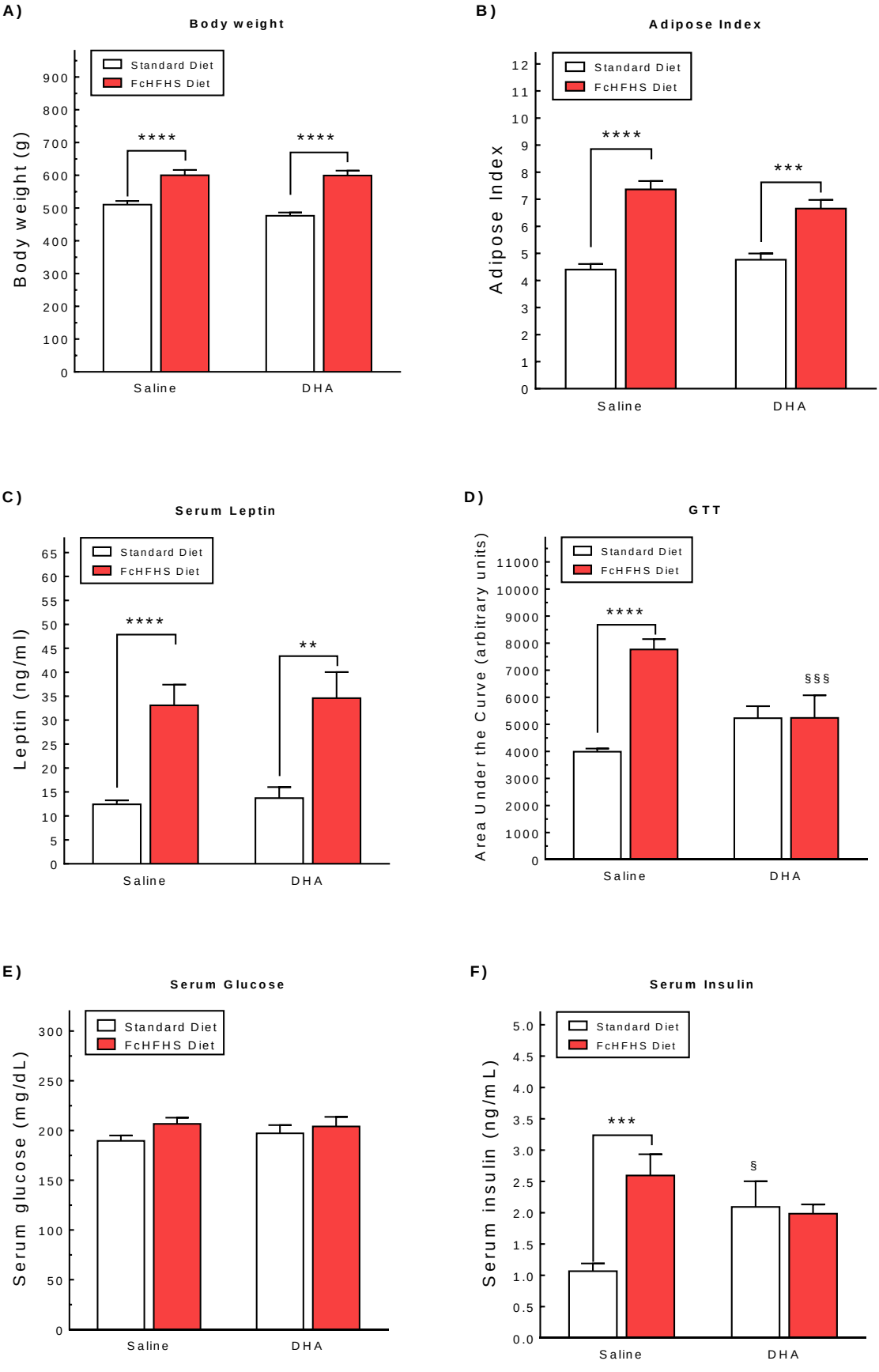
Nous avons observé une forte accumulation des triglycérides hépatiques (**Figure 32A**) chez les rats soumis à un régime *FcHFHS* et nés de mères supplémentées en solution saline en comparaison des rats du groupe saline-standard. En revanche, les rats soumis au régime *FcHFHS* et nés de mères supplémentées en DHA avaient des concentrations en triglycérides hépatiques similaires à celles des rats soumis à un régime standard et nés de mères supplémentées en DHA. Nous pouvons dès lors constater que le régime *FcHFHS* induit une augmentation des triglycérides hépatiques.

En outre, nous avons observé une augmentation des concentrations en cholestérol hépatique (**Figure 32B**) chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline en comparaison des rats contrôles du groupe saline-standard. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les animaux obèses et les animaux contrôles nés de mères supplémentées en DHA. Par ailleurs, la supplémentation maternelle en DHA semble protéger partiellement l'augmentation des concentrations en cholestérol hépatique.

Ces résultats montrent que la supplémentation maternelle en DHA prévient la progression de la stéatose hépatique chez la descendance des rats obèses, notamment *via* l'atténuation de l'accumulation de lipides hépatiques.

En résumé :

Les principales conclusions de ces résultats métaboliques sont que la supplémentation maternelle en DHA n'avait pas d'effet protecteur contre l'augmentation accrue du poids corporel, de la masse graisseuse et des concentrations sériques en leptine et en triglycérides induite par l'obésité. Néanmoins, la supplémentation maternelle en DHA protège les descendants mâles de l'intolérance au glucose mais aussi de l'accumulation du glucose circulant, indépendamment de la sécrétion d'insuline. Elle améliore donc l'homéostasie glucidique de la descendance. De plus, la supplémentation maternelle en DHA prévient de l'accumulation des lipides hépatiques des descendants mâles obèses.


A)
Body weight
Standard Diet
FcHFHS Diet
Body weight (g)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
****
****
Saline
DHA
B)
Adipose Index
Standard Diet
FcHFHS Diet
Adipose Index
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
****
***
Saline
DHA
C)
Serum Leptin
Standard Diet
FcHFHS Diet
Leptin (ng/ml)
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
****
**
Saline
DHA
D)
GTT
Standard Diet
FcHFHS Diet
Area Under the Curve (arbitrary units)
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
****
§§§
Saline
DHA
E)
Serum Glucose
Standard Diet
FcHFHS Diet
Serum glucose (mg/dL)
300
250
200
150
100
50
0
Saline
DHA
F)
Serum Insulin
Standard Diet
FcHFHS Diet
Serum insulin (ng/mL)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
§
Saline
DHA

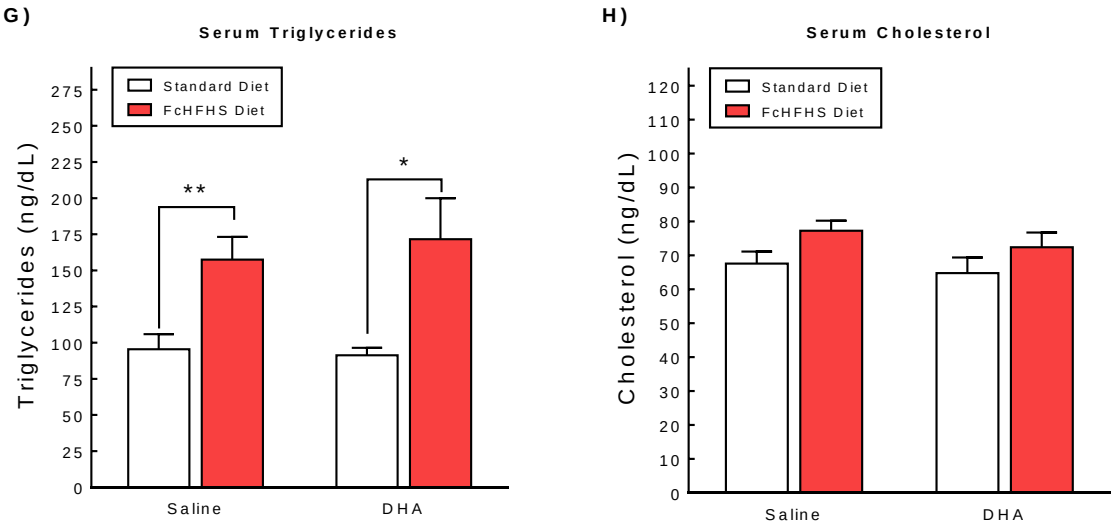


Figure 31 : Données anthropométriques et métaboliques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). À 3 mois, un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (**E**) a été réalisé et le poids corporelle (**A**) mésuré. Après sacrifice des animaux à 3 mois, la masse graisseuse (**B**) a été mésurée et les concentrations sériques de leptine (**C**), de glucose (**D**), de l'insuline (**F**), de triglycérides (**G**) et de cholestérol (**H**) ont été déterminées. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ou DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** p < 0,05, ****** p <0,01, *******p <0,001, ******** p < 0,0001. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ou DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § p < 0,05, §§ p <0,01, §§§ p <0,001 §§§§ p < 0,0001.

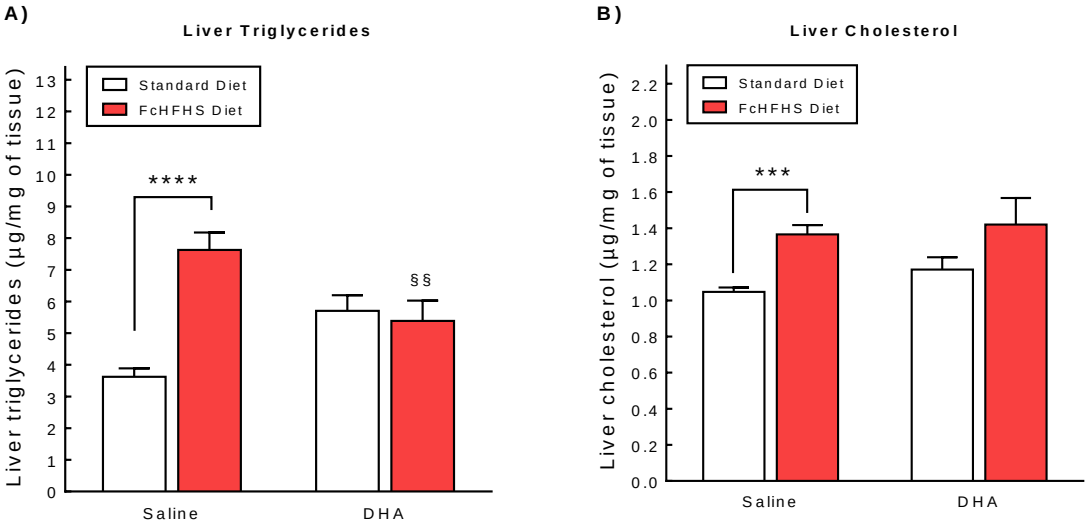


Figure 32 : Concentrations des lipides hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les concentrations sériques de triglycérides (**A**) et de cholestérol (**B**) ont été déterminées. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ou DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** p < 0,05, ****** p <0,01, *******p <0,001, ******** p < 0,0001. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ou DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § p < 0,05, §§ p <0,01, §§§ p <0,001 §§§§ p < 0,0001.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR L'EXPRESSION DES GENES GLYCOLYTIQUES, LIPOGENIQUES, EN CHARGE DE LA SYNTHESE DES TRIGLYCERIDES ET DE LA β-OXYDATION DANS LE FOIE DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA contre l'amélioration du métabolisme de glucose et l'accumulation des lipides hépatiques, il serait intéressant de voir si l'action du DHA perdure chez la descendance et s'il est capable de moduler sur le long terme l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides. Nous avons donc réalisé des expériences de RT-qPCR afin d'évaluer l'expression de gènes clés dans ces différentes voies métaboliques (**Figure 33**).

Il a été montré dans la littérature que la supplémentation aigüe en DHA induit des effets protecteurs contre l'accumulation des lipides au niveau du foie, en régulant à la baisse la lipogenèse (188). De façon intéressante, nous pouvons constater que l'expression de *ChREBP* (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*), régulateur transcriptionnel majeur qui induit des enzymes lipogéniques clés pour favoriser la lipogenèse *de novo* hépatique (189), était réduite dans les foies des animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison aux animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. De façon similaire, l'expression de *Fas* (*Fatty acid synthase*) et de *SCD-1* (*Stearoyl-CoA désaturase-1*), également impliqués dans la lipogenèse *de novo*, est diminuée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Le même résultat a été observé pour la synthèse des triglycérides. En effet, l'expression des gènes initiant la synthèse des triglycérides hépatiques tels que *GPAM* (*Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial*) et *DGAT2* (*Diacylglycerol O-acyltransferase 2*), était réduite chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats ont montré que la diminution des triglycérides hépatiques s'explique par une faible lipogenèse *de novo* et une synthèse des triglycérides réduite. Nous avons donc pu mettre en évidence que la supplémentation maternelle en DHA affecte positivement sur le long terme l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et la synthèse des triglycérides hépatiques de la descendance mâle adulte.

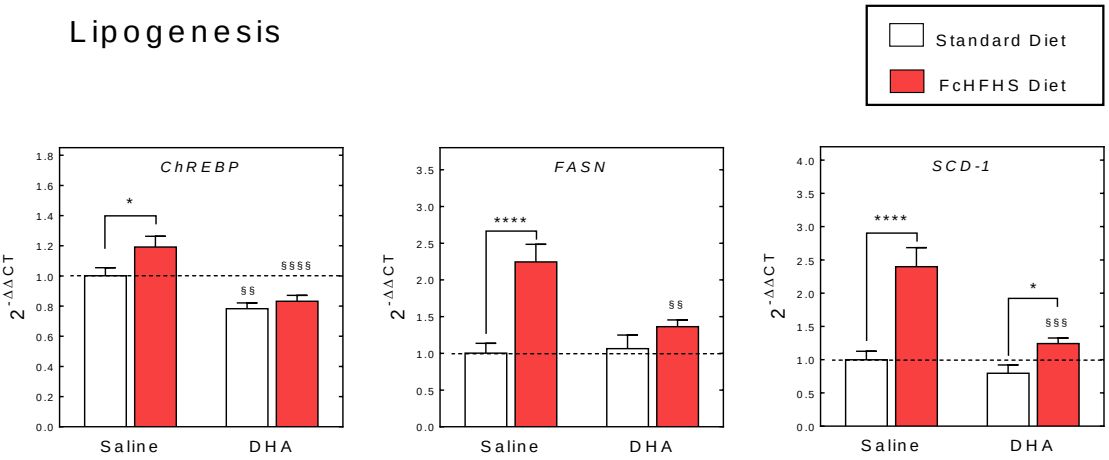
Par ailleurs, la diminution des triglycérides hépatiques pourrait s'expliquer par l'induction de la β-oxydation car le DHA est en mesure d'induire cette voie métabolique. Cependant, nos résultats ont montré une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la β-oxydation tels que *MCAD* (*Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*) et *HAD* (*Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase*) chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Bien que nous ayons observé une diminution de l'accumulation des triglycérides hépatiques chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA, ce résultat ne peut pas s'expliquer par une forte oxydation des acides gras.

Nos résultats ont également montré une forte expression de *PKM 1* (*Pyruvate Kinase M1*) chez les animaux du groupe saline-fcHFHS en comparaison des animaux contrôles saline. De même, l'expression de *PKM 1* était augmentée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux soumis au régime standard et nés de mères supplémentées en DHA. En revanche, l'expression de *PKM 1* chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA était significativement inférieure à celle de leurs homologues nés de mères supplémentées en solution saline. Nos résultats ont également montré une faible expression de *PDK4* (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4*) chez les animaux DHA-fcHFHS en comparaison des animaux du groupe saline-fcHFHS. Il n'y avait cependant aucune différence significative de l'expression de *PDK4* entre les animaux saline-fcHFHS et les animaux contrôles saline. De plus, *ChREBP* est reconnu comme étant un facteur de transcription activé par une glycémie élevée indépendante de l'insuline et joue également un rôle clé dans la glycolyse (190). Ainsi, comme décrit précédemment, nous avons observé une faible expression de *ChREBP* chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats montrent que l'entrée du glucose dans le foie est empêchée et par conséquent les voies métaboliques connectées sont inhibées notamment la lipogenèse *de novo*, la synthèse des triglycérides et la β-oxydation. Ces observations expliquent les résultats de l'inhibition des gènes impliqués dans ces voies, observée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Il est dès lors possible de supposer que l'entrée du glucose dans le foie est bloquée par l'action « programmateur » du DHA.

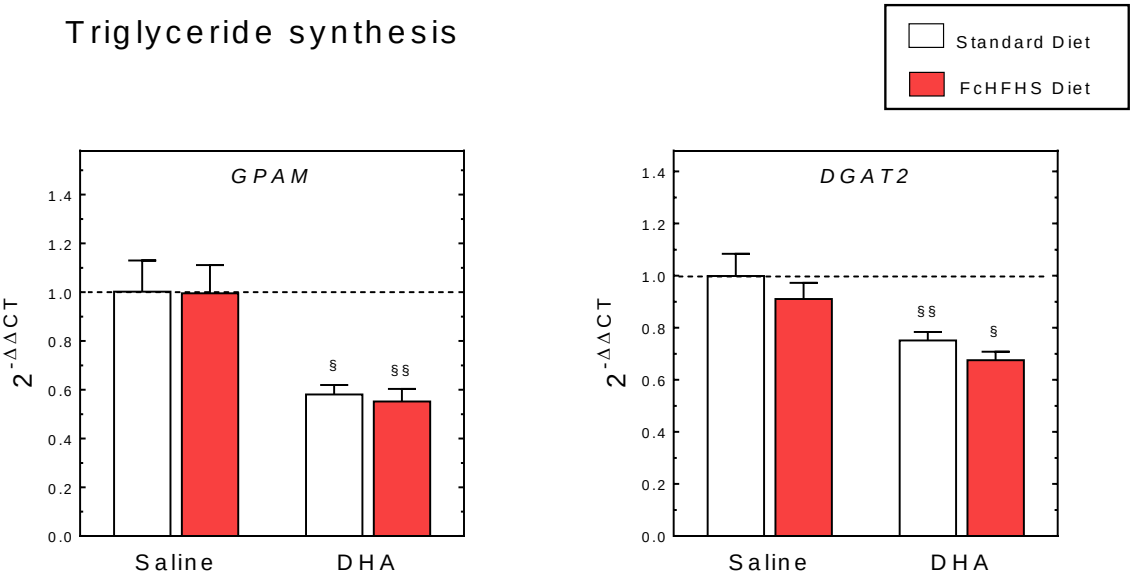
En résumé :

Les principales conclusions de ces résultats géniques sont que la supplémentation maternelle en DHA prévient la progression de la stéatose hépatique chez les descendants mâles obèses en empêchant l'intolérance en glucose et l'accumulation des lipides hépatiques par l'inhibition des gènes impliqués dans les voies métaboliques de la glycolyse, de la lipogenèse, de la synthèse des triglycérides et de l'oxydation des acides gras.

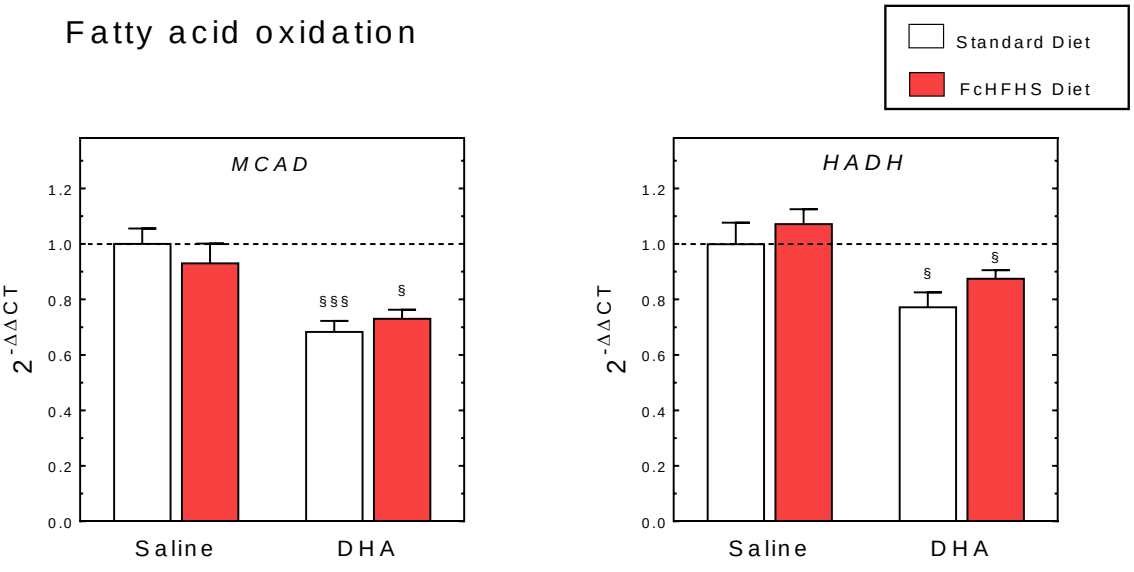
Lipogenesis



Triglyceride synthesis



Fatty acid oxidation



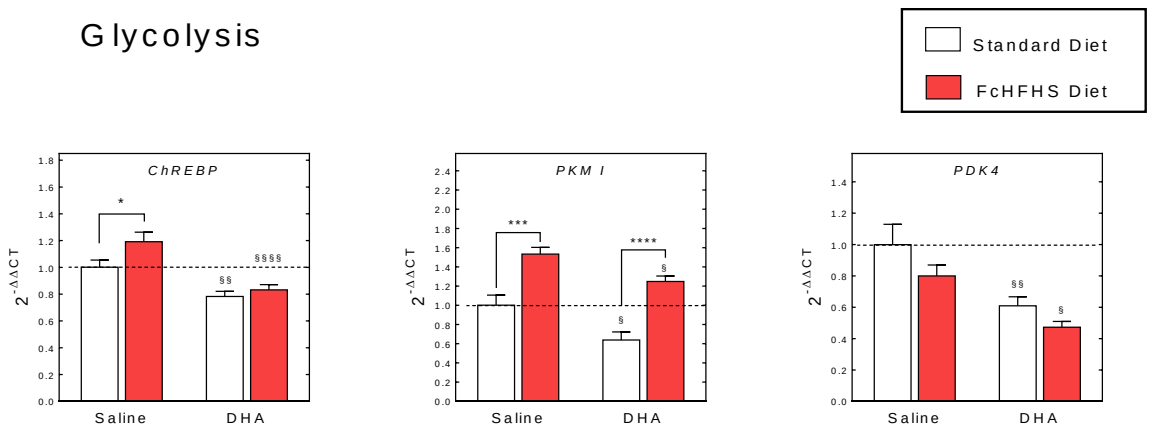


Figure 33 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les voies métaboliques hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à huit petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les foies des animaux ont été récupérés et les ARNm des protéines intervenant dans les différentes voies métaboliques ont été quantifiés par RT-Qpcr. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ou DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, *******$p < 0,001$, ******** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ou DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ §§§§ $p < 0,0001$.

2. Les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA observés chez les descendants mâles âgés de 3 mois perdurent-ils chez les animaux âgés de 6 mois et indépendamment du sexe ?

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LES CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES ET METABOLIQUES DES MALES ET FEMELLES AGES DE 6 MOIS : POIDS CORPOREL, MASSE GRAISSEUSE, CONCENTRATIONS SERIQUES EN LEPTINE ET LES LIPIDES SERIQUES

Nous avons évalué l'impact d'une supplémentation maternelle en DHA au cours de la gestation et de la lactation sur le métabolisme de la progéniture mâle et femelle âgée de 6 mois après exposition à un régime hypercalorique.

Nous avons observé que les animaux mâles et femelles soumis à un régime *FcHFHS* avaient un poids corporel, une masse graisseuse et des concentrations sériques en leptine et en triglycérides élevés par rapport aux rats du même sexe soumis à un régime standard, et cela indépendamment de la supplémentation maternelle (**Tableau 10**). Comme montré précédemment chez les animaux mâles âgés de 3 mois, ces résultats ont montré que la supplémentation maternelle en DHA ne protège pas la descendance mâle et femelle contre l'accumulation de la masse graisseuse, du poids corporel et des concentrations sériques en leptine et en triglycérides en réponse à un régime hypercalorique.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence significative pour les concentrations sériques en cholestérol chez les animaux mâles et femelles de 6 mois quel que soit le régime postnatal et la supplémentation maternelle (**Tableau 10**).

Nos résultats métaboliques sont similaires à ceux obtenus chez les animaux mâles âgés de 3 mois. Ces données ont montré que les effets de la supplémentation maternelle en DHA ne sont pas influencés par l'âge et le sexe des animaux.

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR L'HOMEOSTASIE DU GLUCOSE CHEZ LES DESCENDANTS MALES ET FEMELLES AGES DE 6 MOIS

Nous avons voulu aussi déterminer l'impact de la supplémentation maternelle en DHA sur l'homéostasie glucidique chez les animaux mâles et femelles âgés de six mois. Pour ce faire nous avons réalisé un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale.

Nous avons observé que les animaux mâles et femelles soumis à un régime *FcHFHS*, nés de mères supplémentées en solution saline pendant la gestation et la lactation, présentaient une forte intolérance au glucose (**Figure 34A** et **Figure 34B**). De même, les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA étaient intolérants au glucose suggérant que la supplémentation maternelle en DHA n'a pas d'effet protecteur chez les mâles contre l'intolérance au glucose (**Figure 34A**).

En revanche, les animaux femelles soumis au régime *FcHFHS* et nés de mères supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation, présentaient une tolérance au glucose proche de celle des femelles contrôles (**Figure 34B**), montrant un effet de sexe. Ces résultats ont démontré que le régime hypercalorique n'a donc pas entrainé une intolérance au glucose chez les femelles nées de mères supplémentées en DHA. Cela suggère que l'effet protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre l'altération du métabolisme du glucose que pourrait entrainer un état d'obésité évolue avec l'âge mais de façon dépendante du sexe de la progéniture.

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations sériques en glucose dans tous les groupes indépendamment du sexe de la descendance et de la supplémentation maternelle (**Tableau 10**).

En outre, les mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline avaient des concentrations d'insuline fortement élevées en comparaison des mâles contrôles (**Tableau 10**). La forte sécrétion de l'insuline chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline rejoint les résultats de la quantification du glucose sérique montrant le rôle fonctionnel de l'insuline qui a pu internaliser le glucose dans les tissus cibles (foie, muscles et tissu adipeux), raison pour laquelle il n'y avait pas d'accumulation de glucose dans la circulation.

Ces résultats suggèrent que les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ne sont pas insulino-résistants malgré le fait qu'ils soient intolérants au glucose.

De façon similaire, les rats mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA présentaient une forte sécrétion d'insuline qui pourrait s'expliquer par une insuline fonctionnelle qui avait pu internaliser le glucose dans les tissus cibles d'où les concentrations en glucose dans la circulation qui étaient inchangées (**Tableau 10**). Ces résultats ont montré que les rats mâles nés de mères supplémentées en DHA ne sont pas insulino-résistants bien qu'ils soient intolérants au glucose. Ces données ont démontré que la supplémentation maternelle en DHA n'a pas d'effet protecteur contre l'altération de l'homéostasie glucidique chez les descendants mâles âgés de 6 mois.

En revanche, les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA ne présentaient pas d'hyperinsulinémie et n'avaient pas de concentrations élevées en glucose circulant (**Tableau 10**). La supplémentation maternelle en DHA protège donc probablement la descendance femelle de l'accumulation de glucose sérique indépendamment de la sécrétion d'insuline.

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LA COMPOSITION DES LIPIDES HEPATIQUES CHEZ LES MALES ET FEMELLES AGES DE 6 MOIS

Comme nous avons observé une protection contre la progression de la stéatose hépatique chez les rats mâles âgés de trois mois, nous avons cherché à savoir si les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA pouvaient perdurer chez des animaux âgés de six mois et si ces effets étaient associés au sexe. Pour cela nous avons quantifié les lipides hépatiques chez les animaux mâles et femelles âgés de six mois.

Nous avons observé que les concentrations en triglycérides hépatiques étaient augmentées chez les animaux obèses mâles et femelles nés de mères supplémentées en solution saline, en réponse au régime hypercalorique. En revanche, les concentrations en triglycérides étaient significativement réduites dans les foies des animaux obèses nés de mères

supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline, indépendamment du sexe (**Figure 35A** et **Figure 35B**).

Le même résultat a été observé pour les concentrations en cholestérol hépatique. Les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline avaient des concentrations en cholestérol hépatique élevées en réponse au régime hypercalorique chez les mâles mais pas chez les femelles. En revanche, les concentrations en cholestérol étaient réduites dans les foies des animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline, indépendamment du sexe (**Figure 35C** et **Figure 35D**).

Ces résultats ont montré que l'effet protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre la progression de la stéatose hépatique induite par un régime hypercalorique perdure chez la descendance et indépendamment du sexe. Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'effet « programmateur » de la supplémentation en DHA pendant le développement peut contribuer à la capacité future de la progéniture à faire face à des charges lipidiques élevées notamment au niveau hépatique, dans la vie adulte à court terme (3 mois) comme à long terme (6 mois).

En résumé :

Ces résultats métaboliques ont montré que de façon similaire aux données métaboliques des animaux mâles âgés de 3 mois, la supplémentation maternelle en DHA n'avait pas d'effet protecteur contre l'augmentation accrue du poids corporel, de la masse graisseuse et des concentrations sériques en leptine et en triglycérides, induite par l'obésité chez les animaux mâles et femelles âgés de 6 mois. Par ailleurs, l'effet protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre l'intolérance en glucose évolue avec l'âge de la descendance et serait lié au sexe. En revanche, les effets anti-stéatosiques de la supplémentation maternelle en DHA perdurent de façon indépendante du sexe et de l'âge des animaux puisqu'elle prévient contre l'accumulation des lipides hépatiques chez la descendance mâle et femelle âgée de six mois.

Tableau 10 : Caractéristiques anthropométriques et métaboliques de rats mâles et femelles âgés de 6 mois.

	Mâles				Femelles			
	Saline		DHA		Saline		DHA	
	Standard	FcHFHS Diet	Standard	FcHFHS Diet	Standard	FcHFHS Diet	Standard	FcHFHS Diet
Body weight (g)	620 ±	769 ± 19.27 ***	619 ± 13.73	766 ± 20.16 ***	340 ± 6.35	453 ± 10.66 ****	352 ± 6.62	426 ± 16.57 ****
Adipose Index	6 ± 0.43	9 ± 0.37 ****	6 ± 0.27	10 ± 0.56 ***	6 ± 0.37	10 ± 0.39 ****	7 ± 0.40	9 ± 0.79 ***
Leptin (ng/mL)	13 ± 2.02	26 ± 1.90 **	15 ± 1.37	30 ± 3.55 ***	7 ± 0.95	22 ± 3.05 ***	6 ± 1.05	16 ± 3.10 *
Triglycerides (mg/dL)	101 ±	151 ± 20.08 *	65 ± 7.49	119 ± 18.16 *	136 ± 15.72	250 ± 84.09 *	140 ± 20.98	285 ± 36.98 *
Cholesterol (mg/dL)	73 ± 5.54	74 ± 2.90	79 ± 6.11	72 ± 2.85	63 ± 4.28	85 ± 5.23	84 ± 4.09	96 ± 3.83
Glucose (mg/dL)	163 ±	177 ± 22.61	175 ± 27.70	209 ± 14.87	174 ± 4.61	182 ± 10.06	183 ± 11.54	182 ± 13.41
Insulin (ng/mL)	1.42 ± 0.17	2.99 ± 0.67 *	1.26 ± 0.22	4.08 ± 0.92 *	0.93 ± 0.18	3.40 ± 0.76 **	1.45 ± 0.25	2.50 ± 0.57

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.001 par rapport aux animaux témoins du même sexe. *FcHFHS : Free-choice High-Fat High-sugar* (régime riche en sucres et en graisses en libre choix)

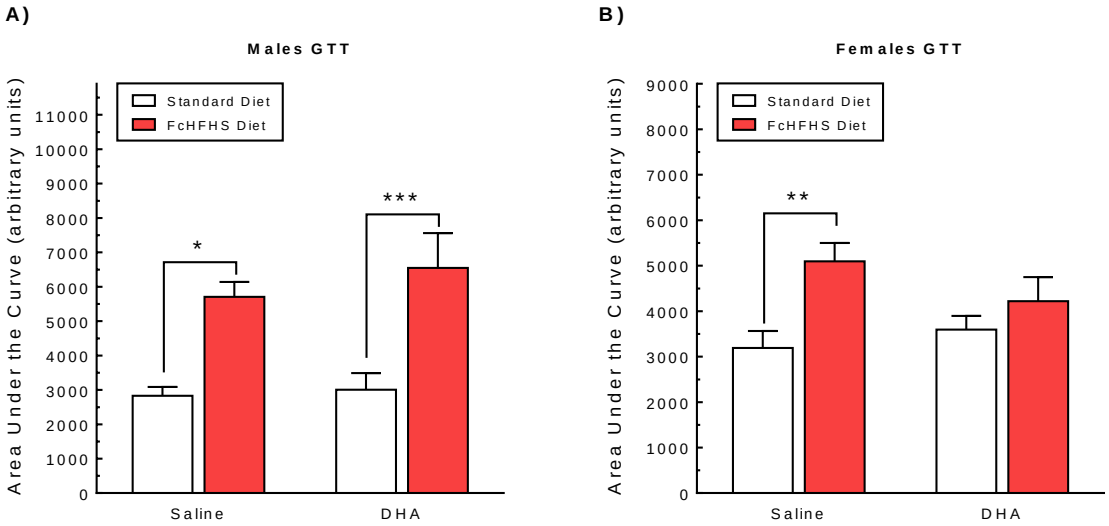


Figure 34 : Test de tolérance au glucose chez les animaux mâles et femelles âgés de 6 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Saline standard diet (barres blanches); mâles Saline fc-HFHS diet (barres rouges); mâles DHA-Standard diet (barres blanches); mâles DHA fc-HFHS diet (barres rouges); femelles Saline standard diet (barres blanches) ; femelles Saline fc-HFHS diet (barres rouges); femelles DHA-Standard diet (barres blanches); femelles DHA fc-HFHS diet (barres rouges). A 6 mois, un test de tolérance en glucose par voie intrapéritonéale a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ou DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, *******$p < 0,001$.

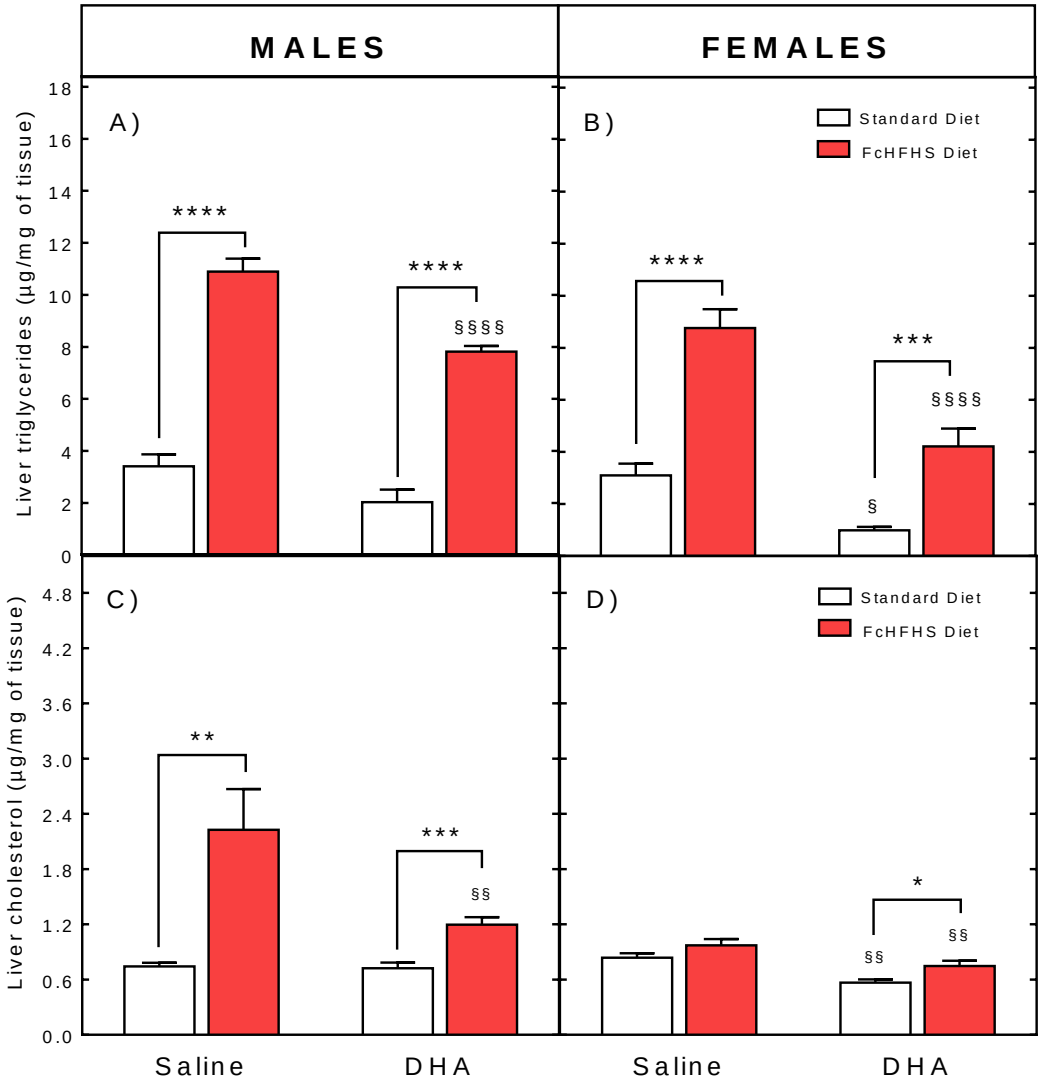


Figure 35 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les lipides hépatiques de la descendance mâle et femelle âgée de 6 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Saline standard diet (barres blanches); mâles Saline fc-HFHS diet (barres rouges); mâles DHA-Standard diet (barres blanches); mâles DHA fc-HFHS diet (barres rouges); femelles Saline standard diet (barres blanches) ; femelles Saline fc-HFHS diet (barres rouges); femelles

DHA-Standard diet (barres blanches); femelles DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 6 mois, les concentrations sériques de triglycéride (**A et B**) et de cholestérol (**C et D**) ont été déterminées. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ou DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, ******* $p < 0,001$, ******** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ou DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). $^{§}p < 0,05$, $^{§§}p < 0,01$, $^{§§§}p < 0,001$ $^{§§§§}p < 0,0001$.

b) DISCUSSION

L'obésité est une pathologie dont la prévalence ne cesse d'accroitre à travers le monde. De nombreux facteurs contribuent au développement de l'obésité mais l'environnement nutritionnel intra-utérin et au début de la petite enfance, joue un rôle important dans la contribution au risque de développement de cette pathologie. Les nombreuses complications liées à l'obésité font de cette pathologie un véritable problème de santé publique. Une des principales complications de l'obésité est la stéatose hépatique qui est associée à une accumulation accrue de lipides dans le foie. L'environnement nutritionnel pendant la période de développement peut jouer un rôle dans la suppression du risque d'accumulation de graisses hépatiques chez l'adulte. À cet égard, les acides gras polyinsaturés oméga-3 interviennent dans le développement optimal du fœtus et du nouveau-né. Alors que la plupart des études à ce jour se sont concentrées sur leur rôle dans le développement neurologique, un intérêt croissant pour leurs potentiels effets métaboliques a émergé plus récemment.

Tandis que la majorité des études ont étudié l'effet d'une supplémentation aigüe en acides gras polyinsaturés oméga-3, le but de cette étude était de déterminer l'effet préventif et thérapeutique de la supplémentation maternelle en DHA tout au long de la gestation et la lactation sur le développement d'une stéatose hépatique dans un environnement obésogène chez les descendants mâles âgés de 3 mois. Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer l'évolution des effets bénéfiques de cette supplémentation maternelle en DHA avec l'âge et le sexe chez la descendance obèse.

Dans notre étude, les premiers résultats anthropométriques ont montré que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation n'a pas pu limiter l'accumulation de masse grasse et la prise de poids de la progéniture après exposition à un régime hypercalorique. Ces résultats contrastent avec ceux des études expérimentales récentes qui ont rapporté que la supplémentation en AGPI n-3 a des effets protecteurs contre la prise de poids et la masse grasse corporelle dans des conditions alimentaires hyper-lipidiques (191) (192). Cependant, certains résultats divergents ont été rapportés montrant des effets liés à des différences dans les doses utilisées en principe actif (193) (194). Par ailleurs, nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans des études animales où l'apport en AGPI-LC n-3 pendant la période périnatale n'avait pas d'influence sur la masse corporelle de la progéniture (195). Dans les études humaines, l'influence de la supplémentation en DHA dans le gain de poids a été

également documentée. Des études réalisées chez l'Homme rejoignent nos résultats, démontrant que la supplémentation maternelle en DHA n'apporte pas de changement significatif de la graisse corporelle des enfants (196) (197). Cependant, les résultats observés dans les études réalisées à ce jour sont mitigés et l'influence de l'exposition intra-utérine aux AGPI-LC n-3 sur l'adiposité et le poids corporel de la progéniture n'est toujours pas clairement élucidée. Ces différences peuvent en partie sous-tendre des divergences dans les méthodes de supplémentation en AGPI-LC n-3 et la variabilité des techniques de mesures corporelles. Néanmoins, les résultats anthropométriques de notre étude montrent que la supplémentation maternelle en DHA n'arrive pas à contrecarrer efficacement le gain de poids et l'augmentation de la masse graisseuse induite par un régime hypercalorique.

En accord avec ces dernières observations, la concentration sérique en leptine accroît avec l'augmentation du poids corporel et de la masse adipeuse. Comme attendu, nos résultats ont montré une augmentation des concentrations de leptine sérique en réponse au régime hypercalorique. Cependant, les rats obèses nés de mères supplémentées en DHA avaient des concentrations sériques de leptine similaires à celles des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces observations montrent que la supplémentation maternelle en DHA n'a pas eu d'effet bénéfique contre l'augmentation des concentrations sériques en leptine chez la descendance exposée à un environnement obésogène. Des études animales ont obtenu des résultats similaires montrant que le DHA n'a pas empêché l'augmentation de la concentration plasmatique en leptine chez les souris obèses (198). De même, plusieurs études réalisées chez l'Homme ont étudié l'effet des oméga-3 sur les concentrations en leptines circulantes. Des résultats similaires à ceux observés dans notre étude ont été obtenus par Kratz et ses collègues montrant que l'apport en AGPI n-3 n'avait pas d'effet bénéfique sur les taux plasmatiques de leptine chez les hommes et les femmes obèses (199). En revanche, d'autres études faites chez l'Homme ont montré que chez les sujets non obèses, la supplémentation en oméga-3 diminue les concentrations en leptine plasmatique (200). Ainsi, la supplémentation en oméga-3 pourrait diminuer modérément les niveaux de leptine circulante uniquement chez les adultes non obèses. Cela suggère que l'ampleur des changements induits par les oméga-3 dans les taux plasmatiques de leptine est dépendante de l'IMC. En revanche, dans notre étude, aucun changement significatif n'a été détecté dans les concentrations sériques des animaux soumis à un régime standard et nés de mères supplémentées en DHA. Par ailleurs, nos observations montrent, comme attendu, que le régime hypercalorique augmente les concentrations de leptine

circulante. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA n'a pas d'influence sur les modifications des taux de leptine de la descendance face à un environnement obésogène.

En outre, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans les niveaux circulants de cholestérol chez les animaux de tous les groupes. Alors que l'étude de Skulas-Ray et ses collègues avait montré que les oméga-3 sont efficaces dans la réduction des triglycérides circulants (201), nos résultats ont montré une hypertriglycéridémie sanguine chez les animaux soumis à un régime hypercalorique et nés de mères supplémentées en DHA. Cependant, cette étude avait été réalisée avec une supplémentation aiguë en oméga-3 contrairement à la nôtre, dont l'effet étudié est lié à une supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation. De plus, les résultats obtenus dans les études expliquant l'action hypotriglycéridémiant des oméga-3 montrent des effets dose-dépendants. Ces études suggèrent que des doses d'oméga-3 élevées sont nécessaires pour obtenir des effets significatifs. De plus, l'effet hypotriglycéridémiant des oméga-3 avait tendance à être plus important lorsque les taux de triglycérides étaient plus élevés dès le départ (202). En revanche, alors que l'apport en oméga-3 est corrélé à une réduction des taux plasmatiques de triglycérides dans très peu d'études (203) (204), la plupart des travaux publiés rejoignent nos résultats en montrant une corrélation relativement faible ou inexistante entre la supplémentation en oméga-3 et les triglycérides sériques (205) (206) (207) (208).

Les principaux résultats métaboliques obtenus dans notre étude ont montré que la supplémentation maternelle en DHA ne joue pas de rôle bénéfique dans la régulation du poids corporel, de la masse graisseuse, des concentrations sériques en leptine et triglycérides chez la descendance dans des conditions obésogènes indépendamment de l'âge et du sexe.

Par ailleurs, il est bien connu que les régimes riches en graisses et en sucres entrainent une intolérance au glucose. Cependant, nos résultats ont pu montrer qu'après un test de tolérance au glucose, la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation a empêché le développement d'une intolérance au glucose chez les descendants mâles obèses. Les résultats de notre étude concordent avec ceux obtenus dans une étude récente réalisée chez la souris, qui a montré que la supplémentation en huile de poisson après un régime hypercalorique corrige l'intolérance au glucose chez les souris obèses (209). Bien que les mécanismes par lesquels le DHA module la tolérance au glucose ne soient pas complétement élucidés, des rapports antérieurs ont montré que l'amélioration de l'homéostasie glucidique obtenue serait le résultat d'une réduction de l'inflammation et d'une amélioration de la transduction du signal de l'insuline dans les principaux tissus métaboliques (210), des

paramètres que nous n'avons pas analysé dans notre étude. De plus, l'étude réalisée par Höper et ses collègues, soutient également nos résultats en montrant que la supplémentation en AGPI n-3, même à de faibles concentrations par rapport à celles rapportées dans d'autres études, améliore la tolérance au glucose chez les souris obèses (211).

Par ailleurs, l'analyse en *post mortem* des concentrations sériques en glucose n'a pas montré de changements significatifs chez les animaux de tous les groupes quels que soient le régime et la supplémentation maternelle. Cependant, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline, les résultats des concentrations en glucose inchangées coïncidaient avec une forte sécrétion de l'insuline, montrant le rôle fonctionnel de l'insuline dans l'internalisation du glucose par les tissus cibles. Ces résultats ont montré que ces animaux n'étaient pas insulino-résistants bien qu'en accord avec les observations précédentes, ils étaient intolérants au glucose. En revanche, bien que nous n'ayant pas observé de changements dans les concentrations sériques en glucose chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA, nos résultats ne coïncidaient pas avec des modifications de la sécrétion d'insuline. Cela suggère que la supplémentation maternelle en DHA protège contre l'accumulation du glucose dans la circulation chez la descendance mâle obèse indépendamment de la modulation de la sécrétion de l'insuline. De plus, la supplémentation maternelle en DHA a empêché l'entrée du glucose dans le foie de la descendance obèse. La faible induction de la glycolyse hépatique, comme démontré précédemment dans nos résultats par l'inhibition de l'expression des gènes tels que *PK 1, PDK4 et ChREBP*, soutiennent cette hypothèse. En outre, il faut noter que l'expression de *ChREBP* est stimulée en condition d'hyperinsulinémie. Par conséquent, la forte sécrétion d'insuline chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline est corrélée avec une forte expression hépatique de *ChREBP* chez ces animaux. En revanche, il a été montré que la protéine ChREBP endogène est retenue dans le cytosol en présence d'AGPI mais transférée du cytosol vers le noyau dans des conditions d'insuline élevée afin d'induire l'expression des gènes glycolytiques cibles (212). Ainsi, nos résultats mettent en évidence que le DHA est un potentiel inhibiteur de la glycolyse en réduisant l'action glycolytique de *ChREBP* par suppression de son abondance nucléaire. Bien que nous ne puissions pas totalement expliquer l'effet bénéfique de la supplémentation maternelle en DHA sur l'homéostasie glucidique observée chez les descendants obèses, les présents travaux suggèrent fortement que les AGPI n-3 peuvent modifier l'expression des gènes glycolytiques pour réguler l'homéostasie du glucose *via* la suppression de l'abondance nucléaire de ChREBP (**Figure 36**). D'autres expériences complémentaires seront nécessaires pour déchiffrer les connexions entre tous les

régulateurs du métabolisme du glucose et la supplémentation en AGPI n-3. Une analyse complémentaire de la voie de la glycolyse dans le tissu adipeux et les muscles (participant aussi à l'homéostasie du glucose) sera notamment envisagée pour tenter d'expliquer l'absence de changement de glucose circulant chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA et l'absence de transport vers le foie. Il est dès lors possible de supposer que la supplémentation maternelle protègerait les descendants obèses des altérations du métabolisme du glucose au niveau du foie bien que la question de l'état de l'homéostasie glucidique au niveau des autres tissus participants à la régulation de métabolisme du glucose reste en suspens.

Par ailleurs, un régime riche en graisses est souvent associé à des altérations des lipides hépatiques conduisant au développement de la stéatose hépatique. Elle est caractérisée principalement par l'accumulation des lipides dans le foie (majoritairement des triglycérides) qui sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques ou sécrétés dans le sang sous forme de VLDL. Les triglycérides peuvent aussi être hydrolysés dans l'hépatocyte et les acides gras qui en résultent servent de substrats pour la β-oxydation. Une altération de l'équilibre de chacune de ces étapes métaboliques contribue au développement de la stéatose hépatique. Nos résultats ont montré que les animaux soumis à un régime hypercalorique et nés de mères supplémentées en DHA présentaient une réduction de l'accumulation des triglycérides hépatiques en comparaison aux animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces observations suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation prévient le développement d'une stéatose hépatique chez les descendants mâles obèses. Il faut noter que l'accumulation des triglycérides résulte : d'un déséquilibre des taux d'entrée, de synthèse ou d'élimination des graisses hépatiques (β-oxydation) (35) et plus spécifiquement de la captation hépatique des acides gras et des triglycérides, de leurs taux de synthèse, de l'hydrolyse des triglycérides ou de l'oxydation des acides gras qui peuvent être altérés (213). Nous avons donc évalué l'expression des gènes impliqués dans les différentes voies métaboliques pouvant contribuer au développement de la stéatose hépatique. Par ailleurs, il a été rapporté que la consommation aiguë des oméga-3 réduit l'accumulation des lipides hépatiques chez les animaux soumis à un régime riche en graisses, en inhibant la lipogenèse *de novo* (214). Rappelons que la lipogenèse est la voie métabolique qui permet de synthétiser des acides gras à partir du glucose. Elle nécessite le métabolisme du glucose en pyruvate par la voie de la glycolyse permettant ainsi de fournir les carbones nécessaires à la synthèse des acides gras (**Figure 38**). Or, comme montré précédemment dans nos résultats, l'expression du gène *PKM I,* codant pour la protéine qui génère du pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate, était réduite

chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison aux animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. De même l'expression de *PDK4* était réduite chez ces animaux. En accord avec ces résultats, nous avons observé une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* tels que *Fas* et *SCD-1* chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison aux animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces observations montrent que l'effet « protecteur » du DHA a été transmis à la descendance mâle obèse bien que les niveaux de DHA dans la circulation sanguine soient nuls au moment du sacrifice de nos animaux à trois mois. De plus, la supplémentation maternelle en DHA a inhibé la voie de la glycolyse et par conséquent la lipogenèse *de novo* dépendante du métabolisme du glucose en pyruvate. En outre, il a été montré que le DHA réduit l'activité de *ChREBP* en réduisant son abondance nucléaire, ce qui suggère un nouveau mécanisme par lequel le DHA peut agir pour diminuer la glycolyse et la lipogenèse dans la NAFLD (**Figure 37**) (215). Ces observations consolident les résultats obtenus dans cette étude. De plus, Valenzuela et ses collègues ont montré que la supplémentation en oméga-3 exerce des effets anti-stéatosiques notamment dans la récupération du statut lipogénique du foie altéré par le régime riche en graisses, en accord avec nos observations (216).

De façon intéressante, les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA présentaient également une expression réduite des gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides comme *GPAM et DGAT2* en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats mettent en évidence que la supplémentation maternelle en DHA permet de réduire les triglycérides hépatiques chez les descendants mâles obèses en inhibant leur synthèse.

En revanche, alors qu'il a été montré dans la littérature que les oméga-3 augmentent l'oxydation des acides gras, nos résultats ont montré une baisse de l'expression des gènes impliqués dans la β-oxydation tels que *MCAD* et *HADH*, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. L'expression de ces gènes était également réduite chez les animaux soumis à un régime standard et nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux du groupe contrôle nés de mères supplémentées en solution saline. Nos résultats montrent que la supplémentation maternelle en DHA diminue la voie de la β-oxydation indépendamment du régime postnatal. Par ailleurs, dans notre étude, les données obtenues suggèrent que l'action hypotriglycéridémique hépatique des AGPI n-3 ne s'explique pas par une forte oxydation des

acides gras dans les foies des descendants et s'oppose aux observations de la littérature (217) (218) (219). Cela pourrait s'expliquer par une suite d'inhibition des voies métaboliques qui précèdent la β-oxydation. En effet, les acides gras provenant de la lipolyse des triglycérides sont convertis en acétyl-CoA qui initient la β-oxydation. Or, comme nos résultats l'ont démontrée, la supplémentation maternelle en DHA inhibe les gènes codant pour les enzymes qui synthétisent les triglycérides dans le foie des descendants (*GPAM et DGAT2*). Par conséquent, la réduction en substrats nécessaires à l'initiation de la β-oxydation conduit à une faible expression des gènes impliqués dans la voie de l'oxydation des acides gras (**Figure 38**).

Ainsi, nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'effet de la supplémentation maternelle en oméga-3 est probablement bénéfique aux stades précoces de la stéatose hépatique chez les descendants mâles obèses. Cet effet bénéfique était médié par la réduction des lipides hépatiques, en particulier les triglycérides, en diminuant leur synthèse et la lipogenèse *de novo*.

Par ailleurs, nos résultats ont également montré que l'effet protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre l'intolérance en glucose évolue avec l'âge de façon dépendante du sexe car nos résultats ont montré qu'à six mois les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA étaient tolérantes au glucose contrairement aux mâles âgés de six mois. Il est de nos jours, bien connu que les effets de la programmation métabolique évoluent de manière différente avec l'âge et le sexe de la descendance. Ainsi, nos résultats corroborent les données de la littérature montrant des différences de sexe dans la façon dont le placenta réagit aux changements d'état nutritionnel pendant la gestation qui sous-tendent des phénotypes de progéniture sexuellement dimorphes (220) (221) (222) (223) (224). Néanmoins, des études supplémentaires portant sur les deux sexes sont nécessaires pour comprendre comment les changements dans l'environnement au début de la vie ont un impact sur la santé à long terme des animaux mâles et femelles.

En revanche, l'effet bénéfique de la supplémentation maternelle en DHA contre l'accumulation des lipides hépatiques perdure sur le long terme et de façon indépendante du sexe puisque les animaux mâles et femelles obèses plus âgés (6 mois) nés de mères supplémentées en DHA présentaient des niveaux réduits de triglycérides et de cholestérols hépatiques en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces données corroborent les résultats observés précédemment chez les animaux plus jeunes (3 mois), ce qui appuie l'importance d'un apport nutritionnel en oméga-3 pendant la gestation et la lactation et souligne la nécessité de poursuivre les études animales examinant l'impact de

l'apport maternel en oméga-3 sur le développement de la progéniture et la santé sur le long terme.

Les principales conclusions de la présente étude sont que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation améliore le métabolisme glucidique et empêche l'intolérance au glucose chez les descendants mâles âgés de 3 mois et sur le long terme (6 mois) uniquement chez les femelles, lorsque les animaux sont soumis à un environnement obésogène. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA prévient la stéatose hépatique chez les descendants mâles de 3 mois tout comme les animaux mâles et femelles plus âgés (6 mois). En effet, certaines actions du DHA sont plus puissantes et peuvent perdurer dans le temps de façon indépendante du sexe après transmission à la descendance alors que d'autres évoluent en fonction de l'âge et du sexe. Enfin, les résultats de notre étude ont démontré que les effets bénéfiques du DHA peuvent évoluer avec l'âge et le sexe chez la descendance soulevant un effet de sexe sur la question de l'effet « programmateur » du DHA.

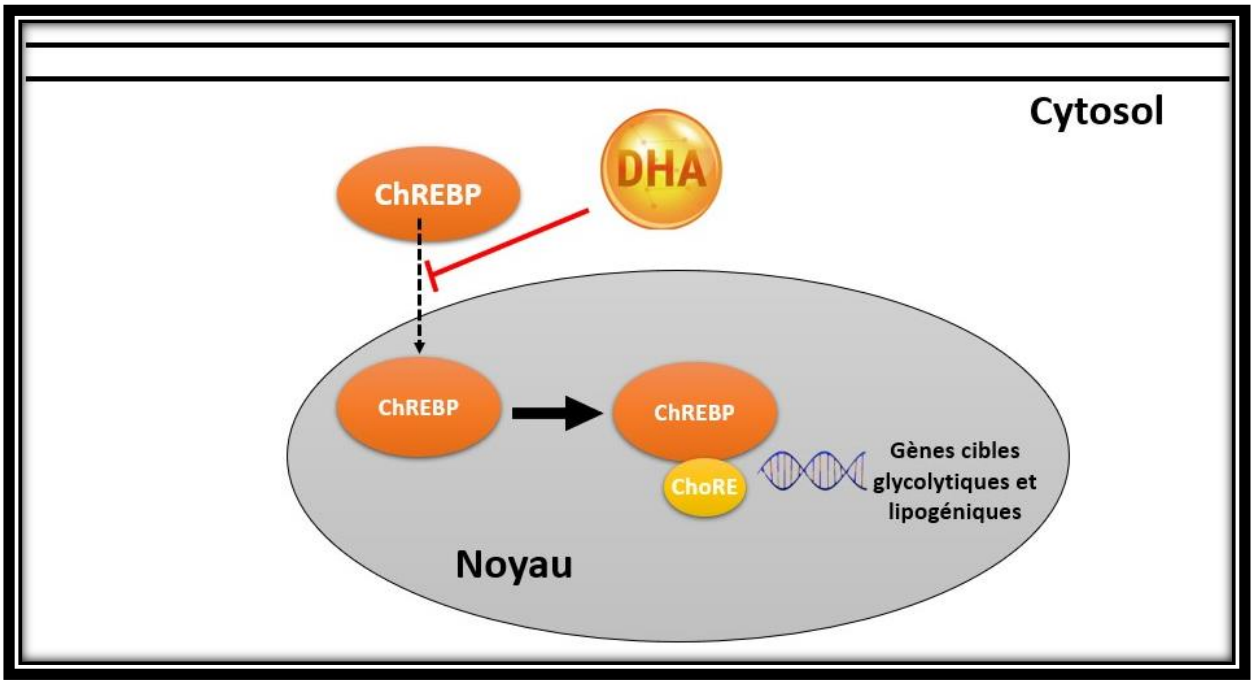


Figure 36 : Effet inhibiteur des AGPI sur l'activation et la translocation de ChREBP.

Dans des conditions basales de faibles concentrations de glucose et d'insuline, la protéine ChREBP est phosphorylée et localisée dans le cytosol des hépatocytes. En revanche, des concentrations élevées de glucose et d'insuline induisent la translocation nucléaire de la protéine ChREBP. Ensuite, lorsque la protéine ChREBP est transloquée dans le noyau, elle se lie à son élément de réponse (ChoRE) pour activer l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques (*Glut2* (*Transporteur de glucose-2*), *L-PK* (*L-pyruvate kinase*), *ACL* (*ATP citrate lyase*), *ACC* (*Acétyl-CoA carboxylase*), *Fas* (*Acide gras synthase*), *SCD* (*Stéaroyl-CoA désaturase*)) (212) (214) (215) (225).

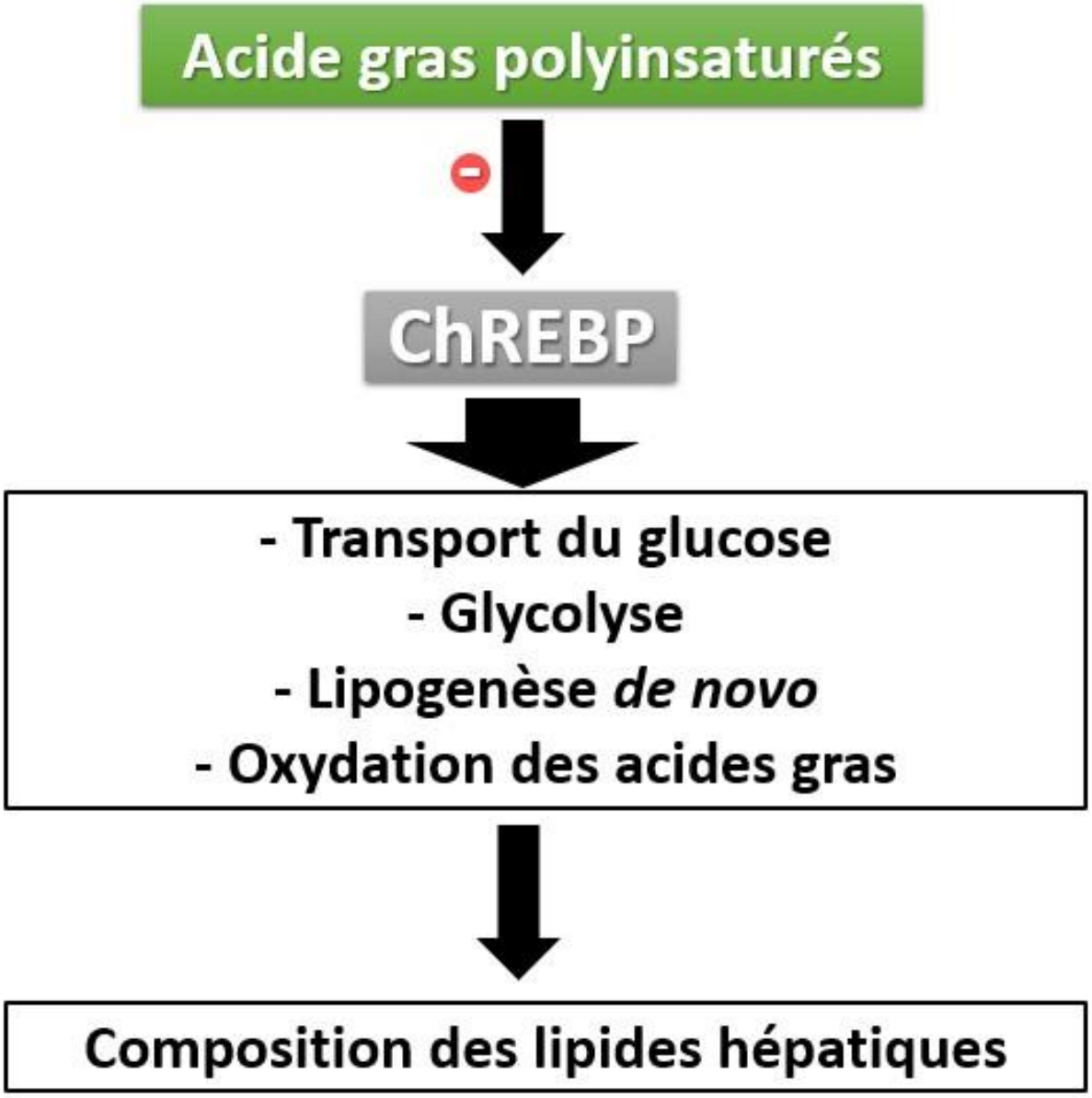


Figure 37 : Régulation de l'activité de ChREBP et son impact dans la composition des lipides hépatiques. **(-)** *correspond à une inhibition.*

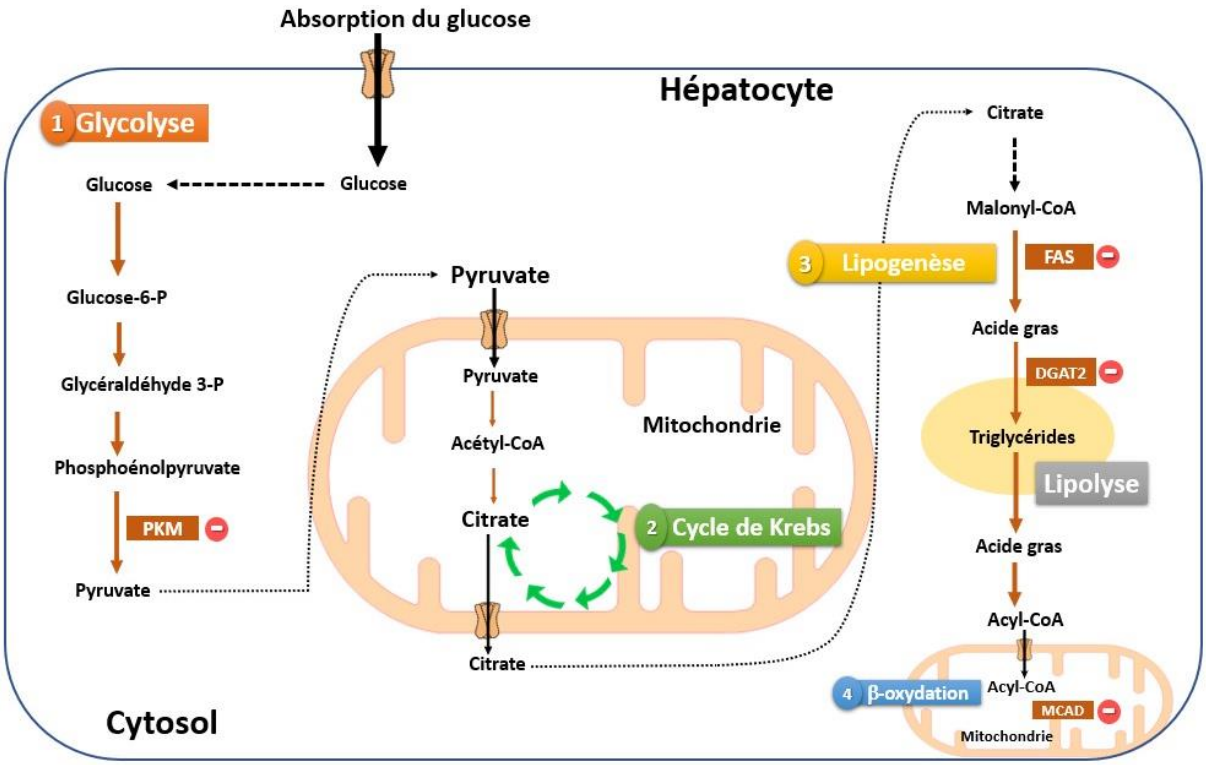


Figure 38 : Impact des acides gras polyinsaturés (AGPI) sur les voies du métabolisme hépatique des glucides et des lipides. **(-)** *correspond à une inhibition*.

Les acides gras polyinsaturés contrôlent l'abondance nucléaire de ChREBP (comme décrit dans la figure 36) qui contrôle le transport de glucose mais aussi l'expression des gènes glycolytiques (*PKM*) et lipogéniques (*Fas*). On peut supposer que l'inhibition du gène *Fas* entraine par conséquent une inhibition de la production des acides gras. En découle alors une réduction de l'expression du gène *DGAT2* qui ne peut induire la synthèse des triglycérides à partir des acides gras. Cela conduit par conséquent à une inhibition de la β-oxydation en raison de la réduction de la synthèse de l'acétyl-CoA à partir des acides gras provenant de la lipolyse des triglycérides et donc une inhibition des gènes impliqués dans cette voie tels que *MCAD*.

Partie 2

“ Effet propre de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) : comparaison avec la supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6)”

a) RÉSULTATS

1. Les effets anti-stéatosiques de la supplémentation maternelle en DHA sont-ils liés aux propriétés spécifiques du DHA ou à sa charge lipidique ?

Pour donner suite à notre première série de résultats, nous avons cherché à savoir si l'effet protecteur du DHA était lié à ses propriétés spécifiques ou à sa charge lipidique. Pour cela nous avons ajouté un groupe expérimental de mères supplémentées en huile de carthame afin de dissocier l'effet bénéfique du DHA de sa charge lipidique.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN L'HUILE DE CARTHAME SUR LES CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES ET METABOLIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Nous avons évalué les caractéristiques anthropométriques et métaboliques des descendants mâles âgés de 3 mois. Nous avons observé que les animaux obèses présentaient une augmentation du poids corporel, du tissu adipeux et des concentrations sériques en leptine en réponse à un régime hypercalorique indépendamment de la supplémentation maternelle en DHA ou en huile de carthame (**Tableau 11**). Ces résultats rejoignent nos données précédentes en montrant que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation ne joue pas de rôle dans la prise de poids, l'expansion du tissu adipeux ou les concentrations élevées de leptine induites par l'obésité chez les descendants.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN HUILE DE CARTHAME SUR L'HOMEOSTASIE DU GLUCOSE DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Nous avons également évalué l'homéostasie glucidique chez les animaux mâles âgés de 3 mois en réalisant un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale.

En réponse au régime hypercalorique, les mâles nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame pendant la gestation et la lactation, présentaient une forte intolérance au glucose (**Figure 39**). En revanche, les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation, avaient une meilleure tolérance au glucose (**Figure 39**). Ces données ont montré que la supplémentation maternelle en DHA prévient contre l'intolérance au glucose chez les descendants mâles obèses.

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée sur les concentrations sériques en glucose entre les rats soumis à un régime *FcHFHS* et ceux soumis à un régime standard indépendamment de la supplémentation maternelle (**Tableau 11**). En revanche, les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame avaient des concentrations d'insuline significativement plus élevées alors que les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA ne présentaient pas d'hyper-insulinémie (**Tableau 11**). La forte sécrétion de l'insuline chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame rejoint les résultats de la quantification du glucose sérique montrant le rôle fonctionnel de l'insuline qui a pu internaliser le glucose dans les tissus cibles d'où le fait qu'il n'y ait pas de fortes concentrations en glucose dans la circulation, en réponse au régime hypercalorique. Ces résultats suggèrent néanmoins que les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame ne sont pas insulino-résistants bien qu'ils soient intolérants au glucose.

En revanche, les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA ne présentaient pas d'hyper-insulinémie et n'avaient pas de concentrations élevées en glucose circulant (**Tableau 11**). La supplémentation maternelle en DHA a protégé la descendance de l'accumulation du glucose dans la circulation, en réponse à un régime hypercalorique, indépendamment de la sécrétion d'insuline. Ces résultats corroborent les données de notre première série de résultats et démontrent que l'effet protecteur de la supplémentation maternelle

en DHA contre l'altération du métabolisme du glucose, que pourrait entrainer un état d'obésité chez les descendants mâles, est lié aux propriétés spécifiques du DHA et non à sa charge lipidique.

En résumé :

L'effet protecteur du DHA contre l'intolérance au glucose et l'hyper-insulinémie, observé principalement chez les descendants obèses nés de mères supplémentées en DHA, est lié à une action propre au DHA et non à sa charge lipidique.

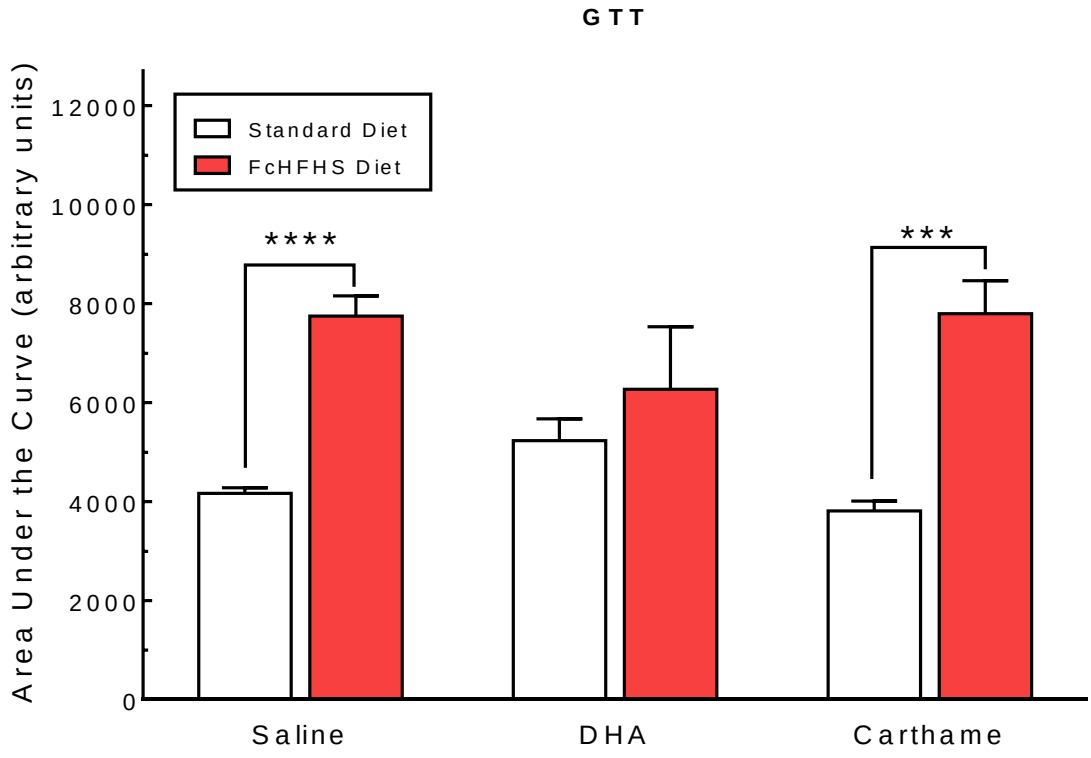


Figure 39 : Test de tolérance du glucose par voie intrapéritonéal chez les descendants mâles âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA), 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet, DHA standard diet et Carthame standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS, DHA fcHFHS et Carthame fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges); Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges). À 3 mois, un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ; DHA standard *versus* DHA fcHFHS et Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). *******p <0,001, ******** p < 0,0001. Two-way ANOVA bidirectionnel : Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle.

Tableau 11 : Caractéristiques phénotypiques des rats mâles de 3 mois nés de mères supplémentées avec du sérum physiologique, du DHA ou de l'huile de carthame et exposés à un régime FcHFHS ou nourris avec de la nourriture standard après le sevrage.

	Saline		DHA		Carthame	
	Standard Diet	FcHFHS Diet	Standard Diet	FcHFHS Diet	Standard Diet	FcHFHS Diet
Caractéristiques anthropométriques						
Poids corporel (g)	480 ± 8.73	549 ± 12.27***	476 ± 9.99	567 ± 14,57****	485 ± 13.01	572 ± 11.35****
Tissu adipeux rétropéritonéal (g)	8.42 ± 0.35	20.61 ± 1.87****	7.85 ± 0.25	17.01 ± 1.81****	9.07 ± 0.80	17.06 ± 1.76***
Métabolites sériques						
Glucose (mg/dL)	182.50 ± 4.87	204.38 ± 8.62	197.20 ± 8.26	204.16 ± 9.50	196.59 ± 9.40	209.29 ± 9.79
Insuline (ng/ml)	0.92 ± 0.15	2.51 ± 0.49**	2.09 ± 0.41	1.98 ± 0.15	1.24 ± 0.19	2.69 ± 0.51*
Leptine (ng/ml)	10.60 ± 0.46	37.01 ± 7.51****	11.90 ± 1.66	34.58 ± 5.44****	12.88 ± 0.95	29.19 ± 4.35****
Acides gras libres (mg/dL)	25.46 ± 4.71	21.31 ± 2.63	27.65 ± 2.32	23.76 ± 2.86	30.41 ± 4.79	27.04 ± 3.74
Cholestérol (mg/dL)	71.89 ± 6.35	77.71 ± 3.56	64.73 ± 4.64	72.38 ± 4.32	63.20 ± 2.82	76.71 + 5.17

*P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001 par rapport aux animaux du même groupe (Saline, DHA, Huile de Carthame) nourris avec une alimentation standard, déterminé par le test t de Student.

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN HUILE DE CARTHAME SUR LA COMPOSITION DES LIPIDES HEPATIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Nous avons précédemment montré que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation avait des effets bénéfiques contre l'accumulation des lipides hépatiques chez les descendants obèses. Nous avons donc poursuivi nos observations sur les effets bénéfiques d'une supplémentation maternelle en DHA en comparaison à une supplémentation maternelle en huile de carthame afin de mettre en évidence les propriétés spécifiques du DHA.

Nous avons observé une forte accumulation des concentrations en triglycérides (**Figure 40A**) et en cholestérols hépatiques (**Figure 40B**) chez les rats mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame alors que les rats mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA avaient des concentrations en triglycérides et en cholestérols hépatiques similaires à celles des rats soumis à un régime standard (**Figure 40A** et **Figure 40B**). Ces observations montrent que le régime *FcHFHS* induit une augmentation des lipides hépatiques. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA a permis de diminuer l'accumulation des lipides hépatiques en réponse au régime. Ces résultats montrent que la supplémentation maternelle en DHA prévient la progression de la stéatose hépatique chez la descendance des rats obèses, notamment *via* l'atténuation de l'accumulation de lipides hépatiques. Ces effets protecteurs sont liés à la capacité du DHA à inhiber les mécanismes induisant une accumulation des lipides et non à sa charge lipidique.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN HUILE DE CARTHAME SUR L'EXPRESSION DES GENES GLYCOLYTIQUES, LIPOGENIQUES, EN CHARGE DE LA SYNTHESE DES TRIGLYCERIDES ET DE LA β-OXYDATION DANS LE FOIE DE LA DESCENDANCE MALE AGEE DE 3 MOIS

Afin d'approfondir notre recherche et toujours dans le but de dissocier l'action propre du DHA de sa charge lipidique, nous avons évalué les différentes voies métaboliques impliquées dans le métabolisme du glucose et dans l'accumulation des lipides hépatiques en comparant les effets de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) à ceux d'une supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6) (**Figure 41**).

Notre première série des résultats, obtenue chez les animaux mâles âgés de 3 mois, avait montré que la supplémentation maternelle en DHA protège contre l'accumulation des triglycérides hépatiques en inhibant trois voies métaboliques : la lipogenèse *de novo*, la synthèse des triglycérides et, de façon inattendue, la β-oxydation. Nous avons aussi évalué l'expression des gènes impliqués dans ces voies métaboliques chez les animaux nés de mères supplémentées en huile de carthame afin de comparer l'action du DHA à celle de l'huile de carthame. Nos résultats avaient montré une inhibition de l'expression de *ChREBP*, régulateur transcriptionnel majeur qui induit des enzymes lipogéniques clés pour favoriser la lipogenèse *de novo* hépatique dans les foies des animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA. De façon similaire, nous avons aussi observé une inhibition de l'expression de *Fas* (*Fatty acid synthase*), également impliqué dans la lipogenèse *de novo*, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. En revanche, chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame, nous avons observé une forte expression de ces gènes lipogéniques (*ChREBP* et *FAS*) en comparaison des animaux nourris avec une alimentation standard et nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame, à l'exception du gène *SCD-1*, dont l'expression était diminuée de la même façon chez les animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA (oméga-3) et les descendants obèses de mères supplémentées en huile de carthame (oméga-6). Cela pourrait être lié aux propriétés des acides gras polyinsaturés, notamment les familles des oméga-3 et des oméga-6.

Il a en effet été rapporté que les acides gras polyinsaturés peuvent inhiber l'expression de l'ARNm de SCD-1 hépatique (226) (227).

Ces résultats ont montré que la supplémentation maternelle a entrainé une inhibition de la lipogenèse *de novo* conduisant à une diminution des triglycérides hépatiques des descendants mâles obèses et que ces effets étaient liés aux propriétés spécifiques du DHA et non à sa charge lipidique.

Nos résultats ont également montré que l'expression hépatique des gènes *GPAM* et *DGAT2*, impliqués dans la synthèse des triglycérides, était réduite chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA ou en huile de carthame en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Bien que la supplémentation maternelle en huile de carthame réduise la synthèse de triglycérides chez les descendants mâles obèses, aucun effet n'est observé contre l'accumulation des triglycérides hépatiques puisque nous avons observé une accumulation des triglycérides hépatiques chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA entraine une diminution des triglycérides hépatiques chez les descendants mâles obèses, s'expliquant par une faible lipogenèse *de novo* et une synthèse des triglycérides réduite. Ces observations mettent en évidence que le DHA est capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et la synthèse des triglycérides hépatiques.

Par ailleurs, nous avons observé une diminution de l'expression du gène *MCAD*, impliqué dans la β-oxydation, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA ou en huile de carthame en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. D'autre part, une forte expression du gène *HADH*, impliqué aussi dans la β-oxydation, était observée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame comparé aux animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. En revanche, l'expression de *HADH* était réduite chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats ont montré un effet paradoxal de la supplémentation maternelle en huile de carthame sur les gènes impliqués dans la β-oxydation chez les descendants mâles obèses. Malgré le fait que la supplémentation maternelle en DHA diminue la voie de la β-oxydation chez les descendants mâles obèses cela n'a pas empêché l'inhibition de l'accumulation des triglycérides chez les descendants mâles obèses. Ceci indique que l'inhibition de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse des triglycérides qu'entraine la

supplémentation maternelle est suffisante pour protéger les descendants mâles contre l'accumulation des triglycérides hépatiques.

Nos résultats ont également montré une augmentation de l'expression de *ChREBP* (*reconnu comme étant un facteur de transcription activé par une glycémie élevée indépendante de l'insuline et jouant également un rôle clé dans la glycolyse*) chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame. En revanche, aucun changement d'expression n'a été observé pour les animaux du groupe sous régime contrôle et les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Ces observations corroborent les résultats du test de tolérance au glucose et de la quantification de l'insuline sérique, montrant que le DHA régule l'homéostasie glucidique. On peut donc supposer que l'entrée du glucose dans le foie est empêchée chez les descendants des mères supplémentées en DHA. En conséquence, les voies métaboliques connectées sont inhibées, notamment la lipogenèse, la synthèse des triglycérides ainsi que la β-oxydation. Ces observations pourraient expliquer les résultats de l'inhibition des gènes impliqués dans ces voies, observée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Il est dès lors possible de supposer que l'entrée du glucose dans le foie est bloquée par l'action « programmatrice » du DHA.

Par ailleurs, nous avons observé une réduction de l'expression de *PKM 1* et de *PDK4* chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA ou en huile de carthame en comparaison des mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Bien que la supplémentation maternelle en huile de carthame réduise les gènes impliqués dans la glycolyse nous n'avons pas observé de protection contre l'altération de l'homéostasie glucidique chez les descendants mâles obèses.

En résumé :

Nos résultats géniques indiquent que le DHA peut inhiber l'accumulation de triglycérides hépatiques en inhibant les voies de la lipogenèse *de novo*, de la synthèse de triglycérides et de la β-oxydation. Ces effets sont propres aux actions du DHA.

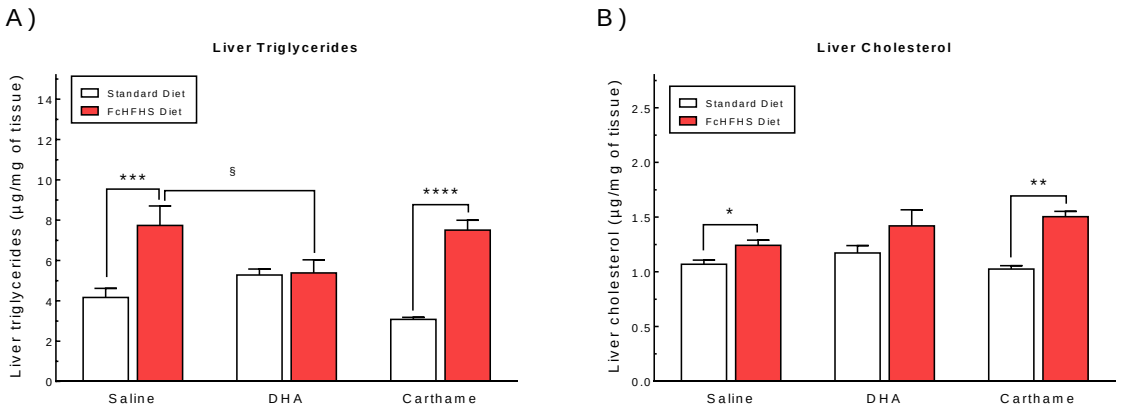
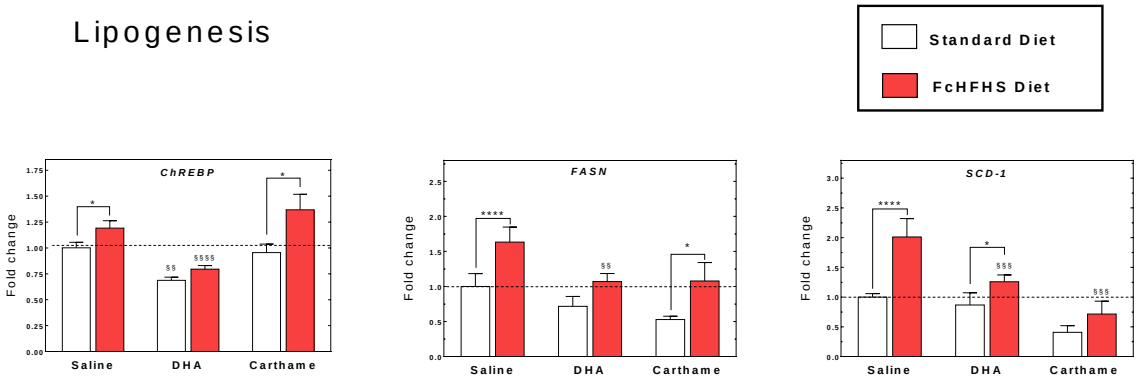


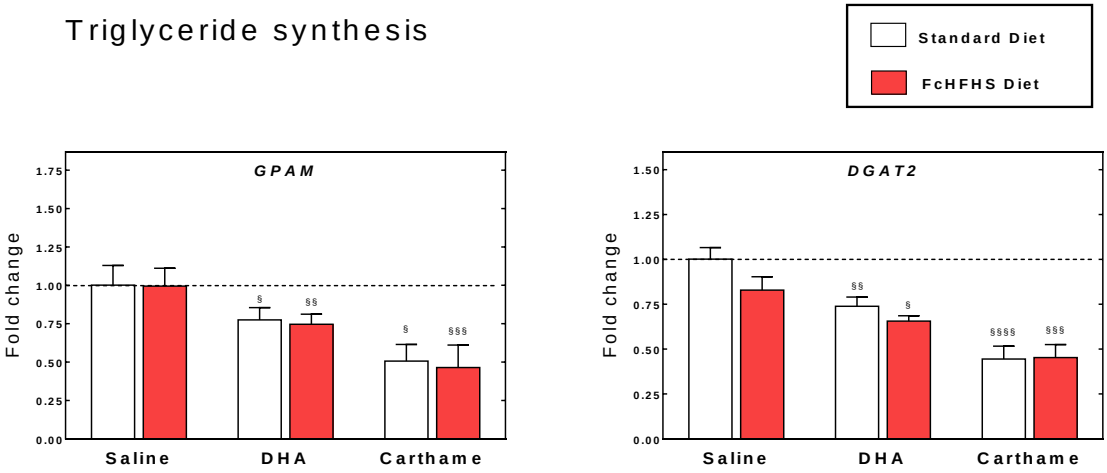
Figure 40 : Concentrations des lipides hépatiques chez les mâles âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA), 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourries *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet, DHA standard diet et Carthame standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS, DHA fcHFHS et Carthame fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges); Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les concentrations sériques de triglycérides (**A**) et de cholestérol (**B**) ont été déterminées. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ; DHA standard *versus* DHA fcHFHS et Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, *******$p < 0,001$, ******** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ; Carthame standard diet *versus* Saline standard diet ; DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS ; Carthame fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § $p < 0,05$.

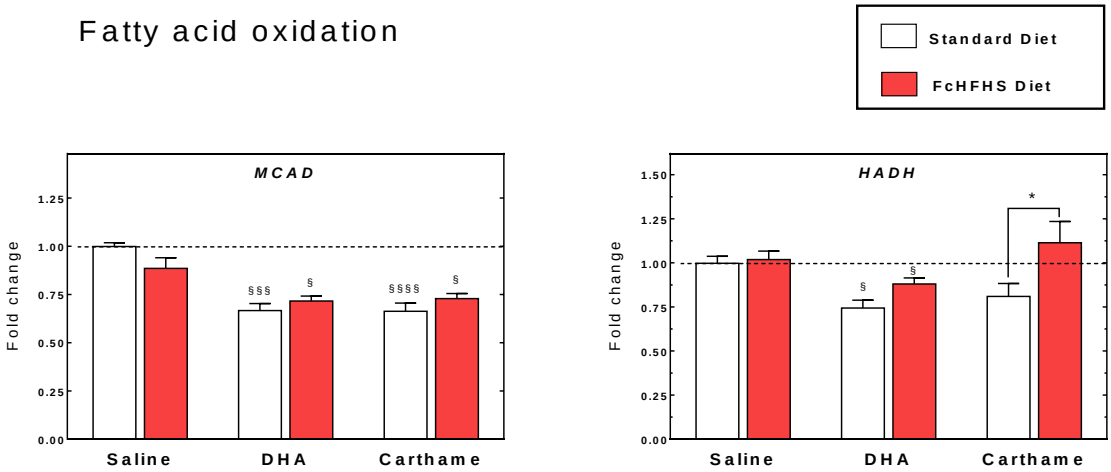
Lipogenesis



Triglyceride synthesis



Fatty acid oxidation



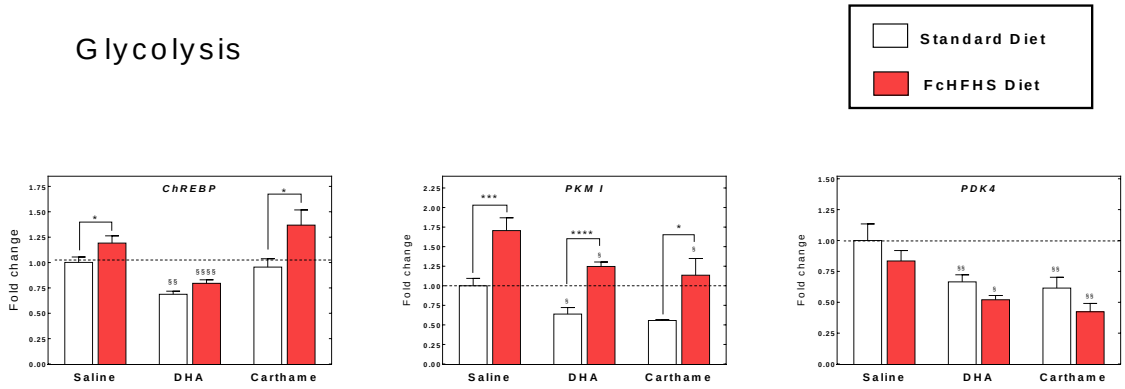


Figure 41 : Effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les voies métaboliques hépatiques de la descendance mâle adulte âgée de 3 mois *versus* supplémentation maternelle en huile de Carthame.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA), 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet, DHA standard diet et Carthame standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS, DHA fcHFHS et Carthame fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges); Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les foies des animaux ont été récupérés et les ARNm des protéines intervenant dans les différentes voies métaboliques ont été quantifiés par RT-Qpcr. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS, DHA standard *versus* DHA fcHFHS et Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, *******$p < 0,001$, ******** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ; Carthame standard diet *versus* Saline standard diet ; DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS ; Carthame fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ §§§§ $p < 0,0001$.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN HUILE DE CARTHAME SUR LES MODIFICATIONS DES HISTONES DANS LE TISSU HEPATIQUE DE LA DESCENDANCE MALE AGEE DE 3 MOIS

Afin d'approfondir les mécanismes d'action du DHA sur l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques précédemment montrées, nous avons voulu étudier les modifications des histones dans le foie des animaux nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux nés de mères supplémentées en huile de carthame. Les modifications des histones offrent une vue plus approfondie des mécanismes géniques en tant que régulateurs transcriptionnels *via* la modification de la chromatine pour promouvoir ou réprimer l'expression du gène cible.

Nous avons sélectionné deux modifications des histones liées à la répression de la transcription, H3K9me3 (**Figure 42A**) et H3K27me3 **(Figure 42B**) et deux modifications des histones liées à l'activation transcriptionnelle, H3K4me3 **(Figure 42C**) et H3K14me3 (**Figure 42D**).

Nos résultats de Western blot n'ont montré aucune différence de modification des histones entre les différents groupes. Cela pourrait s'expliquer par le choix des modifications des histones. Néanmoins, bien que l'absence de modification des histones ne nous ait pas permis d'aller plus loin dans nos recherches des modifications épigénétiques par la supplémentation maternelle en DHA, cela ne prédit pas pour autant l'absence de modification post-transcriptionnelle.

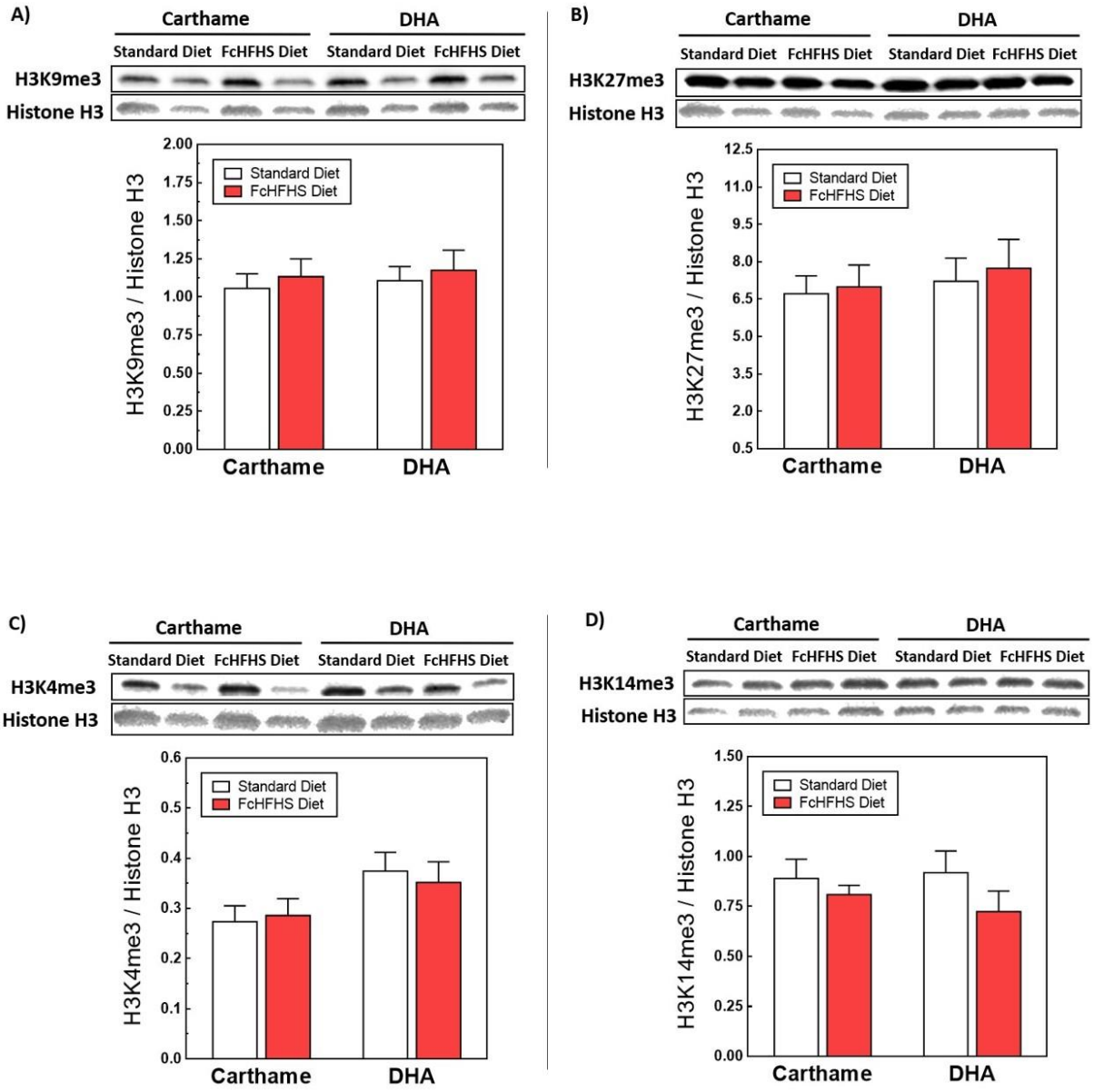


Figure 42 : Effet de la supplémentation maternelle sur les modifications des histones dans le foie des animaux âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'huile de carthame comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Carthame standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Carthame fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre

groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les modifications des histones ont été étudiées dans le foie des animaux par Western Blot. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ET EN HUILE DE CARTHAME SUR LES CONCENTRATIONS DES LIPIDES SERIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Bien que nous ayons observé une inhibition de l'accumulation de triglycérides hépatiques chez les descendants mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA, nos résultats ont montré une hypertriglycéridémie chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA (**Figure 43A**). De même, les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame présentaient une hypertriglycéridémie **(Figure 43A**). La supplémentation en DHA n'avait pas d'effet protecteur contre l'hypertriglycéridémie chez les descendants mâles obèses. Par ailleurs, il faut noter qu'une accumulation excessive de triglycérides dans le foie résulte d'un déséquilibre entre les différentes voies métaboliques suivantes :

- Lipogenèse *de novo*
- β-oxydation
- Surproduction et sous-catabolisme de lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons intestinaux et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) hépatiques).

Comme nous avons évalué l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et la β-oxydation, nous avons donc supposé que l'inhibition de l'accumulation des triglycérides au niveau du foie pourrait s'expliquer par un transport vers la circulation. Pour ce faire nous avons quantifié les VLDL qui assurent le transport des triglycérides du foie vers la circulation chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux nés de mères supplémentées en huile de carthame afin de dissocier l'effet propre du DHA de sa charge lipidique.

Nos résultats ont montré une forte concentration en VLDL chez les animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux sous régime standard nés de mères supplémentées en DHA (**Figure 43B**). En revanche, nous n'avons pas observé de différence dans les concentrations en VLDL chez les descendants de mères supplémentées en huile de carthame quel que soit le régime postnatal (alimentation standard ou régime hypercalorique) (**Figure 43B**). On peut supposer que l'hypertriglycéridémie observée chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA serait liée à un transport des triglycérides

du foie vers la circulation et non en réponse au régime hypercalorique comme observé chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame.

En résumé :

Le DHA prévient l'accumulation de triglycérides hépatiques en inhibant la lipogenèse *de novo* et la β-oxydation et en favorisant le transport des triglycérides vers la circulation. L'effet protecteur contre la stéatose hépatique semble donc lié aux propriétés du DHA. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA n'a pas d'effet protecteur contre l'hypertriglycéridémie qui pourrait constituer un facteur de risque cardiovasculaire. Néanmoins, étant donné que l'apport du DHA a été effectué *via* la supplémentation maternelle, les effets que nous observons viennent directement de la transmission épigénétique.

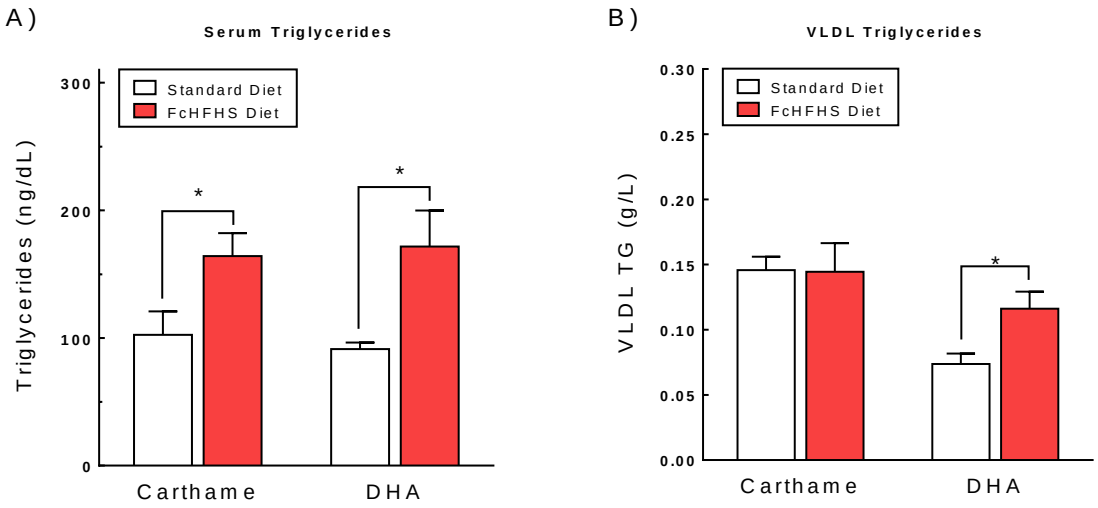


Figure 43 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les triglycérides sériques et la production des VLDL.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'huile de carthame comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Carthame standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Carthame fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les concentrations sériques de triglycérides (**A**) et des VLD-TG (**B**) ont été déterminées. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS et DHA standard *versus* DHA fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$.

2. Quels sont les effets de la supplémentation maternelle en DHA sur les profils lipidiques des descendants mâles âgés de 3 mois ?

Nos précédents résultats ont révélé un effet protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre l'accumulation des triglycérides au niveau hépatique. Nous avons ici cherché à savoir si cette supplémentation maternelle en DHA influe sur les autres classes de lipides. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse quantitative ciblée des sphingolipides dans le foie des animaux mâles âgés de 3 mois.

Approche ciblée

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR LES CONCENTRATIONS DES SPHINGOLIPIDES HEPATIQUES DES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Nous avons réalisé une étude ciblée par spectrométrie de masse. Nous avons voulu déterminer si la supplémentation maternelle en DHA entraîne une protection contre l'accumulation des sphingolipides de la même manière qu'elle a empêché l'accumulation de triglycérides hépatiques chez les descendants mâles obèses, en visant deux familles de sphingolipides : les sphingomyélines et les céramides. Pour cela, nous avons quantifié le taux circulant des sphingomyélines et des céramides dans le tissu hépatique (les espèces de sphingolipides quantifiées sont répertoriées dans **ANNEXE 2**).

Nous avons observé que les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en huile de carthame ne présentaient pas d'accumulation de sphingolipides normalement induite par le régime hypercalorique. Cela pourrait s'expliquer par le régime utilisé pour induire l'obésité dans notre étude. En revanche, nos résultats ont montré une diminution significative des concentrations de toutes les espèces de céramides et de sphingomyélines analysées dans le foie des animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux contrôles. Ces résultats démontrent que la supplémentation

maternelle en DHA inhibe l'accumulation de sphingomyélines (**Figure 44A**) et de céramides (**Figure 44B**) dans le foie lorsque les animaux sont soumis à une charge hyper-lipidique. Il faut noter que les céramides sont produits par l'hydrolyse de la sphingomyéline, catalysée par différentes sphingomyélinases. Ainsi, on suppose que la supplémentation maternelle en DHA a entrainé une inhibition de l'hydrolyse des sphingomyélines entrainant par conséquent une inhibition de la production des céramides.

Par ailleurs, il a été rapporté que les céramides étaient liés à l'inflammation. Nous avons cherché à savoir si cette diminution des concentrations de céramides était liée à une diminution de l'inflammation.

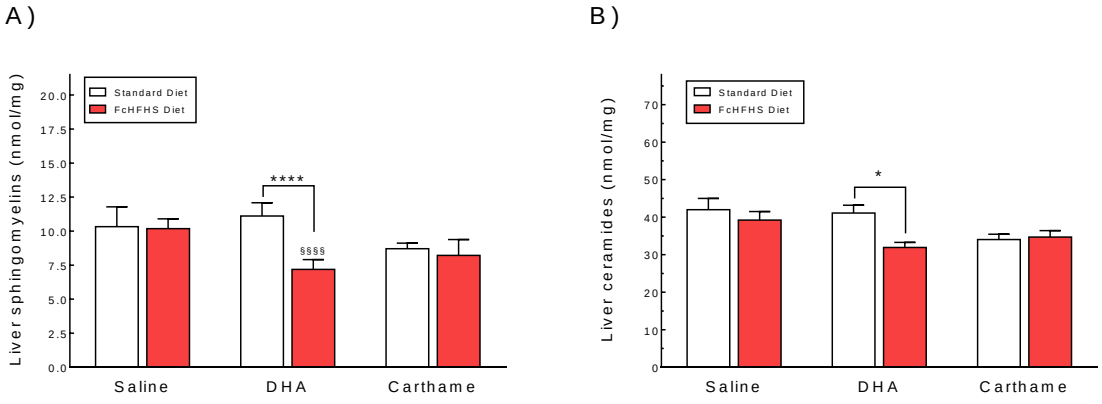


Figure 44 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les sphingolipides hépatiques chez les descendants mâles âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA), 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet, DHA standard diet et Carthame standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS, DHA fcHFHS et Carthame fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet; Saline fc-

HFHS diet; DHA-Standard diet; DHA fc-HFHS diet; Carthame standard diet; Carthame fc-HFHS diet. Après sacrifice des animaux à 3 mois, une quantificaton des sphingolipides a été réalisée par une approche ciblée en spectrométrie de masse. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS ; DHA standard *versus* DHA fcHFHS et Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** $p < 0,05$, ******** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ; Carthame standard diet *versus* Saline standard diet ; DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS ; Carthame fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). §§§§ $p < 0, 0001$.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA SUR L'EXPRESSION HEPATIQUE DU TLR4 ET LA FLUIDITE MEMBRANIRE CHEZ LES DESCENDANTS MALES AGES DE 3 MOIS

Nous avons évalué l'expression génique du TLR4 pro-inflammatoire et nos résultats ont montré que les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ne présentaient pas, comme attendu, une inflammation en réponse au régime hypercalorique. Par ailleurs, l'expression du *TLR 4* était élevée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame, indiquant un état inflammatoire (**Figure 45**). En revanche, l'expression hépatique du *TLR 4* était réduite chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA (**Figure 45**). On peut envisager qu'il existe un lien entre les taux de céramides et le TLR 4 car les changements observés étant similaires. Ces données ont montré que la supplémentation maternelle en DHA prévient contre l'état inflammatoire, notamment en réduisant l'expression du *TLR 4*.

Par ailleurs, Les TLR sont des récepteurs membranaires et on peut supposer que tout changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique peut avoir un impact sur la fluidité membranaire et sur les radeaux membranaires et indirectement sur la signalisation et la dimérisation des TLR. Nous avons donc cherché à savoir si l'effet inhibiteur de la supplémentation maternelle en DHA était corrélé avec l'impact du DHA sur les changements de la fluidité membranaire. Nous avons donc analysé la fluidité membranaire chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux mâles nés de mères supplémentées en huile de carthame. Nos résultats n'ont pas révélé de modification de la fluidité membranaire entre les animaux nés de mères supplémentées en DHA et les descendants de

mères supplémentées en huile de carthame (**Figure 46**). On peut alors supposer que le DHA inhibe l'expression du *TLR 4* par d'autres mécanismes que les changements de la fluidité membranaire. La diminution du taux de céramides par la supplémentation maternelle en DHA pourrait alors entrainer une inhibition du TLR 4. Ainsi, la supplémentation maternelle en DHA pourrait entrainer l'inhibition de l'inflammation en modifiant la composition lipidique, en l'occurrence les taux de céramides hépatiques.

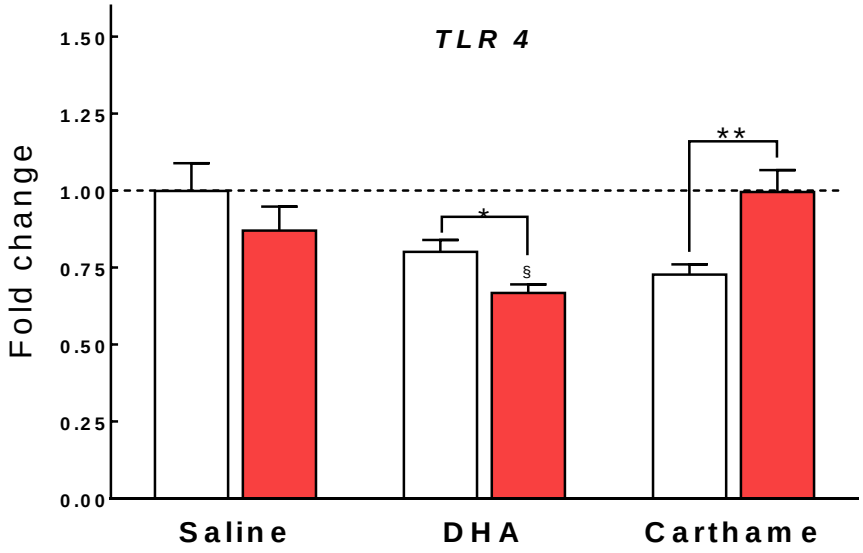


Figure 45 : Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur l'expression hépatique de TLR4 chez les animaux mâles âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA), 350 µL/kg d'huile de carthame ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet, DHA standard diet et Carthame standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS, DHA fcHFHS et Carthame fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Saline standard diet (barres blanches); Saline fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges); Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3 mois, les foies des animaux ont été récupérés et les ARNm ont été

quantifiés par RT-Qpcr. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline standard diet *versus* Saline fcHFHS, DHA standard *versus* DHA fcHFHS et Carthame standard *versus* Carthame fcHFHS (un seul facteur d'analyse : le régime postnatal). ***** p < 0,05, ****** p <0,01. Two-way ANOVA bidirectionnel : DHA standard diet *versus* Saline standard diet ; Carthame standard diet *versus* Saline standard diet ; DHA fcHFHS *versus* Saline fcHFHS ; Carthame fcHFHS *versus* Saline fcHFHS (Deux facteurs d'analyse : le régime postnatal et la supplémentation maternelle). § p < 0,05.

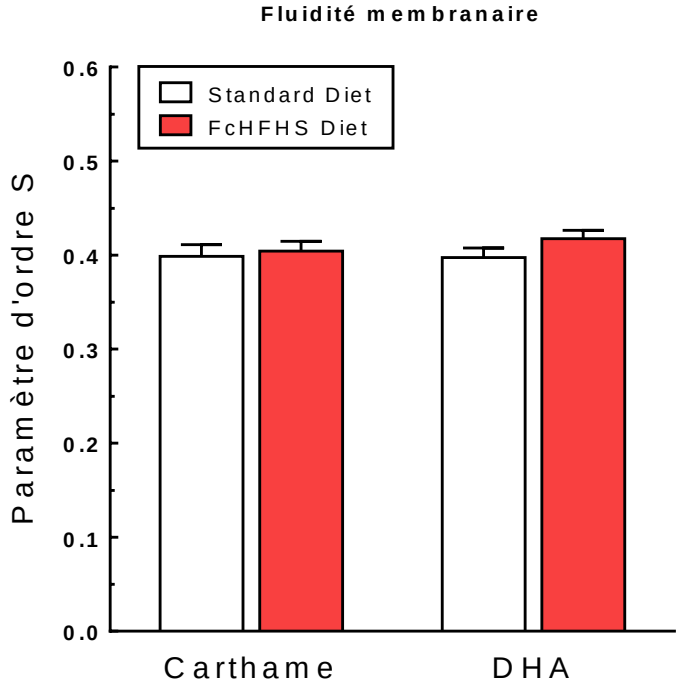


Figure 46 : Effet de la supplémentation maternelle sur les variations de la fluidité membranaire dans le foie des animaux mâles âgés de 3 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'huile de carthame comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Carthame standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Carthame fcHFHS et DHA fcHFHS). Quatre groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: Carthame standard diet (barres blanches); Carthame fc-HFHS diet (barres rouges); DHA-Standard diet (barres blanches); DHA fc-HFHS diet (barres rouges). Après sacrifice des animaux à 3

mois, la fluidité membranaire a été déterminée par Résonnance Paramagnétique Electronique (RPE). N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

b) DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons voulu approfondir les observations de notre première série de résultats. Nous avions montré l'effet préventif de la supplémentation maternelle en DHA contre la stéatose simple décrite comme la présence de gouttelettes de triglycérides dans le cytoplasme dans plus de 5% des hépatocytes. Nous avons donc évalué les effets protecteurs de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) en comparaison d'une supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6) afin de différencier les effets propres aux DHA de sa charge lipidique.

Nos résultats ont montré que les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA présentaient une meilleure tolérance en glucose et ne présentaient pas d'hyperinsulinémie. En revanche, les mâles obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame étaient intolérants en glucose et présentaient une hyperinsulinémie. Dans des situations d'augmentation de l'insuline, l'accumulation des lipides dans le foie est favorisée, ce qui affecte potentiellement le développement de la NAFLD. Par ailleurs, nos résultats ont montré que la supplémentation maternelle en DHA protège contre le développement de la stéatose hépatique en empêchant l'accumulation des triglycérides hépatiques chez les descendants mâles obèses. La supplémentation maternelle en DHA a régulé négativement l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*, la synthèse des triglycérides et curieusement la β-oxydation. En revanche, nous avons observé une accumulation de triglycérides hépatiques induite par une augmentation de la lipogenèse *de novo* chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame. Ces résultats confortent notre hypothèse en montrant que le DHA joue un rôle spécifique dans la prévention de la stéatose hépatique. Nos observations concordent avec les résultats de l'étude de Jinghua Xu et ses collègues qui ont montré que le DHA inhibe l'activité de ChREBP en réduisant son abondance nucléaire suggérant un mécanisme spécifique par lequel le DHA peut diminuer la lipogenèse dans la NAFLD (215).

Cependant, aucune étude n'a à ce jour évalué l'effet des oméga-3 sur la régulation épigénétique dans la NAFLD. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés au mécanisme épigénétique par lequel le DHA module l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides hépatiques. La régulation de l'expression des gènes n'est pas seulement contrôlée par la machinerie transcriptionnelle mais est également soumise à une modulation

épigénétique telle que les modifications des histones. En effet, les histones sont d'importants vecteurs d'informations épigénétiques. La structure dynamique de la chromatine joue un rôle important dans la réplication de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes. La structure de la chromatine est régie par des modifications post-traductionnelles du noyau des histones à leurs extrémités N-terminales (228). Certaines de ces modifications post-traductionnelles ou marqueurs épigéniques, y compris l'acétylation et la phosphorylation sont réversibles et sont souvent associées à une augmentation de l'expression des gènes. D'autres modifications post-traductionnelles telles que la méthylation de la lysine sont souvent plus stables et participent au maintien épigénétique à long terme (229). Nous avons donc évalué l'effet de la supplémentation maternelle en DHA sur la régulation épigénétique. Nos résultats n'ont pas montré de changement de la méthylation de H3K9 ou de H3K27 impliquées dans la répression de la transcription ni de H3K4 ou de H3K4, elles-mêmes impliquées dans l'activation de la transcription chez les animaux de tous les groupes. Bien que ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA n'induit pas de modification des histones étudiées, cela n'indique pas que le DHA ne module pas la régulation épigénétique. C'est pourquoi d'autres études seront nécessaires afin d'approfondir les effets épigénétiques du DHA dans la NAFLD par d'autres modèles animaux.

Par ailleurs, nos résultats ont montré une hypertriglycéridémie chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA ou en huile de carthame. Ces résultats indiquent que la supplémentation maternelle en DHA ne peut pas contrecarrer l'accumulation des triglycérides dans la circulation chez la descendance obèse. Nos résultats ne sont pas en accord avec les études montrant que la supplémentation en DHA diminue les lipides plasmatiques chez les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires (230). Néanmoins, il est important de noter que nous avons examiné l'effet de la supplémentation maternelle en DHA et non l'effet d'une supplémentation directe en DHA. Par ailleurs, Il a été montré que le DHA régule le métabolisme des lipides hépatiques par plusieurs mécanismes qui peuvent être bénéfiques dans la NAFLD notamment la sécrétion des VLDL permettant de transporter et de distribuer les triglycérides aux tissus périphériques. Nos résultats corroborent cette hypothèse en montrant une augmentation des VLDL chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. On peut alors supposer que l'hypertriglycéridémie observée chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA s'explique par un export des triglycérides du foie vers la circulation. Bien que la supplémentation maternelle en DHA n'ait pas protégé les descendants mâles obèses

contre l'hypertriglycéridémie sanguine, l'ensemble de nos résultats met en évidence le rôle spécifique du DHA comme traitement potentiel contre la NAFLD.

Nous avons également voulu évaluer l'effet de la supplémentation maternelle en DHA sur les autres familles de lipides, pour cela nous avons quantifié les sphingolipides hépatiques par spectrométrie de masse chez les animaux mâles âgés de trois mois. Nos résultats n'ont pas montré d'augmentation des taux de céramides ou de sphingomyélines en réponse à un régime hypercalorique, comme décrit dans la littérature, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats ne concordent pas avec les données de la littérature montrant qu'une alimentation riche en sucres et en graisses est systématiquement liée à une augmentation des teneurs en céramides (231) (232). Cela pourrait s'expliquer par le régime hypercalorique utilisé dans notre étude. En revanche, nous avons constaté que la supplémentation maternelle en DHA, mais pas la supplémentation maternelle en huile de carthame, réduit les sphingomyélines hépatiques chez les descendants mâles obèses par rapport au groupe témoin. De façon similaire, les taux de céramides sont réduits chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Par ailleurs, il faut noter que les céramides sont principalement générés par la dégradation des sphingomyélines par les sphingomyélinases. Ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA inhibe la production des céramides hépatiques en réduisant la teneur totale en sphingomyélines, probablement en inhibant l'activité des sphingomyélinases (SMases). Nos résultats concordent avec les résultats de l'étude de Chia-Yang Lu et ses collègues qui ont montré que l'inhibition des céramides par le DHA passe par la réduction de l'activité des SMases (233). Bien que les mécanismes par lesquels le DHA inhibe la teneur en sphingomyélines n'aient pas entièrement compris, les effets anti-inflammatoires du DHA semblent être impliqués. Il a été montré qu'en présence d'un état inflammatoire, l'activité de la sphingomyélinase est stimulée ce qui entraine la production de céramides (234). En revanche, lorsque l'inflammation est inhibée, l'activité des sphingomyélinases est réduite.

Bien que nous n'ayons pas observé une inflammation chez les animaux obèses nés de mères supplémentés en solution saline probablement due au fait que nos animaux étaient à un stade précoce d'obésité, nos résultats avaient montré une inhibition de l'expression du gène *TLR 4* pro-inflammatoire chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Nos résultats concordent avec les données de la littérature montrant que le DHA est capable de réguler à la baisse l'inflammation médiée par le TLR4 (235). Par ailleurs, nous avons cherché

à comprendre le mécanisme par lequel le DHA inhibe l'expression du *TLR4*. Nous avons alors supposé que comme le TLR 4 est un récepteur transmembranaire, le DHA, reconnu pour ses propriétés de maintien de la fluidité membranaire (236), influe sur la fluidité membranaire altérant ainsi la signalisation du TLR4. Cependant, nos résultats n'ont pas montré de changements de la fluidité membranaire chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA. Les résultats obtenus n'ont pas confirmé notre hypothèse et suggèrent qu'un mécanisme autre que la fluidité membranaire est impliqué dans l'inhibition du TLR4 par le DHA. Par ailleurs, Joseph Cuschieri et ses collègues ont montré que l'association du TLR4 avec les radeaux lipidiques dépend de la SMase acide (237). L'ensemble de ces résultats suggère que la supplémentation maternelle en DHA inhibe la voie de la synthèse des céramides par l'hydrolyse des sphingomyélines et prévient l'inflammation chez les animaux obèses (**Figure 47**).

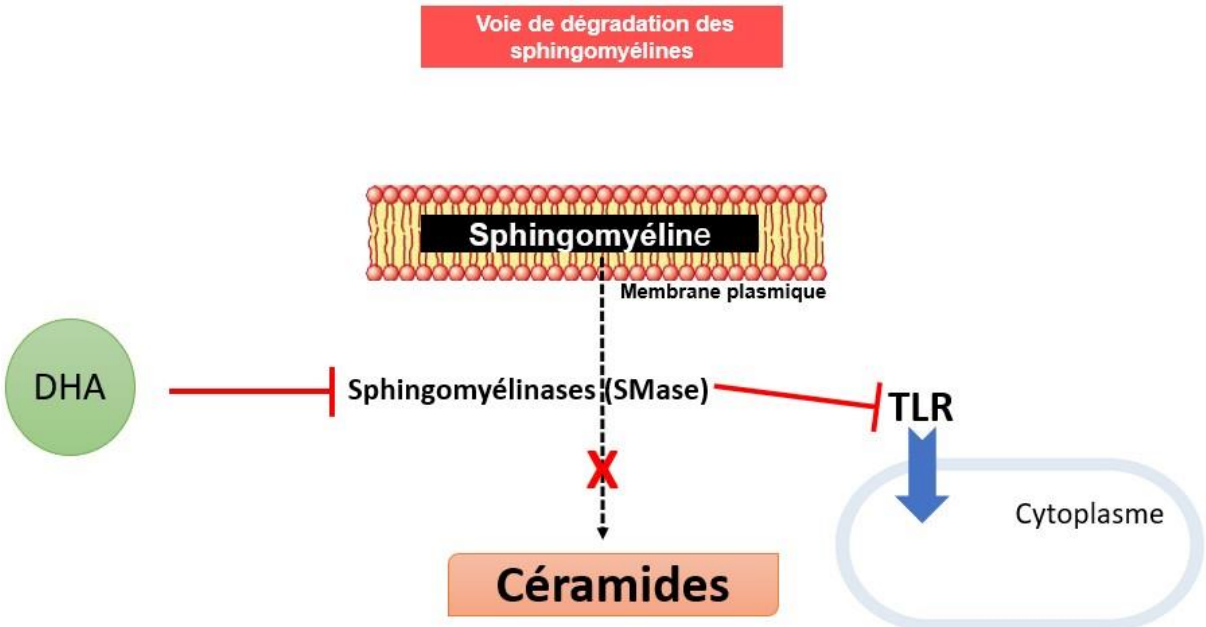


Figure 47 : Le rôle du DHA dans la voie de dégradation des sphingomyélines et l'inflammation.

Partie 3

“Effet de sexe dans les altérations cognitives et comportementales induites par l’obésité postnatale ou la dénutrition maternelle chez le rat et réversion par la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation.**”**

a) RÉSULTATS

1. Quel est l'effet de la supplémentation maternelle en DHA contre le déficit cognitif induit par l'obésité postnatale ?

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE CONTRE LES ALTERATIONS INDUITES PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EVOLUTION DU POIDS CORPOREL

L'accumulation de preuves démontre que l'obésité pourrait affecter négativement la fonction cognitive. Nous avons donc réalisé un test de reconnaissance d'objets chez les animaux obèses et contrôles afin d'évaluer la mémoire cognitive. Nous avons également cherché à savoir si la supplémentation maternelle en DHA peut améliorer le dysfonctionnement cognitif induit par l'obésité chez la descendance.

Nos résultats ont montré que les animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline n'avaient fait aucune distinction entre l'objet nouveau et l'objet familier en comparaison des animaux contrôles, marqué par un temps d'exploration identique des deux objets (**Figure 48A**). En revanche, les animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA présentaient un temps d'exploration du nouvel objet significativement supérieur au temps d'exploration de l'objet familier montrant une distinction entre le nouvel objet et l'objet familier (**Figure 48B**). Ces résultats démontrent que la supplémentation maternelle en DHA a corrigé l'altération de la mémoire cognitive induite par l'obésité.

Par ailleurs, nous avons observé que les femelles obèses nées de mères supplémentées en solution saline ne présentaient aucune altération cognitive et avaient passé plus de temps avec le nouvel objet que l'objet familier montrant une nette distinction entre les deux objets (**Figure 48C**). Curieusement, les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA avaient une altération de la mémoire cognitive et n'arrivaient pas à différencier le nouvel objet de

l'objet familier (**Figure 48D**). Ces observations démontrent un effet délétère de la supplémentation maternelle en DHA chez les femelles obèses.

En Résumé :

Nos résultats ont confirmé que l'obésité est un facteur aggravant du dysfonctionnement cognitif chez les mâles mais pas chez les femelles, montrant un effet de sexe. La supplémentation maternelle en DHA améliore les fonctions cognitives chez les mâles obèses. Curieusement, un effet délétère de la supplémentation maternelle en DHA a été observé chez les femelles obèses entrainant un déficit de la mémoire cognitive qui n'a pas été observé chez les femelles obèses nées de mères supplémentées en solution saline.

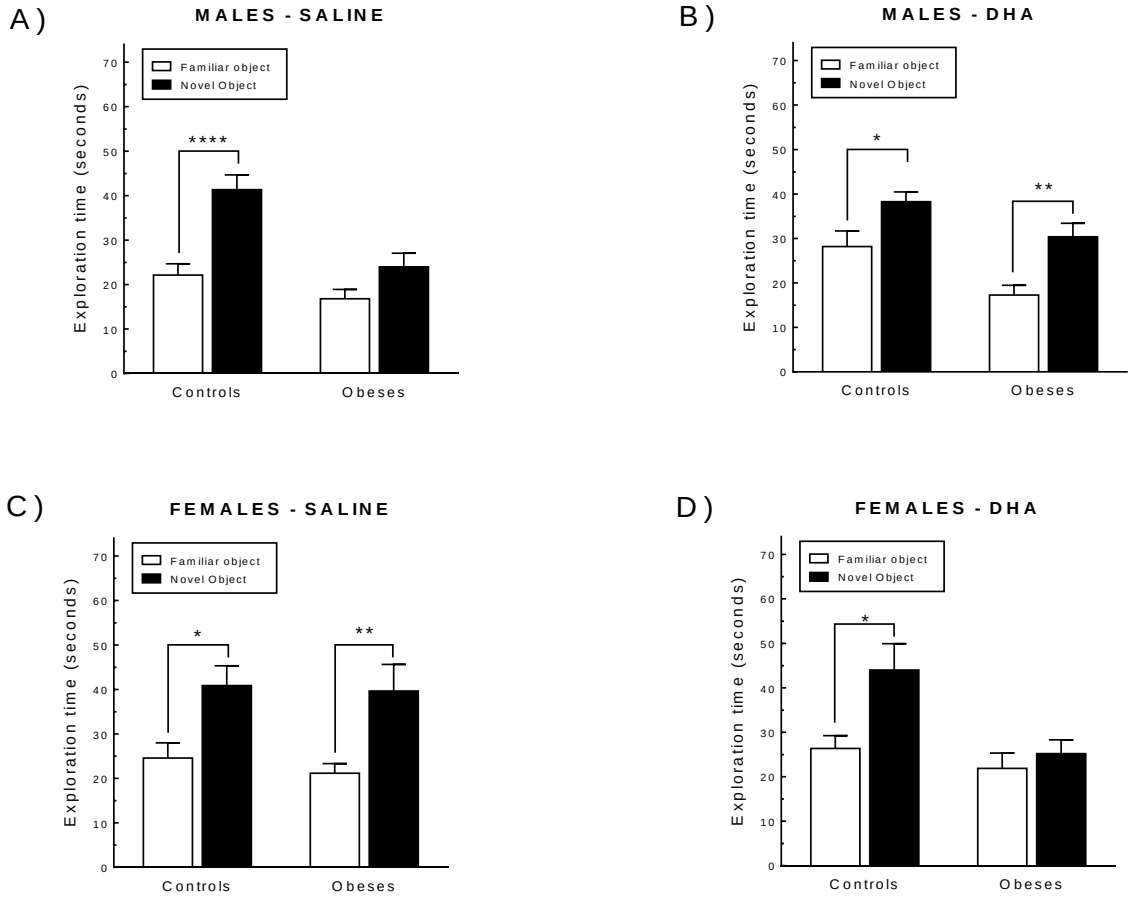


Figure 48: Effet de la supplémentation maternelle en DHA sur le déficit cognitif induit par l'obésité postnatale chez les animaux mâles et femelles âgés de 6 mois.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) ou 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium*. À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à huit petits. Les ratons ont été sevrés à 21 jours et divisés en deux sous-groupes pour être nourris *ad libitium* avec un régime standard (Saline standard diet et DHA standard diet) ou exposés à de la nourriture standard au même temps qu'à une alimentation riche en graisses et en sucre *ad libitium* (Saline fcHFHS et DHA fcHFHS). Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles Saline; mâles fcHFHS -Saline; mâles Contrôles-DHA; mâles fcHFHS-DHA; femelles Contrôles-Saline; femelles fcHFHS-Saline; femelles Contrôles-DHA ; femelles fcHFHS-DHA. A 6 mois, un test de reconnaissance de nouvel objet a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Temps d'exploration du nouvel objet *versus* Temps d'exploration de l'objet familier. ***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, ******** $p < 0,0001$.

2. Quel est l'effet de la supplémentation maternelle en DHA contre le retard de croissance postnatal induit par une dénutrition maternelle ?

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE CONTRE LES ALTERATIONS INDUITES PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EVOLUTION DU POIDS CORPOREL

Il est aujourd'hui bien connu que la santé future de l'enfant dépend fortement de l'environnement et du mode de vie en période prénatale. En outre, les connaissances actuelles montrent sans ambigüité que l'environnement intra-utérin auquel le fœtus est exposé impacte à long terme la santé durant l'enfance et jusqu'à la vie adulte : c'est le concept de programmation fœtale, mentionné pour la première fois il y a plus de 20 ans et introduit par l'épidémiologiste britannique David Barker. Cependant, l'alimentation maternelle est un facteur déterminant dans le développement intra-utérin de l'enfant. C'est dans ce sens que nous avons souhaité étudier l'effet d'une supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre les altérations induites par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles et femelles âgés de 6 mois. Pour ce faire, les mères étaient supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation en même temps qu'elles étaient sous régime hypocalorique.

Par ailleurs, rappelons que la dénutrition maternelle entraine une restriction de croissance intra-utérine activant des processus d'adaptation qui altèrent le bon développement du fœtus. Une fois que ces changements sont installés, ils prédisposent à un phénotype métabolique défavorable tout en long de la vie.

Les résultats de notre étude ont montré que le poids corporel était significativement plus bas chez la descendance mâle (**Figure 49A**) et femelle (**Figure 49B**) née des mères dénutries, de la naissance ($p < 0,01$) jusqu'à l'âge de 180 jours ($p < 0,01$), en comparaison des animaux nés des mères témoins, indépendamment de la supplémentation maternelle en solution saline ou en DHA.

En Résumé :

Ces premiers résultats ont confirmé que la dénutrition maternelle est un facteur aggravant de la réduction de la croissance de la progéniture indépendamment du sexe. Néanmoins, ces observations ont montré que la supplémentation maternelle en DHA ne peut pas contrecarrer le retard de croissance postnatal induit par la dénutrition maternelle chez la descendance.

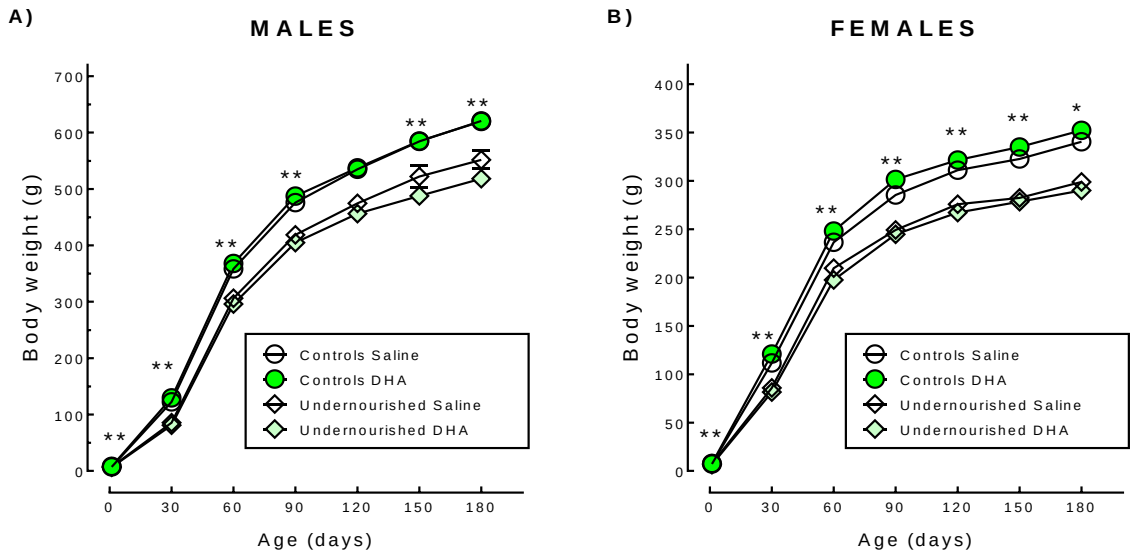


Figure 49 : Évolution du poids corporel des rats mâles et femelles nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentées en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles Saline; mâles Dénutris-Saline; mâles Contrôles-DHA; mâles Dénutris-DHA; femelles Contrôles-Saline; femelles Dénutries-Saline; femelles Contrôles-DHA ; femelles Dénutries-DHA. L'évolution du poids corporel a été suivie tous les trente jours. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. *Par soucis de clarté, seules les différences statistiques entre les animaux témoins et sous-alimentés nés de rats supplémentés en solution saline sont présentées. ** p <0,01 tel que déterminé par ANOVA à un facteur pour des mesures répétées*.

3. La supplémentation maternelle en DHA peut- elle corriger les altérations comportementales induites par une dénutrition maternelle ?

ROLE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE DANS LE DEVELOPPEMENT D'UNE ANXIETE INDUITE PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EFFET DE SEXE

La dénutrition maternelle entraine un ralentissement de la croissance intra-utérine pouvant se répercuter sur le développement cérébral. Nous avons ici évalué les effets délétères de la dénutrition maternelle sur le comportement des rats mâles et femelles âgés de 6 mois.

Nos résultats ont montré que la distance parcourue en 20 minutes par les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline était significativement plus élevée ($p < 0,05$) que celle parcourue par les rats mâles nés de mères sous régime contrôle et supplémentées en solution saline. Ces observations ont montré une activité locomotrice élevée qui reflète une forte anxiété induite par la dénutrition maternelle. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA a ramené les niveaux d'activité locomotrice à la normale chez les descendants mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA (**Figure 50A**). Ces résultats démontrent que la supplémentation maternelle en DHA peut probablement réduire l'anxiété induite par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles.

Aucune différence de distance parcourue entre les femelles nées de mères dénutries et les femelles nées de mères sous régime contrôle, quelle que soit la supplémentation maternelle en solution saline ou en DHA (**Figure 50B**), n'a été observée. Ces résultats montrent donc que la dénutrition maternelle n'entraine pas de changements de comportement chez la descendance femelle. Par conséquent, la supplémentation maternelle en DHA ne semble pas jouer de rôle important chez la descendance femelle.

En résumé :

La dénutrition maternelle induit une anxiété, inhibée rapidement par une supplémentation maternelle en DHA chez les descendants mâles nés de mères dénutries. En revanche, la dénutrition maternelle n'induit pas de comportement anxieux chez la descendance femelle, indiquant un effet de sexe.

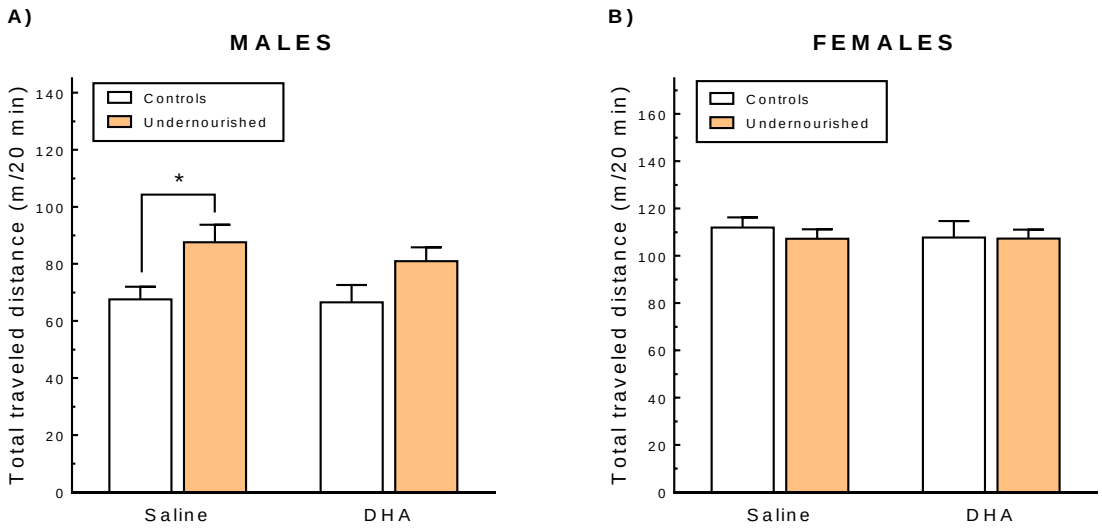


Figure 50 : Activité locomotrice spontanée dans une arène en plein champ de rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentées en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21

jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles-Saline (barres blanches); mâles Dénutris-Saline (barres jaunes); mâles Contrôles-DHA (barres blanches); mâles Dénutris-DHA (barres jaunes); femelles Contrôles-Saline (barres blanches); femelles Dénutries-Saline (barres jaunes); femelles Contrôles-DHA (barres blanches); femelles Dénutries-DHA (barres jaunes). A 6 mois, un test de l'activité locomotrice spontanée a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline contrôles *versus* Saline dénutries (un seul facteur d'analyse : le régime maternel) ; * $p < 0,05$.

IMPACT DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE CONTRE LE STRESS INDUIT PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EFFET DE SEXE

Nous avons ensuite étudié l'effet de la supplémentation maternelle en DHA contre le stress psychologique induit par la dénutrition maternelle. Pour ce faire, un test d' « *Elevated plus maze* », qui est un test plus poussé dans la mesure de l'anxiété et de la peur chez les rongeurs, a été effectué dans chaque groupe expérimental.

Les résultats de notre étude ont montré que les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline présentaient une augmentation du nombre d'entrées dans les bras fermés et une diminution du nombre d'entrées (**Figure 51A**) et du temps passé (**Figure 51C**) dans les bras ouverts du labyrinthe en comparaison des rats mâles nés de mères contrôles supplémentées en solution saline, mettant en évidence un état d'anxiété accrue et une peur des espaces ouverts.

En revanche, les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA présentaient une augmentation du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en comparaison des animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline. Par ailleurs, le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts ou fermés du labyrinthe des animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA étaient similaires à ceux des animaux contrôles nés de mères supplémentées en solution saline ou en DHA, montrant une récupération de l'état de stress psychologique. Ces observations confirment donc que la supplémentation maternelle en DHA a atténué le stress induit par une dénutrition maternelle.

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de changements de comportements chez les femelles des différents groupes (**Figure 51B** et **Figure 51D**). Ces résultats suggèrent donc que la dénutrition maternelle n'entraine pas de modification comportementale chez les femelles, mettant en évidence un effet de sexe.

Comme montré précédemment, nos observations ont mis en évidence une altération du comportement des descendants mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline par le développement d'une anxiété accrue.

En résumé :

La dénutrition maternelle induit un stress psychologique chez les animaux mâles mais pas chez les femelles. Nos résultats indiquent que la supplémentation maternelle en DHA a pu contrecarrer les effets anxiogènes induits par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles. Cela suggère que la supplémentation maternelle en DHA joue un rôle important dans la régulation des réponses au stress y compris les conditions d'anxiété psychologique induites par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles.

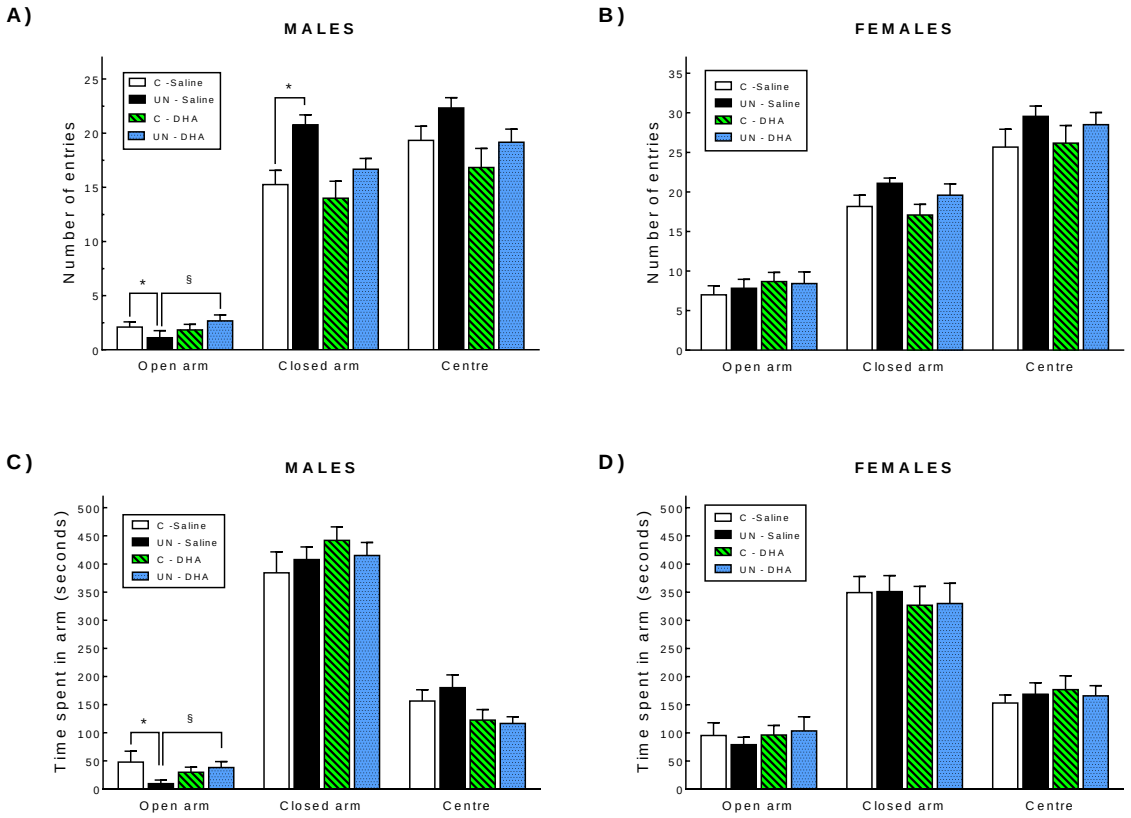


Figure 51 : Comportement anxieux dans le labyrinthe « *Elevated plus maze (EPM)* » des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation. *Les graphiques A) et B) correspondent au nombre d'entrées dans le bras ouvert, le bras fermé ou la zone centrale du labyrinthe pendant une période d'observation de 10 minutes. Les graphiques C) et D) correspondent au temps passé dans le bras ouvert, le bras fermé ou dans la zone centrale du labyrinthe.*

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles-Saline

(barres blanches); mâles Dénutris-Saline (barres noires); mâles Contrôles-DHA (barres vertes); mâles Dénutris-DHA (barres bleues); femelles Contrôles-Saline (barres blanches); femelles Dénutries-Saline (barres noires); femelles Contrôles-DHA (barres vertes); femelles Dénutries-DHA (barres bleues). A 6 mois, un test du labyrinthe « *Elevated plus maze* (EPM) » a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline contrôles *versus* Saline dénutries (un seul facteur d'analyse : le régime maternel) ; * $p < 0,05$. ANOVA bidirectionnelle (avec état nutritionnel maternel (témoin ou sous-alimenté) et supplémentation maternelle (solution saline ou DHA), comme facteurs) ; § $p < 0,05$.

EFFET DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE CONTRE LES ALTERATIONS DE LA STEROTYPIE INDUITES PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EFFET DE SEXE

Nous avons ensuite réalisé un test de comportement stéréotypique induit par l'apomorphine afin de mesurer la sensibilité pharmacologique chez les descendants mâles et femelles âgés de 6 mois. La stéréotypie induite par l'apomorphine est due à la stimulation des récepteurs à la dopamine et a été utilisée comme méthode pratique pour le dépistage *in vivo* des agonistes ou antagonistes de la dopamine et l'évaluation de l'activité dopaminergique. La stéréotypie se définit comme « *un comportement répétitif et invariant et sans but ou fonction apparents* » (238).

Nous avons observé que les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline présentaient un faible score de stéréotypie par rapport aux animaux mâles nés de mères sous régime contrôle et supplémentées en solution saline. Ces observations suggèrent que les animaux présentent un profil schizophrène marqué par une diminution des stéréotypies induite par l'apomorphine indiquant une faible réponse pharmacologique.

En revanche, aucune différence des scores des stéréotypies n'a pas été observée entre les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA et les animaux mâles nés de mères sous régime contrôle supplémentées en DHA (**Figure 52A**). Ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA rétablit la sensibilité pharmacologique et empêche le processus biologique conduisant aux troubles psychotiques. Par conséquent, la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation prévient le développement d'un comportement schizophrénique chez les animaux à risque.

Chez les femelles nées de mères dénutries et supplémentées en solution saline nous avons aussi observé une diminution des scores des stéréotypies qui n'est certes pas

statistiquement significative mais indiquant une faible réponse pharmacologique. Comme chez les mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation, la sensibilité pharmacologique est rétablie chez les femelles nées de mères dénutries et supplémentées en DHA, montrant un effet protecteur contre le développement d'un comportement schizophrénique (**Figure 52B**).

En résumé :

La dénutrition maternelle diminue les scores de stéréotypies s'expliquant par une faible sensibilité pharmacologique aux effets de l'apomorphine chez les descendants mâles indiquant un phénotype schizophrène absent chez la descendance femelle. La supplémentation maternelle en DHA rétablit la sensibilité pharmacologique chez les mâles nés de mères dénutries, montrant l'effet antipsychotique du DHA.

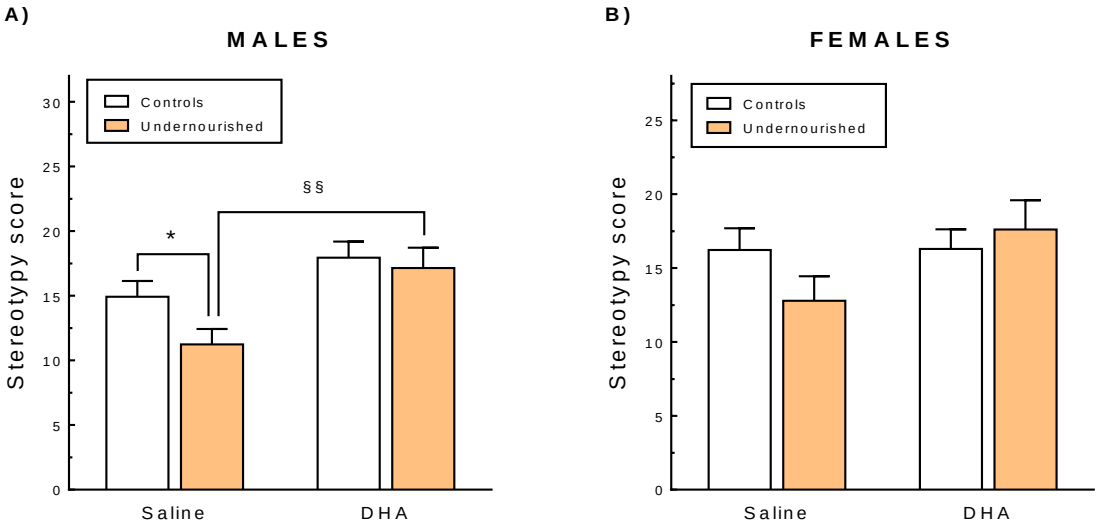


Figure 52 : Score total de stéréotypie des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles Saline (barres blanches); mâles Dénutris-Saline (barres jaunes); mâles Contrôles-DHA (barres blanches); mâles Dénutris-DHA (barres jaunes); femelles Contrôles-Saline (barres blanches); femelles Dénutries-Saline (barres jaunes); femelles Contrôles-DHA (barres blanches); femelles Dénutries-DHA (barres jaunes). A 6 mois, le score de stérétypie a été mésuré. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : Saline contrôles *versus* Saline dénutries (un seul facteur d'analyse : le régime maternel) ; * $p < 0,05$. ANOVA bidirectionnelle (avec état nutritionnel maternel (témoin ou sous-alimenté) et supplémentation maternelle (solution saline ou DHA), comme facteurs) ; §§ $p < 0,01$.

IMPACT DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA CHEZ LA DESCENDANCE CONTRE LES EFFETS DELETERES DE LA SOCIABILITE INDUITE PAR LA DENUTRITION MATERNELLE : EFFET DE SEXE

Nous avons également étudié les altérations du comportement social des rats que peut induire une dénutrition maternelle. Nos résultats ont montré que les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline avaient passé un temps similaire dans le compartiment vide et dans le compartiment où il y avait l'animal étranger (**Figure 53A**). Ces résultats ont démontré que la dénutrition maternelle a entrainé des altérations de la sociabilité chez les descendants mâles. En revanche, les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA avaient passé plus de temps dans le compartiment dans lequel il y avait l'animal étranger que dans le compartiment vide (**Figure 53B**). Ces observations suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA a aboli le déficit de socialisation induit par la dénutrition maternelle.

Cependant, les femelles nées de mères dénutries et supplémentées en solution saline ne présentaient pas d'altérations de la sociabilité, indiquant à nouveau un effet du sexe (**Figure 53C**). Par conséquent, la supplémentation maternelle ne semble pas avoir d'effet chez la descendance femelle (**Figure 53D**).

En résumé :

La dénutrition maternelle entraine des défauts de sociabilité chez les descendants mâles mais aucune différence d'interaction sociale chez la descendance femelle. La supplémentation maternelle en DHA prévient les altérations sociales induites par la dénutrition maternelle chez la descendance mâle.

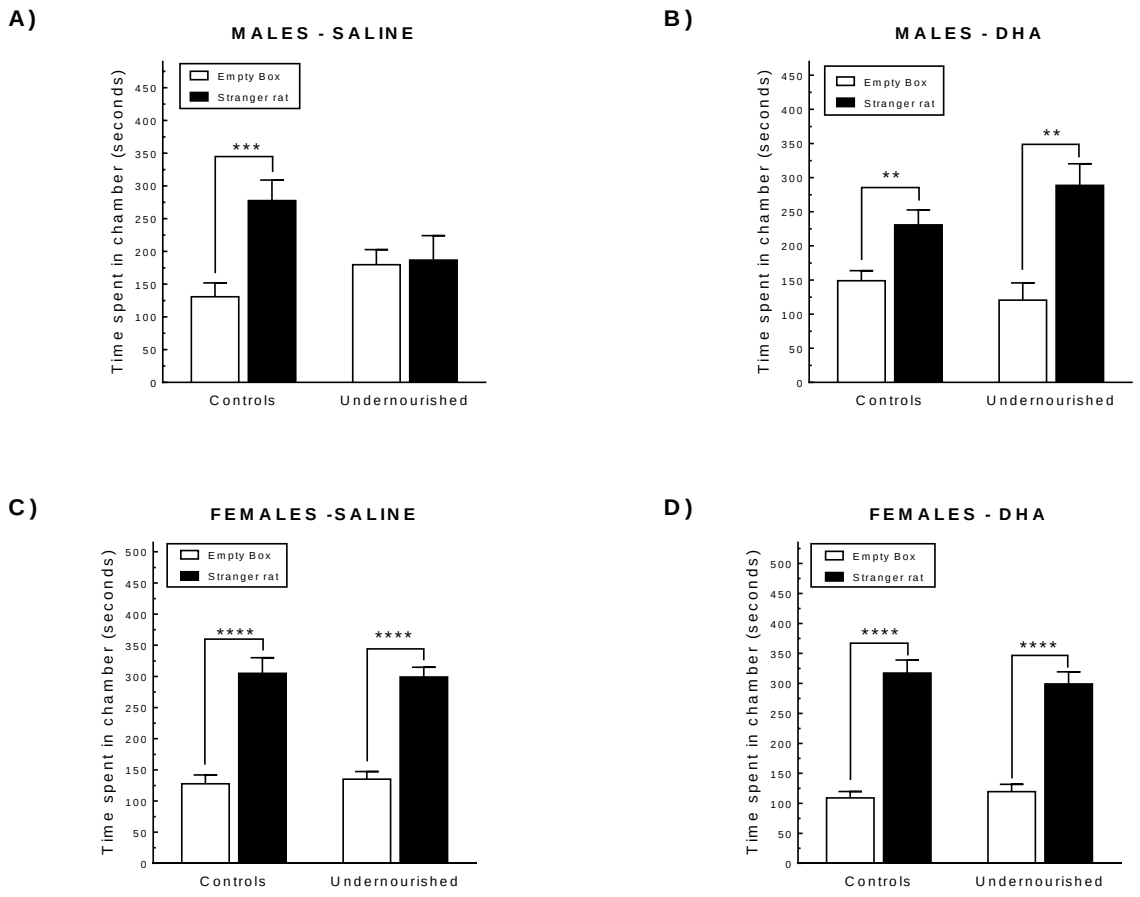


Figure 53 : Effet délétère de la dénutrition maternelle sur la sociabilité des rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) et sa réversion par la supplémentation maternelle en DHA. *Les figures A) et B) illustrent la sociabilité des rats mâles nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentées en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation. La préférence pour passer plus de temps dans le compartiment dans lequel il y a la même espèce par rapport à un compartiment qui est vide est un indicateur d'appartenance sociale et de sociabilité.*

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de

8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles-Saline; mâles Dénutris-Saline; mâles Contrôles-DHA; mâles Dénutris-DHA; femelles Contrôles-Saline; femelles Dénutries-Saline; femelles Contrôles-DHA; femelles Dénutries-DHA. A 6 mois, un test de sociabilité a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : temps passé dans le compartiment vide *versus* temps passé dans le compartiment avec l'animal étranger (un seul facteur d'analyse : le temps passé dans l'un ou l'autre compartiment) ; ** *p <0,01 ; *** p <0,001; **** p <0,0001*.

LA DENUTRITION MATERNELLE ALTERE-T-ELLE LA MEMOIRE SOCIALE ET QUEL EST L'IMPACT D'UNE SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN DHA ?

Les résultats précédents ayant montré que la dénutrition maternelle entrainait une altération de la sociabilité chez les descendants mâles, nous avons cherché à étudier son effet sur la mémoire sociale. La reconnaissance sociale est définie comme la capacité de distinguer un conspécifique d'un autre. L'hypothèse est que ce comportement est à la base de phénotypes comportementaux plus complexes tels que l'agression ou le lien social. Le principe de ce test de mémoire sociale repose sur la différenciation entre un animal « familier » et un animal « non familier ».

Nos résultats ont montré que le temps passé par les animaux mâles dans le compartiment où se trouvait l'animal « non familier » était supérieur au temps passé dans le compartiment où se trouvait l'animal « familier » (**Figure 54A** et **Figure 54B**), indiquant que la mémoire de reconnaissance sociale n'était pas altérée. De même, aucune altération de la mémoire sociale n'a été observée chez les femelles de tous les groupes (**Figure 54C** et **Figure 54D**).

Ces observations ont démontré que la dénutrition maternelle n'affecte pas la mémoire de reconnaissance sociale puisque tous les animaux, quel que soit l'état nutritionnel (témoin, sous-alimenté) et la supplémentation (solution saline, DHA) de leurs mères, montrent une nette préférence pour passer plus de temps dans un compartiment dans lequel se trouve un rat du même sexe qu'ils n'ont jamais rencontré auparavant que dans le compartiment dans lequel se trouve un rat familier.

En résumé :

La dénutrition maternelle n'altère pas la mémoire sociale des descendants bien que les résultats précédents aient montré une altération de la sociabilité chez les mâles. La supplémentation maternelle en DHA ne semble pas avoir d'effet chez les descendants.

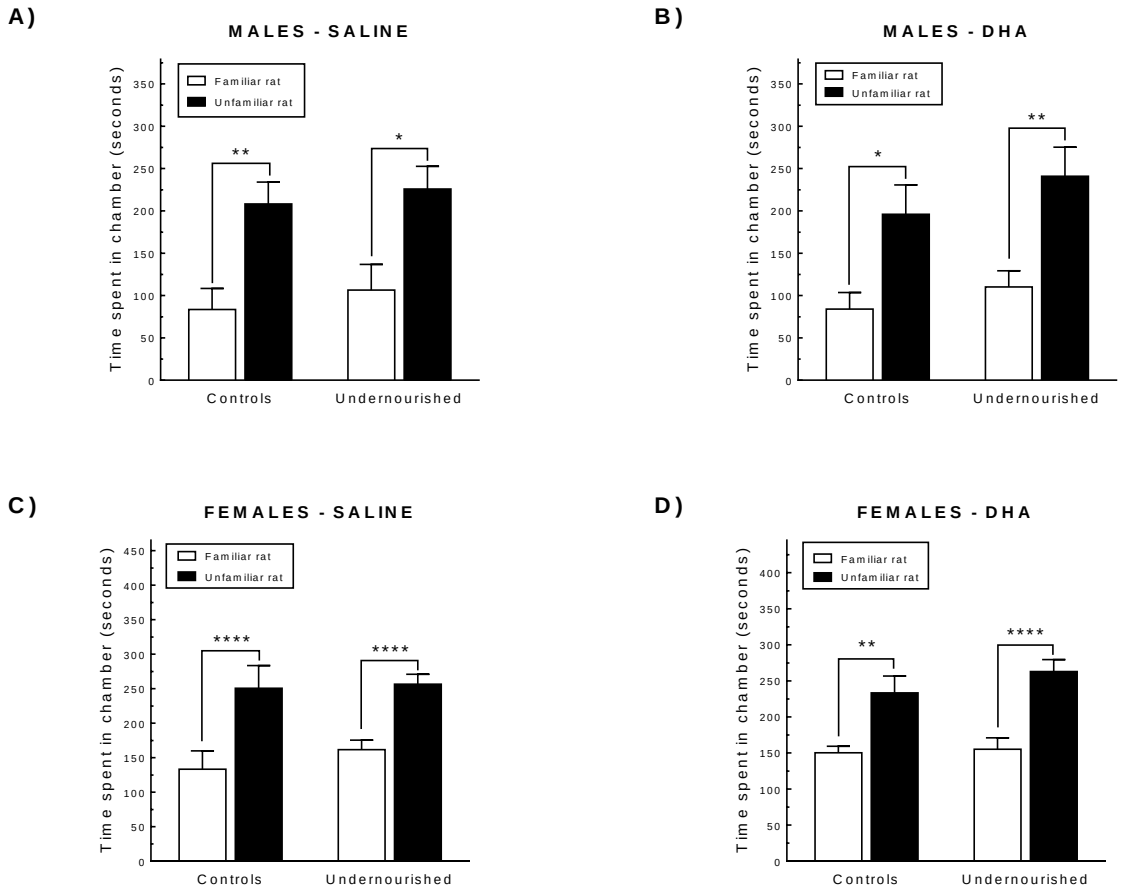


Figure 54 : Mémoire de reconnaissance sociale de rats mâles et femelles âgés de 180 jours (6 mois) nés de mères témoins ou à faible teneur en calories et supplémentés en solution saline ou en DHA pendant la gestation et la lactation.

Des rates Wistar de 3 mois ont été accouplées. Une fois gestantes, elles ont été hébergées individuellement et ont reçu du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation soit une dose quotidienne orale de 350 µL/kg d'un extrait d'huile de poisson (correspondant à 160 mg/kg de DHA et 23 mg/kg d'EPA) et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition) soit 350 µL/kg d'une solution saline comme placebo et nourries avec une alimentation standard *ad libitium* ou avec un régime à faible teneur en calories (=dénutrition). À la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 petits. Les ratons mâles et femelles ont été sevrés à 21 jours et nourris *ad libitium* avec un régime standard. Huit groupes expérimentaux constitués chacun de 8 animaux mâles ou femelles issus de 8 portées différentes ont ainsi été formés: mâles Contrôles-Saline; mâles Dénutris-Saline; mâles Contrôles-DHA; mâles Dénutris-DHA; femelles Contrôles-Saline; femelles Dénutries-Saline; femelles Contrôles-DHA; femelles Dénutries-DHA. A 6 mois, un test de sociabilité a été réalisé. N = 8 animaux par groupe expérimental. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test statistique utilisé : Test t de Student : temps passé avec le rat familier *versus* temps passé avec le rat étranger (un seul facteur d'analyse : le temps passé avec l'un ou l'autre animal) ; ** p <0,05 ; ** p <0,01 ; **** p <0,0001*.

b) DISCUSSION

L'état nutritionnel prénatal et postnatal sont des facteurs de modification clé de la croissance et du développement de tous les systèmes de l'organisme et ont été associés à la programmation métabolique et au développement des maladies mentales.

Un état d'obésité induit en postnatale peut être est un facteur de risque pour un certain nombre de problèmes de santé mentale notamment le dysfonctionnement cognitif, la démence et les maladies neurodégénératives.

Bien que les mécanismes physiopathologiques définitifs ne soient pas encore complétement définis, une dénutrition maternelle sévère pendant les périodes critiques de la vie altère le bon développement cérébral du fœtus et pourrait jouer un rôle important dans les troubles neurodéveloppementaux et psychiatriques. En outre, les effets délétères d'une dénutrition maternelle sur le développement du cerveau se produisent pendant les périodes vulnérables ou sensibles notamment en période de croissance cérébrale rapide plus connue sous le nom de « *poussée de croissance cérébrale* » qui survient du troisième trimestre de la grossesse jusqu'à 24 mois après la naissance chez l'Homme et du 15ème jour de la gestation à 21 jours après la naissance chez le rat (239). Plusieurs études ont mis en évidence qu'une dénutrition maternelle précoce est fortement associée à des effets délétères graves et permanents (240) (241). Par ailleurs, les nutriments régulent le bon développement du cerveau au cours de la vie fœtale et postnatale précoce, et un déficit en nutriments rend vulnérable le cerveau mais démontre également son degré de plasticité. Cette plasticité est essentielle à la protection cérébrale des influences extérieures et permet au cerveau de s'adapter aux influences environnementales (par exemple, la dénutrition maternelle). Cependant, cette adaptation dépend de la durée et de la gravité de l'état nutritionnel maternel.

Bien qu'il soit reconnu que les nutriments sont importants pour la croissance et le développement des cellules neuronales, certains semblent être plus importants que d'autres pendant les périodes tardives du fœtus et du nouveau-né. C'est le cas des lipides tels que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, en particulier le DHA.

Le but de notre étude était d'examiner l'effet préventif de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation sur les altérations du développement et du fonctionnement du cerveau induites par une obésité postnatale ou une dénutrition maternelle.

La mémoire cognitive des animaux obèses nés de mères supplémentées en solution saline ou en DHA a été examinée par un test de reconnaissance de nouvel objet. Les mâles obèses nés de mères supplémentées en solution saline ont montré une altération de la mémoire cognitive contrairement aux femelles obèses, suggérant un effet de sexe. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation a renversé le déficit cognitif induit par l'obésité chez les mâles. Ces observations suggèrent un effet préventif de la supplémentation maternelle en DHA contre le déficit cognitif induit par une obésité postnatale chez les mâles. Nos résultats sont en accord avec les données sur les rongeurs montrant que la supplémentation en DHA peut améliorer l'altération de la fonction cognitive (242) (243) (244) (245). Malgré la complexité de la fonction cognitive et les différences inter-espèces dans le moment de la poussée de croissance cérébrale, l'influence des facteurs nutritionnels, tels qu'une supplémentation maternelle en DHA, sur les propriétés fonctionnelles du système nerveux central peut affecter la capacité d'apprentissage cognitif (**Figure 55**). En effet, les fonctions physiologiques sous-jacentes impliquées dans la régulation de la mémoire cognitive dépendent de la fluidité membranaire. Or, les acides gras polyinsaturés tels que le DHA peuvent préserver les fonctions cognitives en maintenant l'intégrité structurelle de la membrane neuronale par leur capacité à moduler la fluidité membranaire, montrant l'importance d'un apport en DHA. Enfin, nos résultats du test de reconnaissance des nouveaux objets ont montré que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation prévient le déficit cognitif induit par le régime hypercalorique.

Curieusement, les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA ont montré un déficit de la mémoire cognitive qui n'était pas observée chez les femelles obèses nées de mères supplémentées en solution saline. Ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA aurait un effet délétère sur la mémoire cognitive des femelles obèses. Cette altération de la mémoire cognitive chez les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA pourrait être liée aux hormones sexuelles. Il a été démontré que les taux de DHA sont plus élevés chez les rats femelles adultes que chez les rats mâles du même âge (246). En outre, il a été montré que lorsque les femelles sont ovariectomisées, les taux de DHA diminuent dans les érythrocytes et dans l'hippocampe mais pas dans le cortex frontal, l'hypothalamus ou le mésencéphale,

indiquant que les œstrogènes peuvent affecter les niveaux de DHA dans certaines régions du cerveau (246). Par ailleurs, il est aujourd'hui bien connu que l'hippocampe est très important dans l'apprentissage et la mémoire. On suppose d'une part que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation a enrichi les taux de DHA initialement plus élevés dans l'hippocampe des femelles. Cela pourrait entrainer un effet inverse délétère, montrant qu'une supplémentation maternelle en DHA chez les femelles, a l'effet inverse de celui attendu dans l'hippocampe. Il serait donc intéressant de savoir si un apport en DHA est nécessaire et s'il existe un effet dépendant de la dose. Par ailleurs, la synthèse locale d'œstrogènes se produit dans l'hippocampe. L'œstrogène synthétisé module la plasticité liée à la mémoire. Il a été montré que l'administration d'œstrogènes pendant plusieurs années chez des patientes atteintes de la maladie d'Alzheimer après la ménopause s'est avérée très efficace pour améliorer leur capacité d'apprentissage et de mémoire (247) (248) (249). On suppose donc qu'il existe une interaction entre l'action du DHA et celle des œstrogènes dans l'hippocampe (**Figure 56**). Cependant, cette association entre la supplémentation maternelle en DHA et l'effet des hormones sexuelles seraient délétères chez les femelles adultes. En conséquence, il est nécessaire d'élucider les mécanismes d'action des œstrogènes et du DHA dans la restauration de la fonction cognitive au niveau de l'hippocampe.

Par ailleurs, des nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation entre la restriction de croissance intra-utérine et un faible poids à la naissance. Conformément à la littérature, nos résultats sur l'évolution de la croissance de la descendance née des mères dénutries ont montré un faible poids à la naissance et un retard de croissance en comparaison des animaux nés de mères contrôles, quelle que soit la supplémentation maternelle en solution saline ou en DHA. Ces résultats démontrent que la supplémentation maternelle en DHA n'a pas d'effet protecteur contre le retard de croissance induit par la dénutrition maternelle. S'il est bien établi que la dénutrition maternelle sévère pendant la gestation entraine un retard de croissance intra-utérin, peu d'études ont investigué l'effet d'une supplémentation maternelle en DHA contre le retard de croissance induit par une dénutrition maternelle. Nos résultats semblent néanmoins contredire une étude réalisée par Bagley et ses collègues montrant que la supplémentation en DHA est physiologiquement pertinente dans le retard de croissance (250). Des études animales ont aussi montré que l'apport en DHA était bénéfique pour la croissance de la descendance (251) (252). Des différences méthodologiques pourraient expliquer les

divergences de résultats entre ces études et la nôtre, notamment par la méthode d'induction d'un retard de croissance intra-utérin et la méthode de supplémentation en DHA.

En outre, la restriction de croissance due à la dénutrition maternelle est associée chez la progéniture à un déficit de la fonction mentale et du comportement. Bien que les effets du DHA sur le cerveau aient été largement étudiés, l'effet combiné d'une supplémentation maternelle en DHA et d'une restriction calorique maternelle n'a été que très peu investigué. Par ailleurs, nos résultats ont montré une activité locomotrice élevée chez les rats mâles nés de mères dénutries, indiquant une anxiété élevée. Ce comportement anxieux n'ayant pas été observé chez les femelles, nous pouvons conclure à un effet de sexe. Nos résultats sont soutenus par les études épidémiologiques sur les effets de l'exposition à la sous-nutrition *in utéro* pendant la famine hollandaise qui avaient montré une variation des phénotypes de maladies selon le sexe à l'âge adulte (253) (254). En outre, il a été démontré que les hommes exposés à la famine *in utero* avaient une diminution du volume cérébral suggérant une vulnérabilité masculine aux dommages neurologiques et comportementaux (220). De même, une quantité de preuves significatives avaient rapporté des résultats neurologiques indésirables plus graves chez les nourrissons de sexe masculin (255) (256).

Les effets du retard de croissance peuvent être inversés sur le rétablissement de bonnes conditions alimentaires maternelles. Nos résultats ont montré que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation normalise l'activité locomotrice spontanée des descendants mâles nés de mères dénutries, indiquant un effet anxiolytique de la supplémentation maternelle en DHA. Bien qu'il soit difficile d'établir un lien de causalité directe entre la supplémentation maternelle en DHA et la réduction de l'anxiété, ces résultats mettent tout de même en évidence que la supplémentation en DHA joue un rôle important dans le contrôle de certains comportements psychologiques tels que l'anxiété induite par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles nés de mères dénutries. Dans une étude similaire, il a été rapporté qu'il existe une corrélation inverse entre l'apport en DHA et les troubles de l'anxiété (257).

Il est aujourd'hui bien établi que la dénutrition maternelle imposée tôt dans la vie peut altérer certaines réponses dans les modèles de comportement de la descendance. Nous avons examiné les effets de la dénutrition maternelle sur le stress psychologique et la peur chez la descendance. Nos résultats ont montré que les rats mâles nés de mères soumis à un régime hypocalorique présentaient des réponses excessives au stress lors du test dans le labyrinthe

d'« *Elevated plus maze EPM* » marquées par une diminution significative à la fois du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en comparaison des animaux nés de mères contrôles. Ces données ont montré que la dénutrition maternelle précoce altère les comportements de la descendance entrainant un niveau d'anxiété et de peur élevé. En revanche, ces altérations comportementales induites par la dénutrition maternelle n'ont été observées que chez les mâles et non chez les femelles. Par ailleurs, ces tendances étaient renversées par la supplémentation maternelle en DHA puisque nos résultats ont aussi démontré que les rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA pendant la gestation et la lactation présentaient une fréquence plus élevée d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en comparaison des rats mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline, indiquant une atténuation du stress et de l'anxiété.

Dans la présente étude, la supplémentation maternelle en DHA a complètement inversé l'anxiété induite par la dénutrition maternelle chez les rats mâles adultes. Cette interprétation est cohérente avec les rapports précédents qui ont montré qu'un apport en DHA peut atténuer les réactions de stress (258) (259) (260) et les performances cognitives associées au stress ou à la peur (261) (262) (263). Ces études ont rapporté que le mécanisme de l'effet anti-stress du DHA peut être expliqué par son implication dans le système médié par le récepteur GABA. À l'appui de cette idée, des études animales ont montré que le stress est associé à un rapport phosphatidyléthanolamine oméga-3/oméga-6 plus élevé, suggérant ainsi un niveau inférieur en acides gras oméga-3 chez les animaux stressés (264). En condition de stress, l'acide arachidonique (AA) est libéré des membranes phospholipidiques vers le cytoplasme par l'activité cytoplasmique de la phospholipase et est transformé en endocannabinoïde qui à son tour inhibe la libération de GABA par les neurones pré-synaptiques (265) (266). Grâce à ce mécanisme, le stress peut augmenter l'activité neuronale excitatrice dans l'amygdale et augmenter l'anxiété. Par ailleurs, une supplémentation en oméga-3 augmente les niveaux de DHA dans les membranes phospholipidiques des neurones excitateurs qui à leur tour diminuent les niveaux d'AA dans le cytoplasme des neurones (262). Ainsi, la transmission inhibitrice pourrait être réduite dans l'amygdale induisant une diminution de l'anxiété chez les animaux stressés (262). Par ailleurs, rappelons que les effets bénéfiques du DHA contre les altérations comportementales ont été observés chez la descendance mâle montrant un effet « programmateur » du DHA. Cela suggère que les effets bénéfiques du DHA ont été transmis à la descendance *via* la mère, montrant l'importance de la consommation du DHA.

En outre, les résultats de notre étude suggèrent qu'en raison de ses effets anxiolytiques et anti-stress observés chez les animaux, la supplémentation en oméga-3 peut prévenir et améliorer les symptômes des sujets souffrant de troubles dépressifs et anxieux et qu'inversement, une alimentation pauvre en oméga-3 pourrait être un facteur de risque du développement des troubles dépressifs et anxieux. Par ailleurs, des études animales et des essais cliniques soutiennent l'utilisation de la supplémentation en oméga-3 dans les troubles liés au stress tels que les troubles dépressifs et anxieux. Il a été montré que les régimes riches en oméga-3 améliorent les effets anti-dépresseurs dans les modèles animaux de comportements dépressifs (267) (268). En outre, des études réalisées chez l'Homme avaient aussi rapporté que les régimes riches en oméga-3 améliorent les effets anti-dépresseurs chez les patients souffrant de troubles anxieux (145) et de dépression majeure (269) (270).

Les résultats du test de la stéréotypie en réponse à l'apomorphine ont également montré que les animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline avaient des scores de stéréotypie réduits en comparaison des animaux nés de mères contrôles, montrant une sensibilité pharmacologique réduite. Ces observations ont démontré le développement d'un comportement schizophrène chez ces animaux. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA a corrigé les scores stéréotypiques en réponse à l'apomorphine chez les rats mâles nés de mères dénutries. Cela suggère que le DHA rétablit la sensibilité pharmacologique mais présente aussi des effets antipsychotiques. En outre, la supplémentation maternelle en DHA prévient le développement du comportement schizophrène chez les animaux à risque nés de mères dénutries. Il a été rapporté que deux tiers des schizophrènes ne répondent pas de manière optimale aux médicaments antipsychotiques et par conséquent les investigations cliniques et non cliniques se sont concentrées sur des compléments présentant moins d'effets secondaires tels que les oméga-3. Ainsi, nos résultats corroborent les observations des études pré-cliniques qui ont suggéré des effets antipsychotiques des oméga-3 (271) (272). Les mécanismes d'action du DHA dans la physiopathologie de la schizophrénie ne sont cependant pas complétement connus. Il a néanmoins été montré que les oméga-3 pourraient empêcher l'augmentation induite par la kétamine de l'activité de l'acétylcholinestérase qui est associée aux symptômes de la schizophrénie (273).

Nous avons également examiné le comportement social de nos animaux et nos observations ont montré que les animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline présentaient une altération de l'interaction sociale. La supplémentation

maternelle a renversé cette altération du comportement social et les animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA ont montré une forte interaction sociale. Les résultats de notre étude démontrent donc que la supplémentation maternelle en DHA atténue le déficit social induit par la dénutrition maternelle. Nos résultats corroborent les rapports précédents montrant que la consommation des oméga-3 améliore le comportement social chez les rongeurs (274) (275).

Nous avons ensuite examiné la mémoire sociale des animaux. Bien qu'une altération du comportement social ait été observée chez les animaux mâles nés de mères dénutries et supplémentées en solution saline, nos résultats n'ont pas montré d'altération de la mémoire sociale. La dénutrition maternelle n'induit donc pas d'altération de la mémoire sociale chez les animaux de tous les groupes.

L'ensemble de ces données a montré que l'obésité et la dénutrition maternelle entrainent des altérations cognitives et le développement d'un comportement schizophrénique chez la descendance. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA a contribué à l'amélioration et au renversement de ces altérations cognitives et comportementales. Cette étude démontre non seulement les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA sur les fonctions cognitives mais présente aussi le DHA comme une alternative intéressante pour la prévention du développement d'une schizophrénie. Par ailleurs, le sexe joue un rôle central, en lien avec les hormones sexuelles, dans les altérations de la fonction cognitive et les changements comportementaux qui se sont manifestés uniquement chez les mâles. Il a été montré que les actions des œstrogènes ne se limitent pas aux tissus impliqués dans les fonctions de reproduction. En plus de son rôle d'hormone sexuelle, l'œstrogène joue un rôle dans la structure et la fonction du système nerveux. L'œstrogène a aussi d'importantes actions neuroprotectrices et est même proposé comme facteur préventif et protecteur dans les troubles liés à l'âge tels que la maladie d'Alzheimer (276). En outre, l'œstrogène joue un rôle important dans la fonction hippocampique en maintenant la potentialisation à long terme (PLT), en améliorant la croissance des neurites, en renforçant la plasticité synaptique et en améliorant les performances de la mémoire d'apprentissage spatial (277) (278) (276) (279). Les œstrogènes ont des effets similaires à ceux du DHA (263). Il serait donc intéressant de savoir s'il existe une interaction entre le DHA et les œstrogènes dans l'apprentissage des performances de la mémoire.

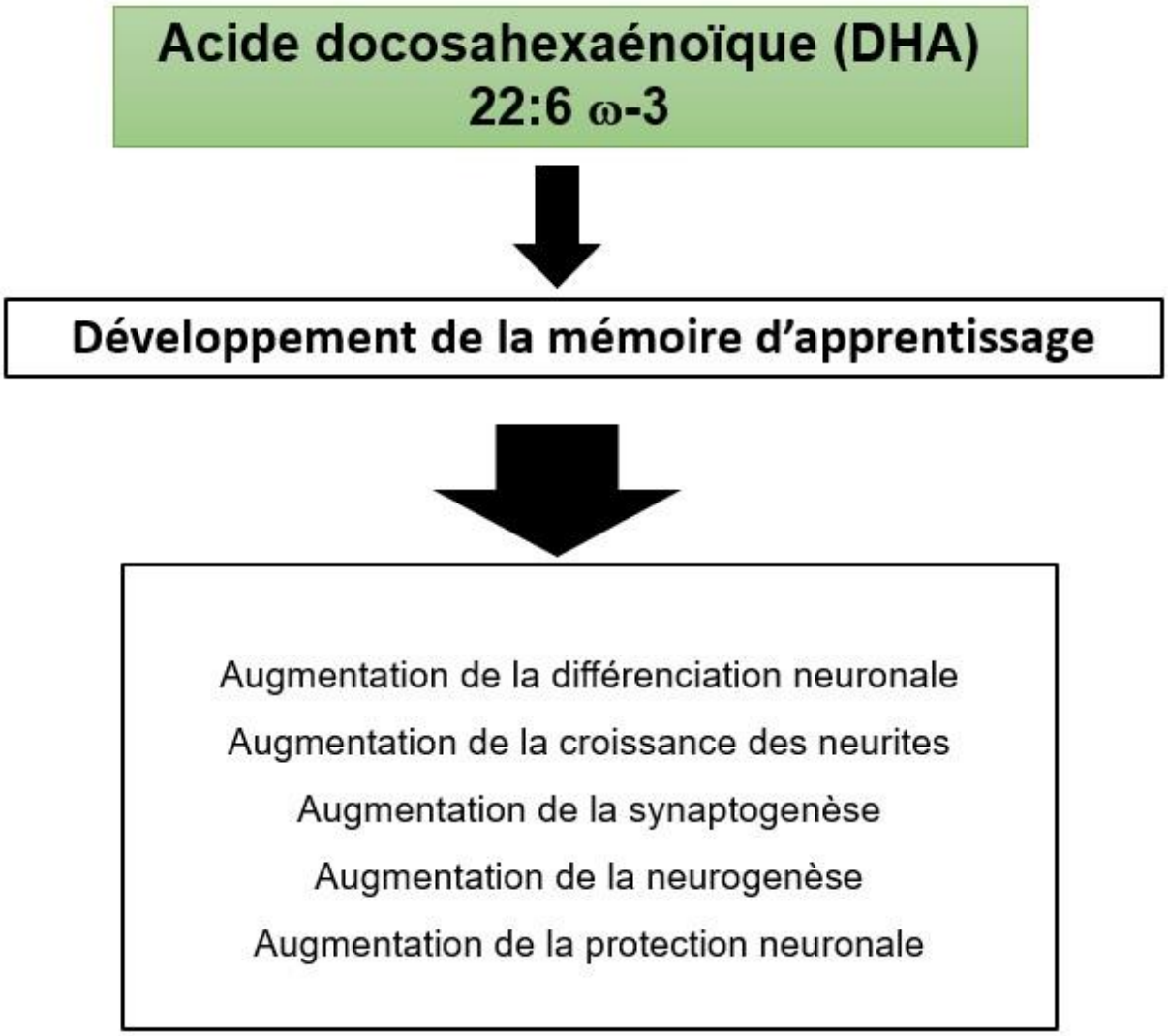


Figure 55 : Effets du DHA sur le développement de la mémoire d'apprentissage.

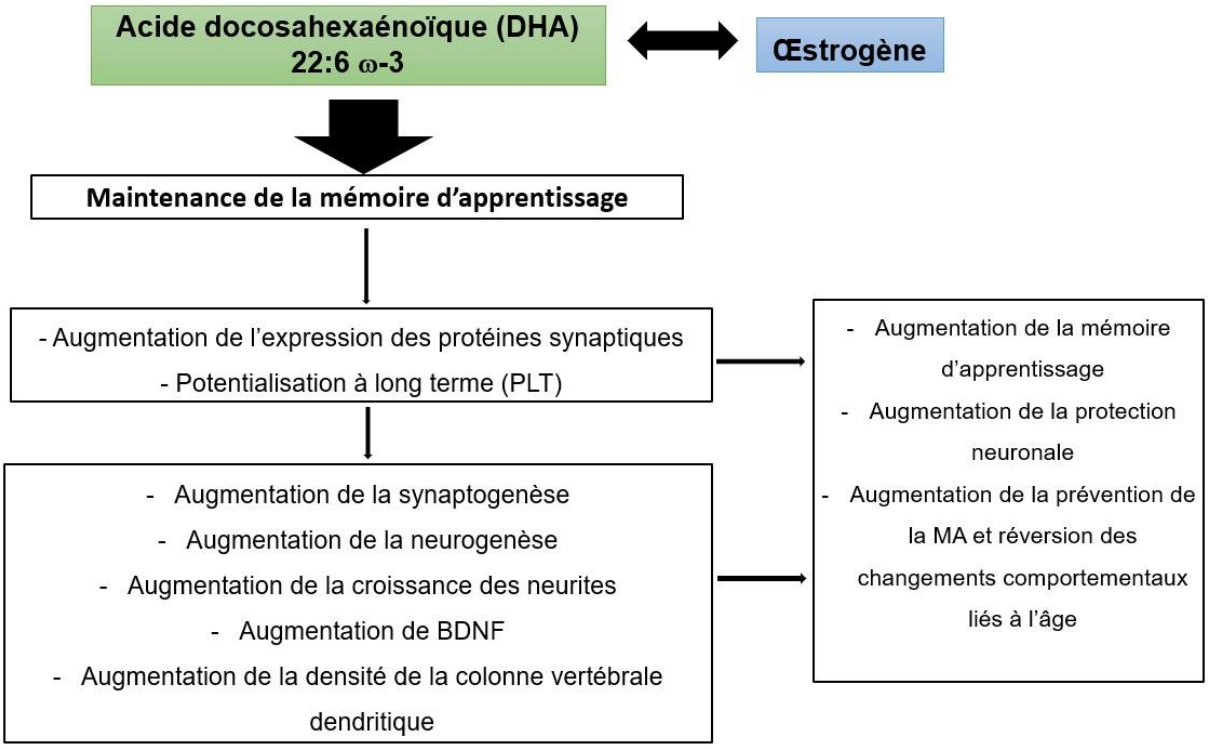


Figure 56 : Effets du DHA sur le maintien de la mémoire d'apprentissage. Il peut y avoir une interaction entre les effets du DHA et des œstrogènes (263). *BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau ; MA : Maladie d'Alzheimer*

VI. DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Impact de la supplémentation périnatale en DHA chez la mère sur le profil métabolique de la descendance

L'altération de la fonction et de la structure hépatique est l'une des caractéristiques prédominantes des maladies du foie. Par ailleurs, la NAFLD est une maladie multifactorielle avec une physiopathologie complexe entrainant diverses complications. Elle est étroitement liée à l'obésité et est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. En outre, la NAFLD est la conséquence d'une accumulation excessive de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes (> 0,5%) de façon indépendante d'une surconsommation d'alcool. Elle survient à la suite d'un déséquilibre entre l'accumulation hépatique de lipides provenant de la synthèse lipidique *de novo* et la clairance hépatique des lipides résultant de l'oxydation des acides gras libres et de l'excrétion des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Par ailleurs, un nombre croissant de preuves soutient le potentiel thérapeutique des acides gras polyinsaturés oméga-3, principalement le DHA, sur les maladies métaboliques. Alors que les enzymes clés impliquées dans la lipogenèse *de novo* sont régulées à la hausse dans la NAFLD (280) (281), les résultats de notre étude ont montré que la supplémentation maternelle en DHA réduit, chez les descendants mâles obèses âgés de trois mois, l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et la synthèse des triglycérides, contribuant à la réduction de l'accumulation des triglycérides hépatiques. Ces résultats démontrent que la supplémentation maternelle en DHA est capable de contrecarrer le développement de la stéatose hépatique induite par le régime chez les descendants mâles. Curieusement, l'expression des gènes impliqués dans la voie de la β-oxydation était réduite chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. En outre, nous avons observé une forte concentration de VLDL chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA, corrélée à une augmentation des triglycérides circulants. L'augmentation des triglycérides sériques observée chez les descendants mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA pourrait donc être due à une augmentation de la production hépatique de particules de VLDL et à une diminution de la clairance des VLDL. Nos résultats ne concordent pas avec les données de la littérature qui ont montré que la consommation d'AGPI augmente la β-oxydation des acides gras mitochondriaux et diminue la sécrétion des VLDL (217) (218) (219) (282). Cependant, il est important de noter que nos résultats concernent l'effet d'une supplémentation maternelle en DHA et non une

consommation directe des AGPI. Par ailleurs, l'ensemble de ces données démontrent l'effet préventif et thérapeutique de la supplémentation maternelle en DHA contre le développement de la stéatose chez la descendance. De plus, nos résultats ont montré que les animaux mâles âgés de trois mois et nés de mères supplémentées en DHA présentaient une meilleure tolérance au glucose. Ces animaux présentaient également une diminution de la sécrétion de l'insuline mais aucun changement en glucose sérique. Ces résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA améliore le métabolisme glucidique de façon indépendante de la sécrétion de l'insuline. En outre, l'expression des gènes clés de la voie de la glycolyse était réduite chez les descendants obèses de mères supplémentées en DHA. Ces résultats démontrent que la supplémentation maternelle en DHA est capable de moduler et d'améliorer le métabolisme du glucose chez la descendance. L'ensemble de ces données met donc en évidence que la supplémentation maternelle en DHA joue un rôle déterminant dans l'intolérance au glucose et pourrait être efficace lors des premiers stades de la NAFLD.

Par ailleurs, afin d'attribuer les effets bénéfiques du DHA à ses propriétés spécifiques et non à sa charge lipidique, nous avons opposé les effets de la supplémentation maternelle en DHA (oméga-3) à une supplémentation maternelle en huile de carthame (oméga-6). Alors que les mâles obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame présentaient une augmentation des triglycérides hépatiques, les animaux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA présentaient une faible concentration des triglycérides hépatiques. En outre, les descendants mâles obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame présentaient une intolérance au glucose contrairement aux mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA. Comme discuté précédemment, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides et du glucose était réduite chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA alors que chez les mâles obèses nés de mères supplémentées en huile de carthame l'expression de ces gènes était fortement élevée. Ces données démontrent que les effets bénéfiques du DHA sont associés aux propriétés du DHA et non à sa charge lipidique. Enfin, l'ensemble de ces résultats illustre le rôle spécifique du DHA dans la stéatose hépatique et l'intolérance en glucose et consolide donc notre hypothèse.

Par ailleurs, la perturbation du métabolisme lipidique et glucidique peut-être véhiculée par des mécanismes épigénétiques (283) (284). Néanmoins, aucune étude épigénétique ne s'est intéressée à ce jour aux effets de la supplémentation maternelle en DHA contre les altérations métaboliques. C'est pourquoi nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes le DHA

module l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques de glucose et des triglycérides. La modulation épigénétique de l'expression des gènes, qui peut induire des changements phénotypiques, peut se produire en réponse à des modifications des histones. Nos résultats de l'analyse des modifications des histones impliqués dans l'activation ou la répression transcriptionnelle n'ont pas montré de changements chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des rats nés de mères supplémentées en huile de carthame. Bien que ces données n'aient pas permis de répondre à nos questions sur les effets épigénétiques de la supplémentation maternelle en DHA chez la descendance, il est certain que les effets protecteurs de la supplémentation maternelle en DHA contre les perturbations du métabolisme lipidique sont véhiculés par des mécanismes épigénétiques, pouvant expliquer le potentiel thérapeutique de cette supplémentation. En outre, les modifications épigénétiques sont connues pour être impliquées dans le métabolisme des lipides hépatiques, la résistance à l'insuline et le dysfonctionnement mitochondrial qui sont tous impliqués dans le développement et la progression de la NAFLD. Ainsi, l'approfondissement des recherches sur les effets épigénétiques d'une supplémentation en DHA est susceptible d'entrainer des avancées majeures dans l'élucidation des mécanismes d'action du DHA dans le traitement de la NAFLD.

De surcroît, il est aujourd'hui bien établi qu'il existe des différences de sexe et d'âge dans la programmation métabolique (285). Nous nous sommes donc intéressés aux effets programmateurs de la supplémentation maternelle en DHA en fonction du sexe et sur le long terme, chez les animaux âgés de six mois. Nous avons ainsi pu démontrer que l'effet préventif et thérapeutique de la supplémentation maternelle en DHA contre la progression de la stéatose hépatique se perpétue sur le long terme et de façon indépendante du sexe puisque nous avons observé une diminution des triglycérides hépatiques chez les animaux mâles et femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA. Ces résultats appuient l'importance d'un apport en DHA pendant la grossesse et l'allaitement.

Afin d'élargir les effets de la supplémentation maternelle sur le métabolisme de la descendance, nous avons réalisé une analyse ciblée par spectrométrie de masse en s'intéressant principalement à la famille des sphingolipides. Ces derniers constituent une classe distincte de lipides de plus en plus reconnus comme entités métaboliquement actives impliquées dans de nombreux processus biologiques. Ces dernières années, les sphingolipides ont reçu une attention particulièrement croissante pour leur rôle dans les pathologies métaboliques (286) (287). Nos résultats ont montré une réduction des concentrations hépatiques de la totalité des

espèces de sphingomyélines et de céramides quantifiées chez les descendants mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA. Par ailleurs, rappelons que la synthèse des céramides se produit *via* trois voies : 1) la voie de synthèse *de novo* qui se produit dans le réticulum endoplasmique et utilisant comme précurseur le palmitate et la sérine, 2) la voie de recyclage à partir des sphingolipides dans les lysosomes, et 3) la voie de la dégradation de la sphingomyéline par des sphingomyélinases au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats suggèrent que la supplémentation maternelle en DHA inhibe cette dernière voie de synthèse des céramides à partir des sphingomyélines. Par ailleurs, la réduction des céramides est corrélée positivement à l'amélioration des maladies cardiovasculaires (288) (289) (290). En outre, il a été montré que le rôle des céramides en tant que médiateurs de l'inflammation peut avoir des implications importantes pour une large gamme de maladies dont lesquelles l'inflammation est un élément central de la pathogenèse. Dans ce sens, nous avons cherché à savoir s'il existe un lien entre cette réduction des céramides hépatiques, chez les descendants mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA, et l'inflammation au niveau du foie. Nos résultats ont montré une réduction de l'expression hépatique du *TLR4*, pro-inflammatoire, chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Cela suggère que la supplémentation maternelle en DHA empêche le développement d'une inflammation au niveau du foie en réponse à un régime hypercalorique. Afin, d'expliquer les mécanismes par lesquels la supplémentation maternelle en DHA inhibe l'expression du *TLR4*, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le DHA modifie la fluidité membranaire et réduit l'activité du TLR4, qui est un récepteur membranaire. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée car les résultats de l'analyse de la fluidité membranaire n'ont pas montré de changements de fluidité membranaire chez les animaux nés de mères supplémentées en DHA en comparaison des animaux nés de mères contrôles. En revanche, nous pouvons supposer qu'il existe un lien entre la réduction des concentrations hépatiques des sphingolipides et l'inhibition de l'expression hépatique de *TLR4* chez les animaux obèses nés de mères supplémentées en DHA. Il a été montré que l'association du TLR4 avec les radeaux lipidiques qui servent de plateforme pour l'initiation de l'inflammation médiée par le TLR 4, dépend de la sphingomyélinase (237). Or, nous avons démontré que la supplémentation maternelle en DHA réduit les sphingomyélines et par conséquent la production des céramides. On pourrait alors supposer que le DHA inhibe l'action de la sphingomyélinase qui réalise le clivage des sphingomyélines en céramides. En outre, comme décrit précédemment la sphingomyélinase est nécessaire dans l'activation du TLR 4. Ainsi, ces observations prises ensemble nous amènent à conclure que la supplémentation

maternelle en DHA pourrait inhiber l'action de la sphingomyélinase avec pour conséquence l'inhibition du TLR 4 pro-inflammatoire. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir l'action du DHA sur les sphingomyélinases et appuyer nos résultats.

Impact de la supplémentation périnatale en DHA chez la mère sur le comportement et la cognition de la descendance.

Au cours du dernier trimestre de la vie fœtale et les deux premières années de l'enfance, le cerveau subit une période de croissance dite « *poussée de croissance du cerveau* ». Une insuffisance nutritionnelle pendant cette période peut compromettre la fonction cérébrale. Le DHA est un nutriment nécessaire pour le développement des systèmes neuronaux sensoriels, perceptuels et cognitifs pendant la poussée cérébrale. Les neurones forment continuellement des axones et des extensions dendritiques avec les membranes cellulaires. Néanmoins, la membrane en croissance doit être relativement fluide et le DHA est l'élément le plus fluidifiant des membranes cellulaires. Il a été montré que des rongeurs présentant des carences en oméga-3 induites expérimentalement présentaient des déficits de la structure rétinienne, du développement de l'acuité visuelle et des performances cognitives. Ainsi, le DHA est important pour le développement de la cognition et d'autres fonctions cérébrales. Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'une supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre les altérations des performances cognitives induites par un régime obésogène et une dénutrition maternelle. Nos résultats du test de reconnaissance des nouveaux objets ont montré que l'obésité induit une altération de la mémoire cognitive principalement chez les mâles. En revanche, les mâles obèses nés de mères supplémentées en DHA ne présentaient pas d'altération de la mémoire cognitive puisque le temps passé avec le nouvel objet était significativement supérieur au temps passé avec l'objet familier, montrant l'importance de la supplémentation maternelle en DHA contre l'altération de la mémoire cognitive. En revanche, chez les femelles nées de mères supplémentées en DHA, nous avons observé une altération de la mémoire cognitive, absente chez les femelles obèses nées de mères supplémentées en DHA.

Ces résultats indiquent que la supplémentation maternelle en DHA aurait un effet délétère chez les femelles. Ces données montrent des différences de sexe dans les effets de la supplémentation maternelle en DHA. Ces observations pourraient s'expliquer par l'action des hormones sexuelles. En effet, il a été montré dans la littérature que les œstrogènes modulent la plasticité liée à la mémoire et que l'administration d'œstrogènes chez des patientes souffrant d'Alzheimer après la ménopause est efficace et améliore leur capacité d'apprentissage et de mémoire (247) (248) (249). Ainsi, il est possible de supposer que les œstrogènes interagissent avec le DHA ce qui pourrait entrainer des effets délétères chez les femelles. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes d'action des œstrogènes et du DHA dans l'hippocampe.

Nous avons également évalué l'impact de la supplémentation maternelle en DHA contre le développement d'un comportement schizophrénique induit par une dénutrition maternelle chez la descendance. Nos résultats ont montré une anxiété accrue manifestée par une forte activité locomotrice spontanée uniquement chez les mâles nés de mères dénutries. En revanche, les mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA n'étaient pas anxieux, montrant que la supplémentation maternelle en DHA empêche l'anxiété induite par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles. En outre, l'analyse des résultats du labyrinthe « *Elevated plus maze* » a montré que les rats mâles nés de mères dénutries présentaient un état de peur élevé qui s'explique par le temps passé et le nombre d'entrées dans les compartiments clos significativement supérieurs au temps passé et les nombres d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en comparaison des mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA. Ces résultats ont démontré les effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA contre le développement d'une anxiété et d'une peur induit par la dénutrition maternelle chez les mâles. Par ailleurs, les résultats du test de stéréotypie en réponse à l'apomorphine ont également montré un faible score de stéréotypie uniquement chez les mâles nés de mères dénutries, montrant une sensibilité pharmacologique réduite. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA a permis de rétablir cette sensibilité pharmacologique puisque les mâles nés de mères dénutries et supplémentées en DHA présentaient des scores de stéréotypies similaires aux animaux mâles nés de mères contrôles. Ces résultats corroborent les études pré-cliniques qui ont suggéré les effets antipsychotiques des oméga-3 (271) (272). En outre, nous avons également évalué le comportement social des animaux et nos résultats ont montré une altération de la sociabilisation chez les mâles nés de mères dénutries. En revanche, la supplémentation

maternelle en DHA a protégé la descendance contre l'altération du comportement social induite par la dénutrition maternelle chez les descendants mâles. Par ailleurs, alors que la dénutrition maternelle entraine une altération du comportement social, elle n'altère pas la mémoire sociale car nos résultats ont montré que les rats mâles nés de mères dénutries étaient capables de différencier l'animal familier de l'animal étranger et avaient donc passé plus de temps avec l'animal étranger. L'ensemble de ces tests comportementaux a montré que la dénutrition maternelle entraine des altérations comportementales conduisant au développement d'un comportement schizophrénique chez les mâles uniquement, montrant des différences de sexe. En revanche, la supplémentation maternelle en DHA est capable de prévenir le développement de ces altérations comportementales et pourrait être une alternative pour la prévention du développement de la schizophrénie.

Enfin, l'ensemble de ces résultats conforte notre hypothèse et démontre les effets préventifs thérapeutiques de la supplémentation maternelle contre les altérations cognitives et comportementales induites par une obésité ou une dénutrition maternelle.

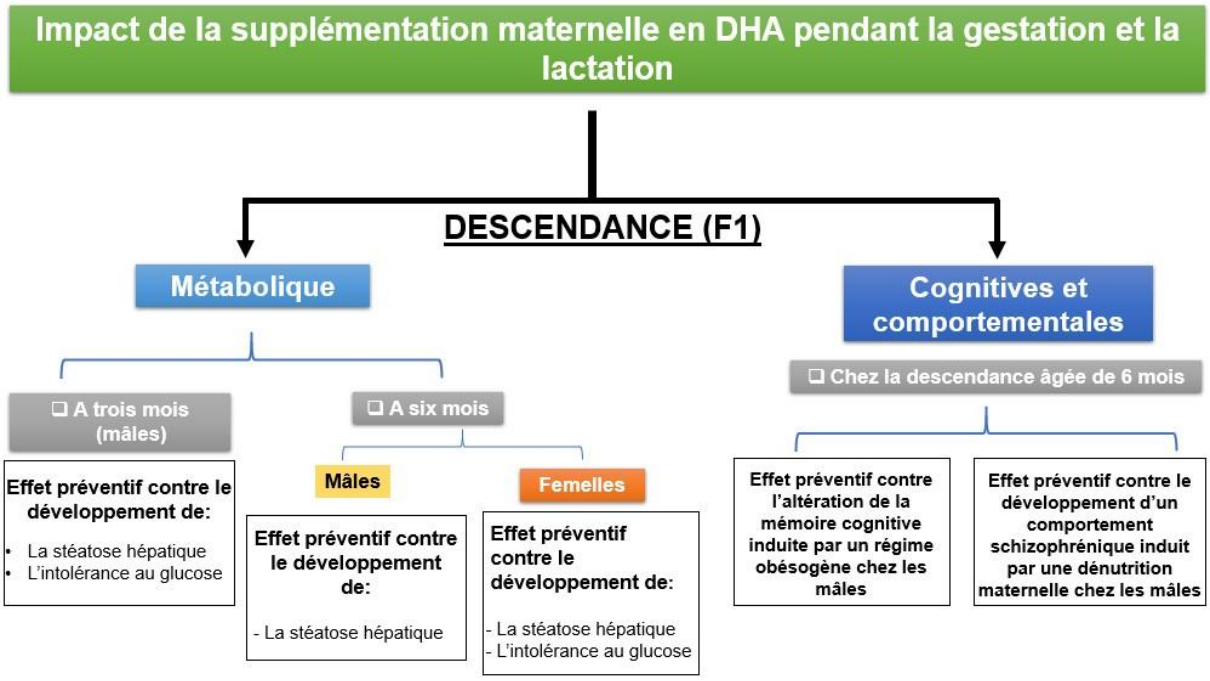


Figure 57 : Récapitulatif des effets bénéfiques de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre les altérations métaboliques et cognitives induites par un régime obésogène et une dénutrition maternelle. *Par soucis de gestion du nombre important d'animaux et du fait de la complexité du cycle œstral des femelles, nous avons fait le choix d'étudier uniquement les mâles dans notre série expérimentale des animaux de trois mois.*

VII. CONCLUSION

Les interventions visant à améliorer l'état nutritionnel de la mère et de l'enfant au cours des 1000 premiers jours de la vie sont des moyens efficaces pour améliorer le métabolisme et les performances cognitives de la progéniture à court et à long terme. Plusieurs nutriments, tels que les acides gras oméga-3, sont essentiels au développement du cerveau humain. Dans ce contexte, le DHA a été identifié comme étant essentiel pour le développement du système nerveux central chez l'Homme et l'animal. Par ailleurs, les réserves en DHA pour nourrissons sont établies dès le début *in utero* jusqu'à la première année de vie. Par conséquent, un approvisionnement maternel adéquat en DHA durant la grossesse et l'allaitement est essentiel pour établir des réserves adéquates pour la progéniture. C'est pourquoi mon travail de thèse est principalement axé sur les effets de la supplémentation maternelle en DHA pendant cette période périnatale. Malgré les nombreuses études soutenant les avantages de la supplémentation en DHA sur le fonctionnement cognitif et comportemental, il existe encore des divergences sur les effets observés, principalement à cause des méthodes de supplémentation et de la dose administrée. Les travaux de ma thèse ont permis de mettre en évidence les effets préventifs et thérapeutiques de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre le développement d'un comportement schizophrénique. Par ailleurs, à ce jour, il n'existe pas d'étude ayant évalué les effets d'une supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation contre les altérations métaboliques en tenant compte de l'âge et du sexe de la descendance. Notre étude est sur ce point novatrice puisque nos résultats ont démontré que la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation prévient le développement de la stéatose hépatique et de l'intolérance au glucose chez les descendants mâles âgés de 3 mois et que ces effets persistent sur le long terme (rats âgés de 6 mois) indépendamment du sexe de la descendance. Nous avons également pu mettre en évidence le rôle protecteur de la supplémentation maternelle en DHA contre l'accumulation des sphingolipides et de l'inflammation. Bien qu'à ce jour, les mécanismes d'action du DHA ne soient pas encore totalement élucidés, ces travaux ont permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche sur les effets de la supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation.

VIII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. D J Barker, P D Gluckman, K M Godfrey, J E Harding, J A Owens JSR. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. Lancet. 1993;938–41.

2. D J Barker CO. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet. 1986;1077–81.

3. Lieshout RJ Van, Krzeczkowski JE. Just DO (HaD) It ! Testing the clinical potential of the DOHaD hypothesis to prevent mental disorders using experimental study designs. J Dev Orig Heal Dis. 2016;7:565–73.

4. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement. In: American Journal of Clinical Nutrition [Internet]. Am J Clin Nutr; 2007 [cited 2021 Jul 1]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17284765/

5. Grantham-McGregor S, Baker-Henningham H. Review of the evidence linking protein and energy to mental development. Public Health Nutr [Internet]. 2005 Oct [cited 2021 Jul 1];8(7a):1191–201. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16277829/

6. Tamura T, Goldenberg RL, Hou J, Johnston KE, Cliver SP, Ramey SL, et al. Cord serum ferritin concentrations and mental and psychomotor development of children at five years of age. J Pediatr [Internet]. 2002 [cited 2021 Jul 1];140(2):165–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11865266/

7. Marousez L, Lesage J, Eberlé D. Epigenetics: Linking early postnatal nutrition to obesity programming? Vol. 11, Nutrients. 2019.

8. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2017;960. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5

9. Rtveladze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM ari., Levy D, Melendez G, et al. Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. Public Health Nutr. 2014;17(1):233–9.

10. Organisation mondiale de la santé(OMS). Obésité et surpoids. 2020;http://wwwwhoint/newsro. Available from: om/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

11. Organisation mondiale de la santé (OMS). Les maladies non transmissibles. [Internet]. 2017. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/

12. Mohammed MS, Sendra S, Lloret J, Bosch I. Systems and WBANs for controlling obesity. J Healthc Eng. 2018;2018.

13. Ginter E S V. Becoming overweight: is there a health risk? ournal médical Bratislava, 115 (09), 527–531. 2014;

14. Nicolaidis S. Environment and obesity. Metabolism. 2019;100:1–5.

15. Rosenbaum M LR. Pathophysiology of childhood obesity. Adv Pediatr 35 73– 137. 1988;

16. Skelton JA, Irby MB, Grzywacz JG, Miller G. Etiologies of obesity in children: Nature and nurture. Pediatr Clin North Am. 2011;58(6):1333–54.

17. Crino M, Sacks G, Vandevijvere S, Swinburn B, Neal B. The Influence on Population Weight Gain and Obesity of the Macronutrient Composition and Energy Density of the Food Supply. Curr Obes Rep. 2015;4(1):1–10.

18. Baessler A, Hasinoff MJ, Fischer M, Reinhard W, Sonnenberg GE, Olivier M, et al. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. Diabetes. 2005;54(1):259–67.

19. Li S, Zhao JH, Luan J, Luben RN, Rodwell SA, Khaw KT, et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. Am J Clin Nutr. 2010;91(1):184–90.

20. Levin BE. Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. Brain Res [Internet]. 2010;1350:10–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.085

21. Kaushik P, Anderson JT. Obesity: Epigenetic aspects. Biomol Concepts. 2016;7(3):145–55.

22. Van Vliet-Ostaptchouk J V., Hofker MH, Van Der Schouw YT, Wijmenga C, Onland-Moret NC. Genetic variation in the hypothalamic pathways and its role on obesity. Obes Rev. 2009;10(6):593–609.

23. Karczewski J, Śledzińska E, Baturo A, Jończyk I, Maleszko A, Samborski P, et al. Obesity and inflammation. Eur Cytokine Netw. 2018;29(3):83–94.

24. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(3):847–50.

25. Ying W, Fu W, Lee YS, Olefsky JM. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β-cell abnormalities. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2020; Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0286-3

26. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. J Am Med Assoc. 2003;289(2):187–93.

27. Mandviwala T, Khalid U, Deswal A. Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? Curr Atheroscler Rep. 2016;18(5).

28. Stein CJ, Colditz GA. The Epidemic of Obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(May):2522–5.

29. Poirier P, Martin J, Marceau P, Biron S, Marceau S. Impact of bariatric surgery on cardiac structure, function and clinical manifestations in morbid obesity. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2004;2(2):193–201.

30. Factor R, Loss W, Lavie CJ, Milani R V, Ventura HO. Obesity and Cardiovascular Disease. J Am Coll Cardiol [Internet]. 2009;53(21):1925–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.068

31. Nakajima T, Fujioka S, Tokunaga K, Hirobe K, Matsuzawa Y, Tarui S. Noninvasive study of left ventricular performance in obese patients: Influence of duration of obesity. Circulation. 1985;71(3):481–6.

32. Abdullah A, Wolfe R, Stoelwinder JU, de Courten M, Stevenson C, Walls HL, et al. The number of years lived with obesity and the risk of all-cause and cause-specific mortality. Int J Epidemiol. 2011;40(4):985–96.

33. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. Gastroenterology. 2005;129(1):113–21.

34. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. Science (80-). 2011;332(6037):1519–23.

35. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two "Hits"? Gastroenterology. 1998;114(4 I):842–5.

36. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. Gastroenterology [Internet]. 2015;148(3):547–55. Available from: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.039

37. Jakobsen MU, Berentzen T, Sørensen TIA, Overvad K. Abdominal obesity and fatty liver. Epidemiol Rev. 2007;29(1):77–87.

38. Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C. The epidemiology of fatty liver. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004;16(11):1087–93.

39. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. Gastroenterology. 2001;121(1):91–100.

40. Fan JG, Jia JD, Li YM, Wang BY, Lu LG, Shi JP, et al. Guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Update 2010: (Published in Chinese on Chinese Journal of Hepatology 2010; 18:163-166) JG Fan etal. Diagnosis and management of NAFLD. J Dig Dis. 2011;12(1):38–44.

41. Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: A multicenter large retrospective study. J Gastroenterol. 2012;47(5):586–95.

42. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: Population based study. Ann Hepatol [Internet]. 2007;6(3):161–3. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31922-2

43. Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2007;25(8):883–9.

44. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2013;10(11):686–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2013.171

45. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: A global perspective. Semin Liver Dis. 2008;28(4):339–50.

46. Smith E, Hay P, Campbell L, Trollor JN. A review of the association between obesity and cognitive function across the lifespan: Implications for novel approaches to prevention and treatment. Obes Rev. 2011;12(9):740–55.

47. Maayan L, Hoogendoorn C, Sweat V, Convit A. Disinhibited eating in obese adolescents is associated with orbitofrontal volume reductions and executive dysfunction. Obesity [Internet]. 2011;19(7):1382–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.15/nature06264

48. Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. FASEB J. 2011;25(7):2167–79.

49. Spencer SJ, Korosi A, Layé S, Shukitt-Hale B, Barrientos RM. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. npj Sci Food [Internet]. 2017;1(1):1–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41538-017-0008-y

50. Holloway CJ, Cochlin LE, Emmanuel Y, Murray A, Codreanu I, Edwards LM, et al. A high-fat diet impairs cardiac high-energy phosphate metabolism and cognitive function in healthy human subjects. Am J Clin Nutr. 2011;93(4):748–55.

51. Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. Brain Behav Immun. 2014;40:9–17.

52. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? Neurosci Biobehav Rev [Internet]. 2013;37(10):2489–503. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.015

53. Louala S, Benyahia-Mostefaoui A, Lamri-Senhadji MY. La restriction énergétique réduit le stress oxydant de l'aorte et du cœur et corrige le risque athérogène chez le rat rendu obèse. Ann Cardiol Angeiol (Paris) [Internet]. 2013;62(3):155–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ancard.2013.04.005

54. Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. Curr Diab Rep. 2017;

55. Miyaki A, Maeda S, Yoshizawa M, Misono M, Saito Y, Sasai H, et al. Effect of Weight Reduction With Dietary Intervention on Arterial Distensibility and Endothelial Function in Obese Men. Angiology. 2015;1:351–7.

56. Shota Sasaki, Yukihito Higashi, Keigo Nakagawa MK, Kensuke Noma, Satoshi Sasaki, Keiko Hara HM, Chikara Goto, Tetsuya Oshima and KC. A low-calorie diet improves endothelium-dependent vasodilation in obese patients with essential hypertension. Am J Hypertens. 2002;302–9.

57. Chou S, Lee Y, Huang C, Wang Y, Yu H, Lau Y. Gender-specific effects of caloric restriction on the balance of vascular nitric oxide and superoxide radical. Cardiovasc Res. 2010;751–9.

58. Miller WC, Koceja DM, Hamilton EJ. A meta-analysis of the past 25 years of weight loss research using diet, exercise or diet plus exercise intervention. Int J Obes Relat Metab Disord [Internet]. 1997 Oct 18 [cited 2021 Apr 20];21(10):941–7. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1997307185

59. Garrow JS, Summerbell CD. Meta-analysis: effect of exercise, with or without dieting, on the body composition of overweight subjects. Eur J Clin Nutr [Internet]. 1995 Jan [cited 2021 Apr 20];49(1):1–10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7713045/

60. Ballor DL, Poehlman ET. Exercise-training enhances fat-free mass preservation during diet-induced weight loss: A meta-analytical finding. Int J Obes [Internet]. 1994 [cited 2021 Apr 20];18(1):35–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8130813/

61. Dubnov-raz G, Berry EM, Dubnov-raz G. Dietary Approaches to Obesity Address Correspondence to : 2010;488–98.

62. Paita M, Nocca D, Msika S, Basdevant A, Millat B, Fagot-campagna A. Current challenges in providing bariatric surgery in France. Medicine (Baltimore). 2016;0(October).

63. Schilling PL, Davis MM, Albanese CT, Dutta S, Morton J. National Trends in Adolescent Bariatric Surgical Procedures and Implications for Surgical Centers of Excellence. J Am Coll Surg. 2008;206(1):1–12.

64. Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk Factors 10 Years after Bariatric Surgery. N Engl J Med [Internet]. 2004 Dec 23;351(26):2683–93. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa035622

65. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. Diabetes Care. 2016;39(6):893–901.

66. Ribeiro-Parenti L, Jarry AC, Cavin JB, Willemetz A, Le Beyec J, Sannier A, et al. Bariatric surgery induces a new gastric mucosa phenotype with increased functional glucagon-like peptide-1 expressing cells. Nat Commun [Internet]. 2021;12(1):1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20301-1

67. Strauss RS, Bradley LJ, Brolin RE. Gastric bypass surgery in adolscents with morbid obesity. J Pediatr. 2001;138(4):499–504.

68. Inge TH, Courcoulas AP, Jenkins TM, Michalsky MP, Helmrath MA, Brandt ML, et al. Weight Loss and Health Status 3 Years after Bariatric Surgery in Adolescents. N Engl J Med [Internet]. 2016 Jan 14;374(2):113–23. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1506699

69. Dufour F, Champault G. Is bariatric surgery in adolescents appropriate? J Chir (Paris). 2009;146(1):24–9.

70. Simons-Morton DG, Obarzanek E, Cutler JA. Obesity research - Limitations of methods, measurements, and medications [Internet]. Vol. 295, Journal of the American Medical Association. 2006. p. 826–8. Available from: http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.295.7.826

71. BOULAMERYVELLY A, SIMON N, BRUGUEROLLE B. Particularités pharmacocinétiques chez le patient obèse. Réanimation [Internet]. 2006 Nov;15(6):427–32. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1624069306001423

72. Maddox A, Horowitz M, Wishart J, Collins P. Gastric and oesophageal emptying in obesity. Scand J Gastroenterol. 1989;24(5):593–8.

73. Cheymol G. Clinical Pharmacokinetics of Drugs in Obesity: An Update. Clin Pharmacokinet. 1993;25(2):103–14.

74. Cheymol G. Effects of obesity on pharmacokinetics: Implications for drug therapy. Clin Pharmacokinet. 2000;39(3):215–31.

75. Adams JP, Murphy PG. Obesity in anaesthesia and intensive care. Br J Anaesth. 2000;85(1):91–108.

76. Yanovski SZ, Yanovski JA. Long-term drug treatment for obesity: A systematic and clinical review. JAMA - J Am Med Assoc. 2014;311(1):74–86.

77. Davidson MH, Hauptman J, DiGirolamo M, Foreyt JP, Halsted CH, Heber D, et al. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: A randomized controlled trial. J Am Med Assoc. 1999;281(3):235–42.

78. Zavoral JH. Treatment with orlistat reduces cardiovascular risk in obese patients. J Hypertens. 1998;16(12 SUPPL.):2013–7.

79. Lindgarde F. The effect of orlistat body weight and coronary heart disease risk profile in obese patients: The swedish multimorbidity study. J Intern Med. 2000;248(3):245–54.

80. Finer N, James WPT, Kopelman PG, Lean MEJ, Williams G. One-year treatment of obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. Int J Obes. 2000;24(3):306–13.

81. Hanefeld M, Sachse G. The effects of orlistat on body weight and glycaemic control in overweight patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. Diabetes, Obes Metab. 2002;4(6):415–23.

82. Fidler MC, Sanchez M, Raether B, Weissman NJ, Smith SR, Shanahan WR, et al. A one-year randomized trial of lorcaserin for weight loss in obese and overweight adults: The BLOSSOM Trial. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(10):3067–77.

83. Smith SR, Weissman NJ, Anderson CM, Sanchez M, Chuang E, Stubbe S, et al. Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Lorcaserin for Weight Management. N Engl J Med. 2010;363(3):245–56.

84. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull [Internet]. 2001 [cited 2021 Jan 20];60:5–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11809615/

85. Ravelli ACJ, Van Der Meulen JHP, Michels RPJ, Osmond C, Barker DJP, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. Lancet. 1998;351(9097):173–7.

86. D J Barker. The fetal origins of adult hypertension. J Hypertens Suppl. 1992 Dec;10(7):S39-44., editor. 1992;24(2).

87. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. Reprod Toxicol. 2005;20(3):345–52.

88. St. Clair D, He L. Rates of Adult Schizophrenia Following of 1959-1961. Jama. 2005;294(5):557–62.

89. Hoek HW, Brown AS, Susser E. The Dutch Famine and schizophrenia spectrum disorders. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 1998;33(8):373–9.

90. Kyle UG, Pichard C. The Dutch Famine of 1944-1945: A pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006;9(4):388–94.

91. Battaglia, FC et Lubchenco L. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. J Pediatr 71(2), 159–163. 1967;7(2):159–63.

92. Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction–part 1. J Matern Neonatal Med. 2016;29(24):3977–87.

93. Lapillonne A, Kermorvant-Duchemin E. Le retard de croissance. Arch Pediatr. 2008;15(5):540–2.

94. Mondiale U-O-B. Retard de croissance de l 'enfant dans les pays en développement. 2009;7–12.

95. De Onis M, Blössner M, Villar J. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. In: European Journal of Clinical Nutrition [Internet]. 1998 [cited 2021 Mar 30]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9511014/

96. Majid Ezzati, Alan D. Lopez AR and CJLM. C omparative Q uantification of H ealth R isks G lobal and R egional B urden of D isease A ttributable to S elected M ajor R isk Factors. Who. 2004;1200.

97. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction–part 2. J Matern Neonatal Med. 2016;29(24):4037–48.

98. Barker DJP, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. Br Med J. 1993;306(6875):422–6.

99. Barker DJP, Godfrey KM, Osmond C, Bull A. The relation of fetal length, ponderal index and head circumference to blood pressure and the risk of hypertension in adult life. Paediatr Perinat Epidemiol. 1992;6(1):35–44.

100. Waaler HT. Waaler, H. T. (2009). Height. Weight and Mortality The Norwegian Experience. Acta Med Scand. 215(S679),.

101. Peck a M, Vågerö DH. Adult body height, self perceived health and mortality in the Swedish population. J Epidemiol Community Health. 1989;43(4):380–4.

102. Sørensen HT, Sabroe S, Rothman KJ, Gillman M, Steffensen FH, Fischer P, et al. Birth weight and length as predictors for adult height. Am J Epidemiol. 1999;149(8):726–9.

103. Hélène Delisle. [Foetal programming of nutrition-related chronic diseases] - PubMed [Internet]. Review Sante. 2002 [cited 2021 Mar 30]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11943639/

104. Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ. 1990;259–62.

105. Barker DJP, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. Br Med J. 1989;298(6673):564–7.

106. Sørensen HT, Sabroe S, Rothman KJ, Gillman M, Fischer P, Sørensen TIA. Relation between weight and length at birth and body mass index in young adulthood: Cohort study. Br Med J. 1997;315(7116):1137.

107. Seidman DS, Laor A, Gale R, Stevenson DK, Danon YL. A Longitudinal Study of Birth Weight and Being Overweight in Late Adolescence. Am J Dis Child [Internet]. 1991 [cited 2021 Mar 30];145(7):779–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2058611/

108. Reynolds RM, Phillips DIW. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. In: Hormone Research. 1998. p. 28–31.

109. Brügger B. Lipidomics: Analysis of the lipid composition of cells and Subcellular organelles by Electrospray ionization mass spectrometry. Annu Rev Biochem. 2014;83:79–98.

110. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: Coming to grips with lipid diversity. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2010;11(8):593–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrm2934

111. Khoury S, Canlet C, Lacroix MZ, Berdeaux O, Jouhet J, Bertrand-Michel J. Quantification of lipids: Model, reality, and compromise. Biomolecules. 2018;8(4):1–16.

112. Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. Nat Rev Neurosci. 2007;8(10):743–54.

113. Merrill AH. Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. Chem Rev [Internet]. 2011 Oct 12;111(10):6387–422. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr2002917

114. Borodzicz S, Czarzasta K, Kuch M, Cudnoch-Jedrzejewska A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. Lipids Health Dis [Internet]. 2015;14(1):1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0053-y

115. Ong WY, Herr DR, Farooqui T, Ling EA, Farooqui AA. Role of sphingomyelinases in neurological disorders. Expert Opin Ther Targets. 2015;19(12):1725–42.

116. Torretta E, Barbacini P, Al-Daghri NM, Gelfi C. Sphingolipids in obesity and correlated comorbidities: The contribution of gender, age and environment. Int J Mol Sci. 2019;20(23).

117. Jiang MC and X-C. Sphingomyelin and Its Role in Cellular Signaling. Adv Exp Med Biol. 2013;991:27–40.

118. D'Angelo G, Moorthi S, Luberto C. Role and Function of Sphingomyelin Biosynthesis in the Development of Cancer [Internet]. Vol. 140, Advances in Cancer Research. Elsevier Ltd; 2018. 61–96 p. Available from: https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.04.009

119. Van Der Luit AH, Budde M, Zerp S, Caan W, Klarenbeek JB, Verheij M, et al. Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts. Biochem J. 2007;401(2):541–9.

120. Zhiqiang Li, δ, Tiruneh K. Hailemariam, δ, Hongwen Zhou, Yan Li DCD, David A. Peakeϕ, Youyan Zhangϕ, Ming-Shang Kuoϕ, Guoqing Caoϕ and X-C, Jiang. Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2007;23(1):1–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf

121. Zhiqiang Li, Yifan Fan, Jing Liu, Yan Li, Chongmin Quan, Hai H. Bui, Ming-Shang Kuo, TaeSik Park, Guoqing Cao and X-CJ. Impact of Sphingomyelin Synthase 1 Deficiency on Sphingolipid Metabolism and Atherosclerosis in Mice. Arter Thromb Vasc Biol. 2012;23(1):1–7.

122. Mitsutake S, Zama K, Yokota H, Yoshida T, Tanaka M, Mitsui M, et al. Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. J Biol Chem. 2011;286(32):28544–55.

123. Ramos-Molina B, Castellano-Castillo D, Pastor O, Ocaña-Wilhelmi L, Fernández-García D, Romero-Gómez M, et al. A Pilot Study of Serum Sphingomyelin Dynamics in Subjects with Severe Obesity and Non-alcoholic Steatohepatitis after Sleeve Gastrectomy. Obes Surg [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2021 Feb 23];29(3):983–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30488259/

124. Zeidan YH, Hannun YA. The Acid Sphingomyelinase/Ceramide Pathway: Biomedical Significance and Mechanisms of Regulation. Curr Mol Med. 2010;10(5):454–66.

125. Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC, et al. 11β-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. J Exp Med. 2005;202(4):517–27.

126. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. J Biol Chem [Internet]. 2003;278(12):10297–303. Available from: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212307200

127. Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle from Obese Insulin-Resistant Humans. Diabetes. 2004;53(1):25–31.

128. Bikman BT, Guan Y, Shui G, Siddique MM, Holland WL, Kim JY, et al. Fenretinide prevents lipid-induced insulin resistance by blocking ceramide biosynthesis. J Biol Chem. 2012;287(21):17426–37.

129. Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. J Biol Chem [Internet]. 2004;279(35):36608–15. Available from: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406499200

130. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. Cell Metab. 2007;5(3):167–79.

131. Tan-Chen S, Bourron O, Hajduch É. Céramides, acteurs cruciaux dans le développement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Médecine/Sciences. 2020;36(5):497–503.

132. Ruiz-Lopez N, Haslam RP, Napier JA, Sayanova O. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. Plant J. 2014;77(2):198–208.

133. Mansour MP, Shrestha P, Belide S, Petrie JR, Nichols PD, Singh SP. Characterization of oilseed lipids from "DHA-producing Camelina sativa": A new transformed land plant containing long-chain omega-3 oils. Nutrients. 2014;6(2):776–89.

134. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: A question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. Lipids. 2003;38(4):323–41.

135. Cardoso C, Afonso C, Bandarra NM. Dietary DHA and health: Cognitive function ageing. Nutr Res Rev. 2016;29(2):281–94.

136. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid [Internet]. 1st ed. Vol. 65, Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc.; 2012. 211–222 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00013-5

137. Buckley JD, Howe PRC. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. Obes Rev. 2009;10(6):648–59.

138. Crawford MA, Broadhurst CL. The role of docosahexaenoic and the marine food web as determinants of evolution and hominid brain development: The challenge for human sustainability. Nutr Health. 2012;21(1):17–39.

139. Crawford MA. Cerebral evolution. Nutr Health. 2002;16(1):29–34.

140. Crawford M, Bloom M, C LB, Wf S, Galli C, Ghebremeskel K, et al. Evidence for the Unique Function of Docosahexaenoic Acid (DHA) During the Evolution of the Modern Hominid Brain. Lipids. 2000;34(3):39–47.

141. Cetin I, Alvino G, Cardellicchio M. Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. In: Journal of Physiology. 2009. p. 3441–51.

142. Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. Am J Clin Nutr. 1994;60(2):189–94.

143. Andlin-Sobocki P, Jönsson B, Olesen H-UW and J. Costs of disorders of the brain in Europe. Eur J Neurol. 2007;14(2).

144. Bazan NG, Eady TN, Khoutorova L, Atkins KD, Hong S, Lu Y, et al. Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. Exp Neurol. 2012;236(1):122–30.

145. Milte CM, Parletta N, Buckley JD, Coates AM, Young RM, Howe PRC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, cognition, and behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized controlled trial. Nutrition [Internet]. 2012;28(6):670–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.12.009

146. Zhang YP, Miao R, Li Q, Wu T, Ma F. Effects of DHA Supplementation on Hippocampal Volume and Cognitive Function in Older Adults with Mild Cognitive Impairment: A 12-Month Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. J Alzheimer's Dis. 2017;55(2):497–507.

147. Cole GM, Ma QL, Frautschy SA. Omega-3 fatty acids and dementia. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2009;81(2–3):213–21.

148. Mulder KA, Elango R, Innis SM. Fetal DHA inadequacy and the impact on child neurodevelopment: A follow-up of a randomised trial of maternal DHA supplementation in pregnancy. Br J Nutr. 2018;119(3):271–9.

149. Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. Pediatrics. 2003;111(1).

150. DeCherney A, Berkowitz G. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at YALE MEDICAL LIBRARY on July 23, 2013. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. N Engl J Med. 1982;306(7):424–6.

151. Mori TA, Woodman RJ. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. Curr Opin Clin Nutr Metab Care [Internet]. 2006;95–104. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16477172/

152. Conquer JA, Holub BJ. Effect of supplementation with different doses of DHA on the levels of circulating DHA as non-esterified fatty acid in subjects of Asian Indian background. J Lipid Res [Internet]. 1998 [cited 2021 Apr 6];39(2):286–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9507989/

153. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. Am J Clin Nutr. 2002;76(5):1007–15.

154. Nestel P, Shige H, Pomeroy S, Cehun M, Abbey M, Raederstorff D. The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. Am J Clin Nutr. 2002;76(2):326–30.

155. Capel F, Pinel A, Acquaviva C, Pitois E, Rigaudière J-P, Laillet B, et al. P155: Le DHA restore la sensibilité musculaire à l'insuline en inhibant l'activation de la PKC-theta par les céramides. Nutr Clin Métabolisme [Internet]. 2014;28:S149. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0985-0562(14)70797-6

156. Grimsgaard S, Bønaa KH, Hansen JB, Nordøy A. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. Am J Clin Nutr. 1997;66(3):649–59.

157. Ågren JJ, Hänninen O, Julkunen A, Fogelholm L, Vidgren H, Schwab U, et al. Fish diet, fish oil and docosahexaenoic acid rich oil lower fasting and postprandial plasma lipid levels. Eur J Clin Nutr [Internet]. 1996 [cited 2021 Apr 6];50(11):765–71. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8933125/

158. Conquer JA, Holub BJ. Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. J Nutr. 1996;126(12):3032–9.

159. Judge MP, Harel O, Lammi-Keefe CJ. A docosahexaenoic acid-functional food during pregnancy benefits infant visual acuity at four but not six months of age. Lipids. 2007;42(2):117–22.

160. S.E. C, J. C, B.J. G, K.M. G, D. M, J. Y, et al. DHA supplementation and pregnancy outcomes. Am J Clin Nutr [Internet]. 2013;97(4):808–15. Available from: http://ajcn.nutrition.org/content/97/4/808.full.pdf+html%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013219493

161. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. Cell. 2010;142(5):687–98.

162. Vemuri M, Kelley DS, Mackey BE, Rasooly R, Bartolini G. Docosahexaenoic acid (DHA) but not eicosapentaenoic acid (EPA) prevents trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA)-induced insulin resistance in mice. Metab Syndr Relat Disord. 2007;5(4):315–22.

163. Jump DB. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;1–12.

164. Yang J, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: Effects of omega-3 fatty acid supplementation. Nutrients. 2019;11(4):1–37.

165. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. Science (80-). 1998;282(5396):2085–8.

166. Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: Preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. J Lipid Res. 2003;44(3):479–86.

167. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, et al. Saturated Fatty Acid Activates but Polyunsaturated Fatty Acid Inhibits Toll-like Receptor 2 Dimerized with Toll-like Receptor 6 or 1. J Biol Chem. 2004;279(17):16971–9.

168. Wong SW, Kwon MJ, Choi AMK, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. J Biol Chem. 2009;284(40):27384–92.

169. S. CR, , Wooki Kim JRL and DNM. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2008;23(1):1–7.

170. Richard L. Bradley, FFolliott M. Fisher and EM-F. Dietary Fatty Acids Differentially Regulate Production of TNF-α and IL-10 by Murine 3T3-L1 Adipocytes. Obes (Silver Spring). 2008;176(1):139–48.

171. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, et al. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: Evidence for a PPAR-γ-dependent mechanism. Kidney Int. 2005;67(3):867–74.

172. Rogers LK, Valentine CJ, Keim SA. DHA supplementation: Current implications in pregnancy and childhood. Pharmacol Res. 2013;70(1):13–9.

173. Salam RA, Das JK, Bhutta ZA. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014;249–54.

174. Van Abeelen AFM, Elias SG, Bossuyt PMM, Grobbee DE, Van Der Schouw YT, Roseboom TJ, et al. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. Diabetes. 2012;61(9):2255–60.

175. De Rooij SR, Painter RC, Holleman F, Bossuyt PMM, Roseboom TJ. The metabolic syndrome in adults prenatally exposed to the Dutch famine. Am J Clin Nutr. 2007;86(4):1219–24.

176. Ekamper P, van Poppel F, Stein AD, Lumey LH. Independent and additive association of prenatal famine exposure and intermediary life conditions with adult mortality between age 18-63 years. Soc Sci Med [Internet]. 2014;119(October 1944):232–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.socscimed.2013.10.027

177. Dabelea D, Crume T. Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. Diabetes. 2011;60(7):1849–55.

178. OMS. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series number 894. Geneva: WHO, 2000. 2000. :Obesity: preventing and managing the global epidem.

179. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: Language, Society and Power An Introduction [Internet]. 2019. p. 69–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8994-2_4

180. Dong SM, Kim YG, Heo J, Ji MK, Cho JW, Kwak BS. A Novel Potential Atypical Antipsychotic Agent. Korean J Physiol Pharmacol. 2009;13:71–8.

181. Reavill C, Kettle A, Holland V, Riley G, Blackburn TP. Attenuation of haloperidol-induced catalepsy by a 5-HT 2C receptor antagonist. Br J Pharmacol. 1999;572–4.

182. Fleminger S, Rupniak NMJ, Jenner MDHP, Marsden CD. CHANGES IN APOMORPHINE-INDUCED STEREOTYPY AS A RESULT OF SUBACUTE NEUROLEPTIC TREATMENT CORRELATES WITH INCREASED D-2 RECEPTORS , BUT NOT WITH INCREASES IN D-l RECEPTORS. Biochem Pharmacol. 1983;32(19).

183. Lim WLF, Lam SM, Shui G, Mondal A, Ong D, Duan X, et al. Effects of a high-fat, high-cholesterol diet on brain lipid profiles in apolipoprotein E e{open}3 and e{open}4 knock-in mice. Neurobiol Aging. 2013;34(9):2217–24.

184. Yates JR. Mass spectrometry and the age of the proteome. J Mass Spectrom. 1998;33(1):1–19.

185. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402–8.

186. La Fleur SE, Luijendijk MCM, Van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RAH. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. Int J Obes [Internet]. 2011;35(4):595–604. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.164

187. Hong L, Zahradka P, Cordero-Monroy L, Wright B, Taylor CG. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in fa/fa Zucker rats. Nutrients. 2019;11(4).

188. Muhlhausler BS, Miljkovic D, Fong L, Xian CJ, Duthoit E, Gibson RA. Maternal omega-3 supplementation increases fat mass in male and female rat offspring. Front Genet. 2011;2(JULY):1–10.

189. Xu X, So J-S, Park J-G, Lee A-H. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. Semin Liver Dis [Internet]. 2013 Nov 12;33(4):301–11. Available from: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1358523

190. Towle HC. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2005 Dec;16(10):489–94. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276005002316

191. Bjursell M, Xu X, Admyre T, Böttcher G, Lundin S, Nilsson R, et al. The Beneficial Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Diet Induced Obesity and Impaired Glucose Control Do Not Require Gpr120. Zhang Y, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Dec 26;9(12):e114942. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114942

192. Yang G, Lee J, Lee S, Kwak D, Choe W, Kang I, et al. Krill Oil Supplementation Improves Dyslipidemia and Lowers Body Weight in Mice Fed a High-Fat Diet Through Activation of AMP-Activated Protein Kinase. J Med Food. 2016;19(12):1120–9.

193. Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 2002;282(3 45-3):664–71.

194. Chacińska M, Zabielski P, Książek M, Szałaj P, Jarząbek K, Kojta I, et al. The impact of omega-3 fatty acids supplementation on insulin resistance and content of adipocytokines and biologically active lipids in adipose tissue of high-fat diet fed rats. Nutrients. 2019;11(4).

195. Muhlhausler BS, Gibson RA, Makrides M. The effect of maternal omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (n-3 LCPUFA) supplementation during pregnancy and/or lactation on body fat mass in the offspring: A systematic review of animal studies. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids [Internet]. 2011;85(2):83–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.027

196. Muhlhausler BS, Yelland LN, McDermott R, Tapsell L, McPhee A, Gibson RA, et al. DHA supplementation during pregnancy does not reduce BMI or body fat mass in children: Follow-up of the DHA to Optimize Mother Infant Outcome randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2016;103(6):1489–96.

197. Helland IB, Smith L, Blomen B, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's iq and body mass index at 7 years of age. Pediatrics. 2008;122(2):472–9.

198. Pinel A, Pitois E, Rigaudiere JP, Jouve C, De Saint-Vincent S, Laillet B, et al. Epa prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a western diet. J Lipid Res. 2016;57(8):1382–97.

199. Kratz M, Callahan HS, Yang PY, Matthys CC, Weigle DS. Dietary n-3-polyunsaturated fatty acids and energy balance in overweight or moderately obese men and women: A randomized controlled trial. Nutr Metab. 2009;6:1–7.

200. Gray B, Steyn F, Davies PSW, Vitetta L. Omega-3 fatty acids: A review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. Eur J Clin Nutr. 2013;67(12):1234–42.

201. Skulas-Ray AC, Wilson PWF, Harris WS, Brinton EA, Kris-Etherton PM, Richter CK, et al. Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory from the American Heart Association. Circulation. 2019;140(12):E673–91.

202. Pirillo A, Catapano AL. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of hypertriglyceridaemia. Int J Cardiol [Internet]. 2013;170(2 SUPPL.1):6–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.040

203. Alwayn IPJ, Andersson C, Zauscher B, Gura K, Nosé V, Puder M. Omega-3 fatty acids improve hepatic steatosis in a murine model: Potential implications for the marginal steatotic liver donor. Transplantation. 2005;79(5):606–8.

204. Alwayn IPJ, Gura K, Nosé V, Zausche B, Javid P, Garza J, et al. Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. Pediatr Res. 2005;57(3):445–52.

205. Bonaa KH, Bjerve KS, Nordoy A. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in plasma phospholipids are divergently associated with high density lipoprotein in humans. Arterioscler Thromb. 1992;12(6):675–81.

206. Bonaa KH, Bjerve KS, Nordoy A. Habitual fish consumption, plasma phospholipid fatty acids, and serum lipids: The Tromso study. Am J Clin Nutr. 1992;55(6):1126–34.

207. Friday KE, Childs MT, Tsunehara CH, Fujimoto WY, Bierman EL, Ensinck JW. Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from omega-3 fatty acid supplementation in type II diabetes. Diabetes Care. 1989;12(4):276–81.

208. Zheng JS, Lin M, Imamura F, Cai W, Wang L, Feng JP, et al. Serum metabolomics profiles in response to n-3 fatty acids in Chinese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomised controlled trial. Sci Rep [Internet]. 2016;6(June):1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/srep29522

209. Demers G, Roy J, Machuca-Parra AI, Dashtehei pour Z, Bairamian D, Daneault C, et al. Fish oil supplementation alleviates metabolic and anxiodepressive effects of diet-induced obesity and associated changes in brain lipid composition in mice. Int J Obes [Internet]. 2020;44(9):1936–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41366-020-0623-6

210. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos GA, Moraes JC, Dragano N, et al. Diets containing α-linolenic (ω3) or oleic (ω9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. Endocrinology. 2015;156(11):4033–46.

211. Höper AC, Salma W, Khalid AM, Hafstad AD, Sollie SJ, Raa J, et al. Oil from the marine zooplankton Calanus finmarchicus improves the cardiometabolic phenotype of diet-induced obese mice. Br J Nutr. 2013;110(12):2186–93.

212. Dentin R, Benhamed F, Pégorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. J Clin Invest. 2005;115(10):2843–54.

213. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. Bailliere's Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2002;16(5):663–78.

214. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. Vol. 19, Current Opinion in Lipidology. 2008. p. 242–7.

215. Xu J, Christian B, Jump DB. Regulation of Rat Hepatic L-Pyruvate Kinase Promoter Composition and Activity by Glucose, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, and Peroxisome Proliferator-activated Receptor-α Agonist*. J Biol Chem [Internet]. 2006 Jul;281(27):18351–62. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820575959

216. Valenzuela R, Espinosa A, Llanos P, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Vergara D, et al. Anti-steatotic effects of an n-3 LCPUFA and extra virgin olive oil mixture in the liver of mice subjected to high-fat diet. Food Funct. 2016;7(1):140–50.

217. Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berge RK, Sletnes P, et al. Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. Ann Nutr Metab. 2001;45(1):30–7.

218. Madsen L, Berge RK. 3-Thia fatty acid treatment, in contrast to eicosapentaenoic acid and starvation, induces gene expression of carnitine palmitoyltransferase-II in rat liver. Lipids. 1999;34(5):447–56.

219. Madsen L, Rustan AC, Vaagenes H, Berge K, Dyrøy E, Berge RK. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. Lipids. 1999;34(9):951–63.

220. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. Mol Metab [Internet]. 2018;15(April):8–19. Available from: https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007

221. Kanter R, Caballero B. Global gender disparities in obesity: A review. Adv Nutr. 2012;3(4):491–8.

222. Chen X, McClusky R, Chen J, Beaven SW, Tontonoz P, Arnold AP, et al. The number of X chromosomes causes sex differences in adiposity in mice. PLoS Genet. 2012;8(5).

223. Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. Reproduction [Internet]. 1991 Sep 1;93(1):125–32. Available from: https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/jrf.0.0930125

224. Abramovich DR. Human Sexual Differentiation—in Utero Influences. BJOG An Int J Obstet Gynaecol. 1974;81(6):448–53.

225. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O. Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription. J Nutr [Internet]. 2005 Nov 1;135(11):2503–6. Available from: https://academic.oup.com/jn/article/135/11/2503/4669907

226. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res. 2004;43(2):91–104.

227. Poudyal H, Brown L. Stearoyl-CoA Desaturase: A Vital Checkpoint in the Development and Progression of Obesity. Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets. 2012;11(3):217–31.

228. Ausio J, Dong F, van Holde KE. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone “tails” in the stabilization of the nucleosome. J Mol Biol. 1989;206(3):451–63.

229. Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. Genes Dev. 2005;19(14):1635–55.

230. Taltavull N, Ras R, Mariné S, Romeu M, Giralt M, Méndez L, et al. Protective effects of fish oil on pre-diabetes: A lipidomic analysis of liver ceramides in rats. Food Funct. 2016;7(9):3981–8.

231. Fredrik Rosqvist 1, Joel Kullberg 2 3, Marcus Ståhlman 4, Jonathan Cedernaes 5 6, Kerstin Heurling 2 3 7, Hans-Erik Johansson 8, David Iggman 1 9, Helena Wilking 2, Anders Larsson 6, Olof Eriksson 3 10, Lars Johansson 2 3, Sara Straniero 11, Mats Rudling UR 1. Overeating Saturated Fat Promotes Fatty Liver and Ceramides Compared With Polyunsaturated Fat-A Randomized Trial.pdf. J Clin Endocrinol Metab. 2019;

232. Mardare C, Krüger K, Liebisch G, Seimetz M, Couturier A, Ringseis R, et al. Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. J Diabetes Res. 2016;2016.

233. Lu CY, Li CC, Liu KL, Tsai CW, Lii CK, Chen HW. Docosahexaenoic acid down-regulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the sphingomyelinase/ceramide pathway. J Nutr Biochem [Internet]. 2010;21(4):338–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.007

234. Norris GH, Blesso CN. Dietary and Endogenous Sphingolipid Metabolism in Chronic Inflammation. Nutrients. 2017;

235. Honda KL, Lamon-fava S, Matthan NR, Wu D, Alice H, Street W. Docosahexaenoic acid differentially affects TNFα and IL-6 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages. Prostaglandines Leukot Essent Acides Gras. 2015;1–20.

236. Wiktorowska-owczarek A, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. Adv Clin Exp Med. 2015;931–41.

237. Cuschieri J, Bulger E, Billgrin J, Garcia I, Maier R V. Acid Sphingomyelinase is Required for Lipid Raft TLR4 Complex Formation. Surg Infect (Larchmt). 2007;8(1).

238. Mason GJ. Stereotypies: a critical review. Anim Behav. 1991;41(6):1015–37.

239. De Souza AS, Fernandes FS, Tavares Do Carmo M das G. Effects of maternal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on brain fatty acids, learning, and memory. Nutr Rev. 2011;69(3):132–44.

240. Wigglesworth JS. Malnutrition and brain development. Dev Med Child Neurol [Internet]. 1969 Dec 12;11(6):792–803. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8749.1969.tb01526.x

241. Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the Developing Central Nervous System. In: The Vulnerable Brain and Environmental Risks [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1992. p. 3–44. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3326-9_1

242. Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. Neurosci Res. 2006;56(2):159–64.

243. Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacol Res. 1999;40(3):211–25.

244. Horrocks LA, Farooqui AA. Docosahexaenoic acid in the diet: Its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2004;70(4):361–72.

245. Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavialle M. Astrocytes in Culture Require Docosahexaenoic Acid to Restore the n-3/n-6 Polyunsaturated Fatty Acid Balance in Their Membrane Phospholipids. J Neurosci Res. 2004;75(1):96–106.

246. McNamara RK, Able J, Jandacek R, Rider T, Tso P. Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: Role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. Psychoneuroendocrinology. 2009;34(4):532–9.

247. Baldereschi M, Di Carlo A, Lepore V, Bracco L, Maggi S, Grigoletto F, et al. Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian longitudinal study on aging. Neurology. 1998;50(4):996–1002.

248. Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer ' s disease : The Baltimore Longitudinal Study of Aging. Neurology. 1997;

249. P. Collins CW. Estrogen hits the surface. Nat Med. 1999;5(10):1130–1.

250. Bagley HN, Wang Y, Campbell MS, Yu X, Lane RH, Joss-Moore LA. Maternal docosahexaenoic acid increases adiponectin and normalizes IUGR-induced changes in rat adipose deposition. J Obes. 2013;2013.

251. Reyes-Hernández CG, Ramiro-Cortijo D, Rodríguez-Rodríguez P, Giambelluca S, Simonato M, González MDC, et al. Effects of arachidonic and docosohexahenoic acid supplementation during gestation in rats. Implication of placental oxidative stress. Int J Mol Sci. 2018;19(12).

252. Khaire A, Rathod R, Kemse N, Kale A, Joshi S. Supplementation with omega-3 fatty acids during gestation and lactation to a vitamin B12-deficient or-supplemented diet improves pregnancy outcome and metabolic variables in Wistar rats. Reprod Fertil Dev. 2015;27(2):341–50.

253. Brown AS, Susser ES. Sex Differences in Prevalence of Congenital Neural Defects after Periconceptional Famine Exposure. Epidemiology [Internet]. 1997 Jan;8(1):55–8. Available from: http://journals.lww.com/00001648-199701000-00009

254. De Rooij SR, Caan MWA, Swaab DF, Nederveen AJ, Majoie CB, Schwab M, et al. Prenatal famine exposure has sex-specific effects on brain size. Brain. 2016;139(8):2136–42.

255. Frondas-Chauty A, Simon L, Branger B, Gascoin G, Flamant C, Ancel PY, et al. Early growth and neurodevelopmental outcome in very preterm infants: Impact of gender. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2014;99(5).

256. Skiöld B, Alexandrou G, Padilla N, Blennow M, Vollmer B, Ådén U. Sex differences in outcome and associations with neonatal brain morphology in extremely preterm children. J Pediatr. 2014;164(5):1012–8.

257. Ross BM. ω - 3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism. Med Hypotheses. 2007;68(3):515–24.

258. Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. Brain Res. 2003;964(1):136–43.

259. Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, et al. Chronic ω-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. Behav Brain Res [Internet]. 2011;219(1):116–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.028

260. Fedorova I, Salem N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2006;75(4–5):271–89.

261. Trofimiuk E, Braszko JJ. Concomitant docosahexaenoic acid administration ameliorates stress-induced cognitive impairment in rats. Physiol Behav. 2013;118:171–7.

262. Pérez MÁ, Terreros G, Dagnino-Subiabre A. Long-term ω-3 fatty acid supplementation induces anti-stress effects and improves learning in rats. Behav Brain Funct. 2013;9(1):1–12.

263. Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. J Nutr Biochem [Internet]. 2010;21(5):364–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.003

264. Laugero KD, Smilowitz JT, German JB, Jarcho MR, Mendoza SP, Bales KL. Plasma omega 3 polyunsaturated fatty acid status and monounsaturated fatty acids are altered by chronic social stress and predict endocrine responses to acute stress in titi monkeys. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids [Internet]. 2011;84(3–4):71–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2010.12.003

265. Rapoport SI. Arachidonic acid and the brain. J Nutr. 2008;138(12):2515–20.

266. Häring M, Guggenhuber S, Lutz B. Neuronal populations mediating the effects of endocannabinoids on stress and emotionality. Neuroscience [Internet]. 2012;204:145–58. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.035

267. Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology. 2009;34(2):199–211.

268. Laino CH, Fonseca C, Sterin-Speziale N, Slobodianik N, Reinés A. Potentiation of omega-3 fatty acid antidepressant-like effects with low non-antidepressant doses of fluoxetine and mirtazapine. Eur J Pharmacol [Internet]. 2010;648(1–3):117–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.047

269. Sánchez-Villegas A, Delgado-Rodríguez M, Alonso A, Schlatter J, Lahortiga F, Serra-Majem L, et al. Association of the Mediterranean dietary pattern with the incidence of depression: The Seguimiento Universidad de Navarra/University of Navarra follow-up (SUN) cohort. Vol. 66, Archives of General Psychiatry. 2009. p. 1090–8.

270. Rienks J, Dobson AJ, Mishra GD. Mediterranean dietary pattern and prevalence and incidence of depressive symptoms in mid-aged women: Results from a large community-based prospective study. Eur J Clin Nutr. 2013;67(1):75–82.

271. Kokacya MH, Inanir S, Copoglu US, Dokuyucu R, Erbas O. The antipsychotic effects of omega-3 fatty acids in rats. Am J Med Sci. 2015;350(3):212–7.

272. Nasir M, Bloch MH. Trim the fat: the role of omega-3 fatty acids in psychopharmacology. Ther Adv Psychopharmacol [Internet]. 2019 Jan 27 [cited 2019 Sep 7];9:204512531986979. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31489174

273. Zugno AI, Chipindo H, Canever L, Budni J, Alves De Castro A, Bittencourt De Oliveira M, et al. Omega-3 fatty acids prevent the ketamine-induced increase in acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia. Life Sci [Internet]. 2015;121:65–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.025

274. Wellmann KA, George F, Brnouti F, Mooney SM. Docosahexaenoic acid partially ameliorates deficits in social behavior and ultrasonic vocalizations caused by prenatal ethanol exposure. Behav Brain Res [Internet]. 2015;286:201–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.048

275. Wainwright PE. Do essential fatty acids play a role in brain and behavioral development? Neurosci Biobehav Rev. 1992;16(2):193–205.

276. Behl C. OESTROGEN AS A NEUROPROTECTIVE HORMONE. Nat Rev Neurosci. 2002;3(June).

277. Hideo Mukai 1, Tetsuya Kimoto, Yasushi Hojo, Suguru Kawato, Gen Murakami, Shimpei Higo, Yusuke Hatanaka MO-I. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2010;1800(10):1030–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.11.002

278. Frick KM. RODENTS : WHAT HAVE WE LEARNED AND WHERE DO WE GO FROM HERE ? Horm Behav. 2010;55(1):2–23.

279. Bitran D, Arias R, Revilla-sanchez R, Grauer S, Liu F, Day M, et al. Activation of estrogen receptor- b regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. Nat Neurosci. 2008;11(3):334–43.

280. Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2009;39(4):366–73.

281. Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. Int J Clin Exp Pathol. 2010;3(5):505–14.

282. Feingold K, Grunfeld C. Triglyceride Lowering Drugs [Internet]. Endotext. MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2021 Jun 23]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402615

283. Gallego-Durán R, Romero-Gómez M. Epigenetic mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging field. Vol. 7, World Journal of Hepatology. 2015. p. 2497–502.

284. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: Effect of dietary methyl donor supplementation. Mol Genet Metab [Internet]. 2013;110(3):388–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.08.022

285. Deegan DF, Engel N. Sexual Dimorphism in the Age of Genomics: How, When, Where. Front Cell Dev Biol. 2019;7(September):1–7.

286. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(3):175–91.

287. Chakinala RC, Khatri A, Gupta K, Koike K, Epelbaum O. Sphingolipids in COPD. Eur Respir Rev [Internet]. 2019;28(154). Available from: http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0047-2019

288. Wang DD, Toledo E, Hruby A, Rosner BA, Willett WC, Sun Q, et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevención con Dieta Mediterránea). Circulation [Internet]. 2017 May 23;135(21):2028–40. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024261

289. Field BC, Gordillo R, Scherer PE. The Role of Ceramides in Diabetes and Cardiovascular Disease Regulation of Ceramides by Adipokines. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11(October):1–14.

290. Kurz J, Parnham MJ, Geisslinger G, Schiffmann S. Ceramides as Novel Disease Biomarkers. Trends Mol Med [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Feb 5];25(1):20–32. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491418302053

291. Croyal M, Kaabia Z, León L, Ramin-Mangata S, Baty T, Fall F, et al. Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD? Diabetes Metab. 2018;44(2):143–9.

292. Ayed A, Krutchinsky AN, Ens W, Standing KG, Duckworth HW. Quantitative evaluation of protein-protein and ligand-protein equilibria of a large allosteric enzyme by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1998;12(7):339–44.

IX. ANNEXES

ANNEXE 1 : Résumés des communications et publications

Journée Francophone de Nutrition, 2020

La supplémentation maternelle en DHA pendant la gestation et la lactation prévient chez la descendance l'augmentation de la concentration des céramides associée à l'obésité.

Amran Daher Abdi[1], Carla Elena Mezo-González[1], Sandra Olvera Hernández[1], Luis Antonio Reyes Castro[1,2], Elena Zambrano[2], Francisco Bolaños-Jiménez[1].

[1]UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRAE – Université de Nantes, 44096 Nantes France.

[2]Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México.

Mots clés : Acide docosahexaénoïque (DHA), Acide eicosapentaénoïque (EPA), Obésité, Céramides, Sphingolipides, Spectrométrie de masse.

Introduction et but de l'étude : Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la supplémentation maternelle en acide docosahexaénoïque (DHA) pendant la grossesse, diminue le risque de développement d'une obésité chez la progéniture. L'objectif de cette étude a été de déterminer dans quelle mesure cet effet protecteur est lié à une modification de la production des céramides. L'augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires de cette famille de phospholipides est en effet associée au développement des dysfonctions métaboliques propres à l'obésité dont l'inflammation, la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique.

Matériels et Méthodes : Des rattes gestantes ont été supplémentées par voie orale soit avec un extrait d'huile de poisson contenant un mélange de DHA/EPA ou avec de l'huile de carthame comme placebo. La supplémentation avait débuté dès le deuxième jour de gestation et a été maintenue jusqu'à la fin de la lactation. Un jour après la mise bas, le nombre de ratons a été ajusté à 8 ratons par mère. Au sevrage, les animaux mâles de chacune des portées ont été divisés en 2 sous-groupes pour être nourris soit avec de la nourriture standard (STD), soit exposés à une alimentation riche en graisses et en sucre, en plus de la nourriture standard, dans des conditions de libre choix (fc-HFHS). Ainsi, 4 groupes expérimentaux ont été constitués : DHA/EPA-STD ; DHA/EPA-fc-HFHS ; Placebo-STD ; Placebo-fc-HFHS. À l'âge de 4 mois, les animaux ont été sacrifiés pour la détermination des concentrations des céramides dans le sérum et le foie par spectrométrie de masse.

Résultats et Analyse statistique : Les rats exposés au régime fc-HFHS ont présenté une augmentation du poids corporel et de la masse adipeuse par rapport aux animaux nourris avec de la nourriture standard indépendamment du type de supplémentation maternelle. En revanche, alors que le régime fc-HFHS s'est traduit par une augmentation de la concentration hépatique de triglycérides et de cholestérol chez les rats de mères supplémentées placebo, aucune différence dans l'accumulation de triglycérides et du cholestérol dans le foie n'a été observée entre les animaux DHA/EPA-STD et les rats DHA/EPA-fc-HFHS. De plus, la concentration des céramides dans le sérum en réponse à la diète fc-HFHS avait augmenté chez le groupe placebo mais pas chez les animaux de mères supplémentées DHA/EPA. Un effet protecteur similaire a été observé dans le foie où la teneur en certaines espèces de céramides a diminué chez les animaux du groupe DHA/EPA-fc-HFHS alors qu'au contraire, elle avait augmenté chez les animaux fc-HFHS de mères supplémentées carthame. Les modifications dans la concentration de céramides se sont accompagnées d'une diminution des niveaux d'expression des gènes codant pour les enzymes qui catalysent la synthèse hépatique des céramides.

Conclusions : La supplémentation maternelle en DHA prévient chez la descendance l'accumulation des céramides dans le sérum et le foie induite par une alimentation hypercalorique en réduisant l'expression des gènes codants pour les enzymes de la voie de synthèse *de novo* des céramides.

Latin American DOHaD Chapter, 2020

Maternal DHA Supplementation During Pregnancy and Lactation Prevents the Development in Offspring of Glucose intolerance and Hepatic Steatosis Induced by Feeding a High-Calorie Diet

Amran Daher Abdi[1], Carla Elena Mezo-González[1], Sandra Olvera Hernández[1], Luis Antonio Reyes Castro[1,2], Elena Zambrano[2], Francisco Bolaños-Jiménez[1].

[1]UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRAE – Université de Nantes, 44096 Nantes France.

[2]Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México.

Key words: Pregnancy**,** Docosahexaenoic acid (DHA), Obesity, Offspring,

Background: A large number of observational studies have shown that the consumption of Docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) enriched food or the nutritional supplementation with these n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFAs), have positive health effects ranging from prevention and reversion of the cognitive deficits associated with neurological diseases and ageing to improvement and prevention of the metabolic syndrome. Based on these lines of evidence, maternal LCPUFAs supplementation during pregnancy has become a current clinical practice to improve neurological outcomes in the offspring. This study aimed at determining whether maternal supplementation during pregnancy with a mixture of DHA/EPA prevents in offspring the metabolic complications of obesity and to identify the mechanisms underlying the potential preventive effects.

Methods: Pregnant Wistar rats received from the beginning of gestation to the end of lactation an oral daily dose of 350 µl/kg of a fish oil extract, corresponding to 160 mg/kg DHA and 23 mg/kg EPA, or 350 µl/kg of safflower oil as placebo. At birth, litter size was adjusted to eight pups per litter. Pups were weaned at 21 days and split into two sub-groups to be fed standard chow or a free-choice high-fat high-sugar (fc-HFHS) diet. Thus, four experimental groups each one consisting of 8 male animals from 8 different litters were formed: DHA/EPA-STD; DHA/EPA-fc-HFHS; placebo-STD; placebo-fc-HFHS. The anthropometric and metabolic characteristics of offspring were assessed at three months.

Results: Compared to animals fed standard chow, rats exposed to the fc-HFHS diet exhibited increased body weight and liver weight along with enhanced body fat and leptin in serum independently of maternal diet. Maternal DHA/EPA supplementation prevented both the glucose intolerance and the rise in serum insulin resulting from consumption of the fc-HFHS diet. In addition, animals from the DHA/EPA-fc-HFHS group showed decreased hepatic triglyceride accumulation compared to placebo-fc-HFHS rats. This latter protective effect was correlated with decreased hepatic expression of genes regulating the lipogenesis, β-oxidation and glycolysis metabolic pathways. DHA/EPA-fc-HFHS animals exhibited also decreased expression of pro-inflammatory genes and, conversely, enhanced hepatic levels of mRNAs coding for anti-inflammatory genes.

Conclusions: Maternal n-3 LCPUFA supplementation protects the offspring against hepatic steatosis and improves glucose intolerance following high-calorie feeding by inhibiting lipogenesis and reducing inflammation.

Financial support: Amran Daher Abdi and Carla Mezo-González are recipients of an international PhD fellowship from, respectively, the Ministry of Research and Innovation of the Government of the Republic of Djibouti and the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT). This work was supported by the French National Research Agency (ANR, grant ANR-16-CE21-0007-01) and CONACYT (award number 2015-16-273510) and by the programme "Food for Tomorrow" of the French Region Pays de la Loire.

nutrients

MDPI

Article

Maternal DHA Supplementation during Pregnancy and Lactation in the Rat Protects the Offspring against High-Calorie Diet-Induced Hepatic Steatosis

Amran Daher-Abdi [1], Sandra Olvera Hernández [1,2], Luis Antonio Reyes Castro [1,3], Carla Elena Mezo-González [1], Mikaël Croyal [4,5,6], Juan Antonio García-Santillán [1], Khadija Ouguerram [1], Elena Zambrano [3] and Francisco Bolaños-Jiménez [1,*]

[1] UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRAE—Université de Nantes, 44096 Nantes, France; amran.daherabdi@gmail.com (A.D.-A.); olvera.sandra@uabc.edu.mx (S.O.H.); lafe_mat@hotmail.com (L.A.R.C.); carla.mezo-gonzalez@etu.univ-nantes.fr (C.E.M.-G.); juantgarsan@hotmail.com (J.A.G.-S.); khadija.ouguerram@univ-nantes.fr (K.O.)
[2] Medical and Psychology School, Autonomous University of Baja California, Tijuana 21100, Mexico
[3] Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14080, Mexico; zamgon@yahoo.com.mx
[4] CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility, 8 Quai Moncousu, 44000 Nantes, France; Mikael.Croyal@univ-nantes.fr
[5] Université de Nantes, CNRS, INSERM, L'institut du Thorax, 8 Quai Moncousu, 44000 Nantes, France
[6] Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, 8 Quai Moncousu, 44000 Nantes, France
* Correspondence: Francisco.Bolanos@univ-nantes.fr; Tel.: +33-2-54-48-20-14

check for updates

Citation: Daher-Abdi, A.; Olvera Hernández, S.; Reyes Castro, L.A.; Mezo-González, C.E.; Croyal, M.; García-Santillán, J.A.; Ouguerram, K.; Zambrano, E.; Bolaños-Jiménez, F. Maternal DHA Supplementation during Pregnancy and Lactation in the Rat Protects the Offspring against High-Calorie Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Nutrients* **2021**, *13*, 3075. https://doi.org/10.3390/nu13093075

Academic Editor: Carlo Agostoni

Received: 6 August 2021
Accepted: 30 August 2021
Published: 31 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Maternal supplementation during pregnancy with docosahexaenoic acid (DHA) is internationally recommended to avoid postpartum maternal depression in the mother and improve cognitive and neurological outcomes in the offspring. This study was aimed at determining whether this nutritional intervention, in the rat, protects the offspring against the development of obesity and its associated metabolic disorders. Pregnant Wistar rats received an extract of fish oil enriched in DHA or saline (SAL) as placebo by mouth from the beginning of gestation to the end of lactation. At weaning, pups were fed standard chow or a free-choice, high-fat, high-sugar (fc-HFHS) diet. Compared to animals fed standard chow, rats exposed to the fc-HFHS diet exhibited increased body weight, liver weight, body fat and leptin in serum independently of saline or DHA maternal supplementation. Nevertheless, maternal DHA supplementation prevented both the glucose intolerance and the rise in serum insulin resulting from consumption of the fc-HFHS diet. In addition, animals from the DHA-fc-HFHS diet group showed decreased hepatic triglyceride accumulation compared to SAL-fc-HFHS rats. The beneficial effects on glucose homeostasis declined with age in male rats. Yet, the preventive action against hepatic steatosis was still present in 6-month-old animals of both sexes and was associated with decreased hepatic expression of lipogenic genes. The results of the present work show that maternal DHA supplementation during pregnancy programs a healthy phenotype into the offspring that was protective against the deleterious effects of an obesogenic diet.

Keywords: developmental programming; DHA; obesity; hepatic steatosis

1. Introduction

It has well established that the nutritional status of the mother during gestation and lactation is a key determinant factor in the long-term health of the offspring. Epidemiological observations in humans show that children of obese mothers or those born to mothers who suffered from nutritional deficiencies during pregnancy are at greater risk of developing cognitive deficits and metabolic disorders than children of adequately nourished pregnant mothers [1–4]. These epidemiological observations have been corroborated by the results

of numerous experimental studies in various animal species and conceptualized under the hypothesis of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), also known as metabolic programming or nutritional programming [5–7]. According to this hypothesis, an imbalanced nutritional environment during in utero development and/or neonatal life sensitizes offspring to developing metabolic and mental diseases via epigenetic mechanisms that translate the effects of early nutritional events, leading to long-term changes in behavior and energy homeostasis. However, just as an unhealthy maternal diet can lead to adverse health consequences in the offspring, maternal supplementation with specific nutrients during pregnancy can potentially reverse and/or protect against the detrimental effects of metabolic programming [8,9]. In this respect, maternal supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) is a common clinical practice.

DHA is a polyunsaturated fatty acid that is found in large quantities in fish oil and seaweed. It is essential for the optimal development of the brain. However, it is only produced in marginal quantities by the body—hence, the recommendation to supplement the diet of pregnant women with DHA [10]. This nutritional intervention is supposed to reduce the risk of cerebral palsy, avoid premature birth and postpartum maternal depression, and increase birth weight [10–13]. Maternal DHA supplementation, however, has been extended beyond its use in preventing developmental defects. Consumption of this fatty acid is also believed to improve the cognitive development of the child. Substantial evidence indicates that children of mothers who received DHA during pregnancy exhibit better learning and cognitive indices than children of placebo-supplemented mothers [14,15]. Nevertheless, no benefits on offspring's neurodevelopment of maternal DHA supplementation have also been documented [16].

Clinical studies have also shown that supplementing the diet with DHA and/or eicosapentaenoic acid (EPA) reduces body fat [17,18], plasma triglycerides [19] and fatty acid accretion in liver [20,21]. These effects would be mediated by increased hepatic fatty oxidation and plasma lipoprotein lipase activity associated with reduced hepatic lipogenesis and very-low-density lipoprotein (VLDL) production [22–25]. Recently, it was proposed that the production of N-acyl taurines could also be involved [26]. Lower body fat accretion and reduced dyslipidemia have also been observed in obese mice and rats fed a high-fat diet supplemented with DHA/EPA [27,28]. On the basis of these findings, we hypothesized that maternal DHA supplementation could not only improve a child's cognitive development but also promote a healthy metabolic state that would exert a protective effect against the deleterious effects of an obesogenic diet. Therefore, this study aimed to evaluate (in rat offspring) the potential protective effects of maternal DHA supplementation during pregnancy and lactation against the metabolic alterations induced by a high-calorie diet and to uncover the involved molecular mechanisms.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Nutritional Interventions

The workflow of the study is illustrated in Figure 1. Founder (F0) female and male Wistar rats of three months of age were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France) and maintained under an inversed 12 h/12 h dark/light cycle (lights off at 7:00 AM) at 22 ± 1 °C with food and water ad libitum. After an adaptation period of ten days, females in natural proestrus were allowed to copulate with a male until at least two ejaculations were displayed. From the day after mating until the end of lactation, pregnant rats were housed individually and supplemented by mouth every day with an extract of fish oil containing 77 mg/g of EPA and 521 mg/g of DHA in the form of triglycerides (Omegavie® DHA 60 TG Qualitysilver®, Polaris, Quimper, France). The DHA formulation was contained within capsules (intended for human use) made of fish gelatin, glycerol and water which were protected from heat and light. The extract of fish oil was withdrawn by puncturing the capsule with a 1 mL syringe just before oral administration. DHA and EPA were thus protected from oxidation throughout storage and administration. The purity of the formulation was confirmed by mass spectrometric

quantification of the concentration of DHA and EPA as described in Section 2.4. The amount of delivered oil was adjusted to provide pregnant rats a daily dose of 175 mg of DHA per Kg. This corresponded, in average, to 0.85% of their daily caloric intake during the gestation period and to 0.41% of their daily caloric intake during lactation. One day after delivery, litter size was adjusted to eight pups per litter maintaining a 1:1 male to female ratio. At weaning (21 days), pups were divided into two groups to be fed either standard chow (A04, SAFE, Augy, France, controls) or a free-choice high-fat high-sugar diet (fc-HFHS) in addition to standard chow and tap water (obese), as described by La Fleur et al. [29], with minor modifications. The fc-HFHS diet consisted of powdered standard chow mixed with pig fat in the proportion of 30 g of fat per 70 g of food and a 30% sugar solution prepared with sweetened condensed milk. Four experimental groups were thus constituted: offspring of saline-supplemented dams fed standard chow after weaning (SAL-STD); offspring of saline-supplemented dams exposed to fcHFHS diet (SAL-fcHFHS diet); offspring of DHA-supplemented dams fed standard chow (DHA-STD); offspring of DHA-supplemented dams exposed to the fcHFHS diet (DHA-fcHFHS diet). The detailed composition of the standard chow can be found on the website: https://safe-lab.com/safe-wAssets/docs/product-data-sheets/diets/safe_a04_ds.pdf (accessed 29 August 2021). Its energy value was 3.15 kcal/g, while that of the standard chow mixed with pork fat was 5.10 kcal/g. The caloric value of the sweetened water solution was 1.75 kcal/mL. A total of 16 dams (8 supplemented with saline and 8 supplemented with DHA) were used. Two pups were selected at random from each litter to yield a final number of 16 saline- and 16 DHA-supplemented pups. Care was taken to split the two pups of the same dam into different experimental groups (fed standard chow or exposed to fcHFHS diet), such that the presented results corresponded to the combined data from eight animals born to eight different dams. Pups were housed four per cage until they reached 300 g of body weight and two per cage thereafter.

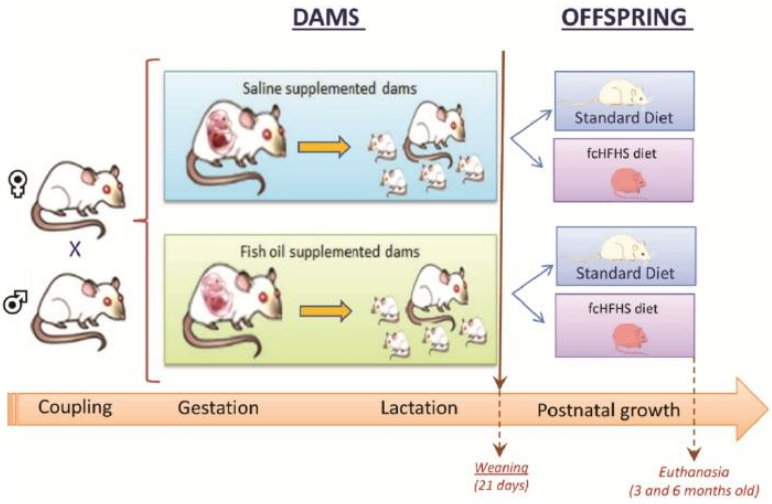


Figure 1. General scheme of the nutritional intervention.

2.2. Measurement of Body Weight and Food Intake

The weight of each dam was recorded every day throughout gestation and lactation to adjust the amount of DHA administered in relation to their body weight. Likewise, to determine the caloric contribution of DHA administration to daily energy consumption, the daily food consumption of the dams was determined by measuring the difference between the amount of pellet-food provided at the onset of their dark cycle and the amount of food remaining 24 h later. Care was taken to check through the sawdust in each cage to collect any spilled pellet of food.

2.3. Collection of Biological Samples and Euthanasia

Blood samples were collected by lateral tail vein puncture from dams on day 20 of gestation and at weaning, from supernumerary pups euthanized at the time of litter size adjustment, and from offspring at weaning and euthanasia. Sampling of the mothers took place before the oral administration of DHA. In a first series of experiments, male animals of 3 months of age were used. Thereafter, the same types of analyses were carried out in 6-month-old male and female rats. In both cases, animals were sacrificed by cervical dislocation under isoflurane anesthesia at the beginning of the dark phase of their light/dark cycle. The liver was carefully dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at −80 °C until analysis. Mediastinal and abdominal (omental, perirenal, retroperitoneal, epididymal, periovarian, perivesical, and parametrial) fat depots were dissected, weighed and summed to provide a measure of body fat.

2.4. Quantification of DHA and EPA

DHA and EPA concentrations in serum and in Omegavie® Qualitysilver capsules were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). All solvents used were LC-MS grade and were purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Standard compounds were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). A pool of reference standard solutions was prepared and serially diluted in ethanol to obtain seven standard solutions ranging from 0.05 to 80 µmol/L. Exogenous internal standard (2H5-DHA, 50 µL diluted at 20 µmol/L in ethanol) was added to 100 µL of standard solutions and serum samples. Then, 850 µL of a methanol/chloroform mixture (2:1; *v*:*v*) were added and samples were centrifuged for 10 min at 10,000× *g* (4 °C). Supernatants were transferred to vials and dried under a gentle stream of nitrogen. Dried samples were finally resuspended with 100 µL of an isopropanol/acetonitrile/water mixture (30:65:5; *v*:*v*:*v*). LC-MS/MS analyses were performed on a Xevo® TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class® UPLCTM device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Samples (5 µL) were injected onto a CSH-C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm, Waters Corporation) held at 60 °C. Compounds were separated using a linear gradient of mobile phase B (90:10; *v*:*v*; isopropanol:acetonitrile containing 0.1% formic acid and 10 mmol/L ammonium acetate) in mobile phase A (60:40; *v*:*v*; acetonitrile:water; 10 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid) at a flow rate of 400 µL/min. Mobile phase B was linearly increased from 40% to 95% for 8 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and then kept constant for 1.5 min before the next injection. Targeted compounds were detected by the mass spectrometer with the electrospray interface operating in the negative ion mode capillary voltage, 2.5 kV; desolvatation gas (N2) flow and temperature, 1000 L/h and 450 °C; source temperature, 150 °C. The multiple reaction monitoring mode was applied for MS/MS detection with the following m/z transitions: EPA, 301.2 → 257.2; DHA, 327.2 → 283.4; and 2H5-DHA, 332.2 →288.3. Cone and collision energy were set at 35 V and 15 eV, respectively. Chromatographic peak area ratios between EPA or DHA and 2H5-DHA constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for quantification. The linearity was expressed by the mean R^2 which was greater than 0.999 for both compounds (linear regression, 1/× weighting, origin excluded).

2.5. Serum Metabolite Determinations

Animals were submitted one week before sacrifice to an oral glucose tolerance test after a fast of 8 h initiated at the beginning of the dark phase of their light/dark cycle. A drop of blood was taken immediately before administration of glucose and 20, 40, 80, and 120 min after by severing the tip of the tail. Blood glucose was determined with a blood glucose monitor (Accu-Check® Active, Roche Diagnostics, Vercors, Meylan, France). To determine the glucose disappearance rate (kG), the area under the curve (AUC) was calculated using the value before the administration of glucose as base line. Serum from blood collected at the time of sacrifice was assayed for insulin and leptin using assay kits

from Millipore (Billerica, MA, USA). Enzymatic diagnostic kits from BioMérieux (Craponne, France), were used to quantify the serum levels of triglycerides, glucose and cholesterol.

2.6. Quantification of Liver Triglycerides and Cholesterol

200 mg of liver were homogenized in 4 mL of a chloroform/methanol (2:1) solution. After centrifugation of the extract at 4 °C and 2500× *g* during 15 min, the supernatant was collected and evaporated to dryness. The residue was subsequently reconstituted in 300 µL of a solution of isopropyl alcohol containing 10% Triton X and centrifuged at 5000× *g* for 15 min. The resulting supernatant was used for the determination of triglycerides and cholesterol content using enzymatic diagnostic kits from BioMérieux (Craponne, France).

2.7. Real-Time Quantitative RT-PCR Experiments

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNAse/RNAse-free for 30 min at 37 °C. Afterwards, 1.5 µg of purified RNA was reversed transcribed using Superscript II RNAseH-Reverse-Transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 20 µL, and the resulting cDNA was diluted 40-fold in DNAse and RNAse free water. Thereafter, 5 µL of each cDNA diluted sample was used as template for PCR amplification with 18S or β2-microglobulin as housekeeping genes and SYBR Green (Biorad, France) as fluorogenic intercalating dye. PCR was performed with the iCycler iQ detection system (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), using the following parameters: an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C, and 30 s at 60 °C. Primers used for the amplifications are presented in Table 1.

Table 1. Sequences of primers used for real time RT-PCR analyses.

Gene Name	Symbol	Forward Primer	Reverse Primer
Carbohydrate response element binding protein	ChREBP	GTACTGTTCCCTGCCTGCTCTC	CCCTCTGTGACTGCCCTTGTG
Fatty acid synthase	FASN	CGCCGTGGTGCTGGAGATTG	CTTGCCGAGGTTGGTGAGGAAG
Stearoyl-coenzyme A desaturase	SCD	GGAGCCACAGGACTTACAAGG	CGCACAAGCAGCCAACCC
Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	GPAM	TGGAGTGTGGCAAGAGGCGTTATC	TTCGGCAGCAGCAGCATCAGG
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	DGAT2	CCTCATCGCTGCCTACTCC	TGAGCCAGGTGACAGAGAAG
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARγ	GGAATTAGATGACAGTGACTTGGC	GGAGCACCTTGGCGAACAG
Carnitine palmitoyltransferase 1A	CPT1a	TGCCTGCCAGTTCCATTAAGC	GTCTCACTCCTCTTGCCAACAG
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, co-activator 1alpha	PGC-1α	ACACCGCACACATCGCAATTC	TTCGTCCCTCTTGAGCCTTTCG
Medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase	MCAD	GAGGCTAGAAGGTCCTGAGAAGTG	TCTGCTGCTCCGTCAACTGG
Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	HADH	CTCCATGTCCTCCTCTTCCTCTGC	CAGCCCGCCGCCGATGAC
18S ribosomal RNA	18S	GATGCGGCGGCGTTATTCC	CTCCTGGTGGTGCCCTTCC
Beta-2 microglobulin	β2M	GATGGCTCGCTCGGTGAC	CGTAGCAGTTGAGGAAGTTGG

2.8. Data Analysis

The relative expression levels of the mRNAs in the different samples were calculated using the 2ΔΔCT method. GraphPad Prism 9 Software (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA) was used to perform all statistical analyses. Data were first checked for normality using the Shapiro–Wilk normality test. Statistical differences between obese and control offspring born to saline-supplemented dams were evaluated by unpaired Student's *t*-test. The differences in the effects of maternal DHA supplementation, or between males and females, were determined by two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test using maternal supplementation (saline or DHA), postnatal diet (chow or FcHFHS

diet), or sex as factors. Experimental results were expressed as mean ± S.E.M. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. DHA Supplementation Does Not Affect Maternal Body Weight Gain or Food Intake during Pregnancy nor the Offspring's Growth Profile

Supplementation with fish oil extract increased the maternal blood levels of DHA in relation to saline-supplemented dams from 30 µM to 55 µM at the end of the gestation period and from 16 µM to 26 µM at weaning (Figure 2A,B). Serum EPA levels increased only during the gestation period, from 0.71 µM to 1.56 µM (Figure 2A). DHA-supplemented dams showed the same pattern of weight gain and food intake during gestation and lactation as their saline-supplemented counterparts (Figure 2C,D).

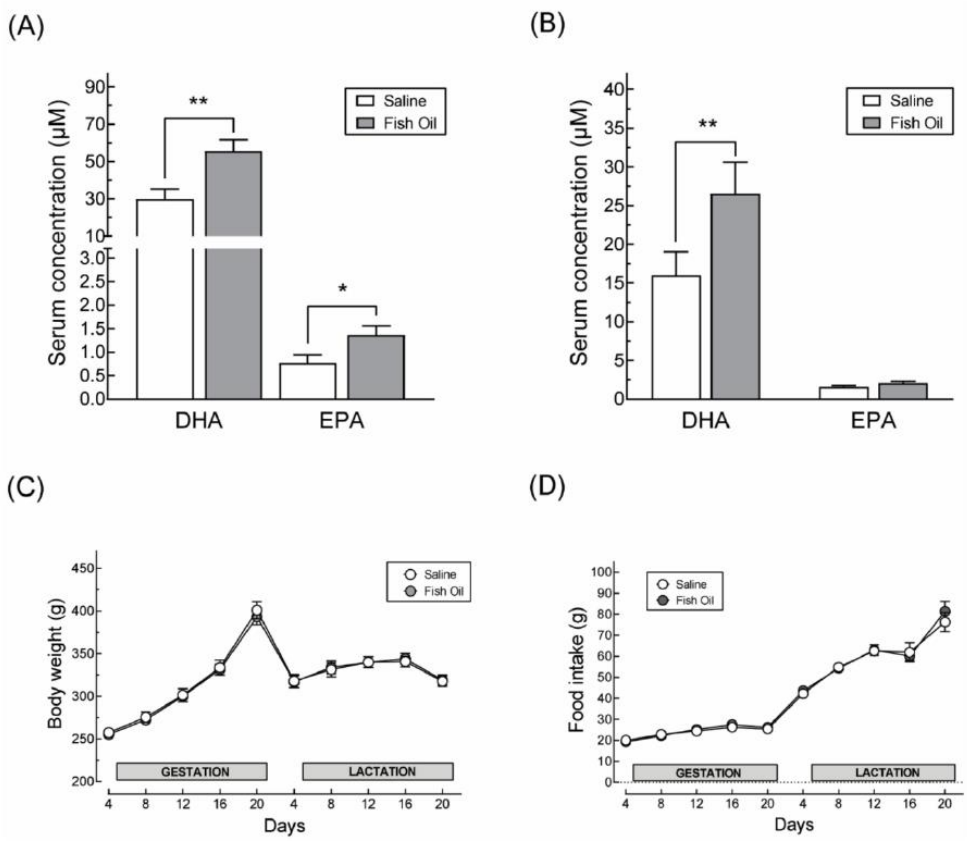


Figure 2. Effects of fish oil extract supplementation on maternal serum DHA and EPA at gestation day 20 (**A**) and at weaning (**B**). Note that the increased circulating levels of DHA and EPA has no impact on the body weight (**C**) and food consumption pattern (**D**) of the dams. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as determined by Student's *t*-test.

It is well established that the concentrations of fatty acids, including DHA, increase during pregnancy independently of the diet and decrease postpartum in both humans [30,31] and rats [32,33]. Moreover, although the levels of DHA in the offspring after birth are determined by the DHA supplied by the mother via the breast milk, this provision ceases between the 16th and 17th day of life when the offspring start to ingest solid food and, as a result, their diet becomes independent of that of their mother. In agreement with these observations, the offspring of mothers supplemented with fish oil extract showed an increase in the serum concentration of DHA and EPA only at birth (Figure 3A,B). Otherwise,

their growth profile was identical to that of the animals from saline-supplemented dams (Figure 3C).

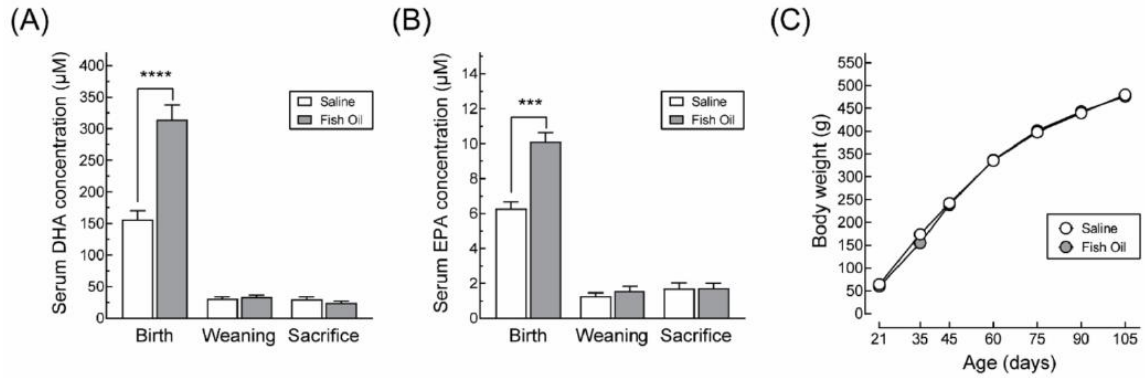


Figure 3. DHA (**A**) and EPA (**B**) levels in serum from offspring born to dams supplemented during gestation and lactation with saline or with a fish oil extract. At birth, offspring from supplemented dams exhibited increased circulating levels of DHA and EPA but showed no differences in body weight gain during lactation (**C**). *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test).

3.2. Impact of Maternal DHA Supplementation on Male Offspring at Three Months

3.2.1. Anthropometric Characteristics and Serum Metabolite Profile

To assess the potential protective effects of maternal DHA supplementation against obesity-induced metabolic alterations in the offspring, the progeny from saline- or DHA-supplemented dams were subdivided into two groups at weaning to be fed standard chow or to be exposed to a diet allowing them to freely choose between standard chow or food high in sugar and fat (FcHFHS Diet). This experimental protocol mimics the conditions of free choice feeding in humans and results in hyperglycemia, hyperinsulinemia and glucose intolerance [31]. 3-month-old male rats exposed to the FcHFHS diet gained more body weight and accumulated more body fat than rats fed standard chow, regardless of whether their mothers were supplemented with saline or DHA (Table 2). Similarly, animals born to dams supplemented with DHA or with saline who were exposed to the FcHSHF diet exhibited elevated circulating levels of leptin and triglycerides compared to animals fed standard chow (Table 2). These results indicated that maternal DHA supplementation had no protective effects on the increased body weight, fat accretion and hyperlipidemia associated with obesity. In contrast, circulating insulin levels and glucose intolerance were reduced in obese animals born to DHA-supplemented dams in comparison to the SAL-fcHFHS diet group (Figure 4A,B). Otherwise, no differences in blood glucose and cholesterol levels were observed between control and obese animals.

Table 2. Anthropometric and metabolic characteristics of 3-month-old male rats born to saline or DHA-supplemented dams.

	Supplemented Saline		**Supplemented DHA**	
	Standard Diet	**FcHFHS Diet**	**Standard Diet**	**FcHFHS Diet**
Body weight (g)	510 ± 12	600 ± 16 ****	477 ± 10	599 ± 15 ****
Adipose Index	4.40 ± 0.20	7.36 ± 0.31 ****	4.76 ± 0.23	6.66 ± 0.32 ***
Leptin (ng/mL)	12.43 ± 0.83	33.10 ± 4.31 ****	13.72 ± 2.29	34.58 ± 5.44 **
Triglycerides (mg/dL)	95.48 ± 10.45	157.49 ± 15.70 **	91.27 ± 5.11	171.58 ± 28.29 *
Cholesterol (mg/dL)	67.54 ± 3.54	77.24 ± 2.96	64.72 ± 4.64	72.38 ± 4.32
Glucose (mg/dL)	189.54 ± 5.43	206.66 ± 6.27	197.20 ± 8.26	204.16 ± 9.50

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to animals fed standard diet of the same experimental group (saline or DHA supplemented). All statistical comparisons were done by two-way ANOVA using maternal supplementation and postnatal diet as factors followed by Šídák's multiple comparisons test.

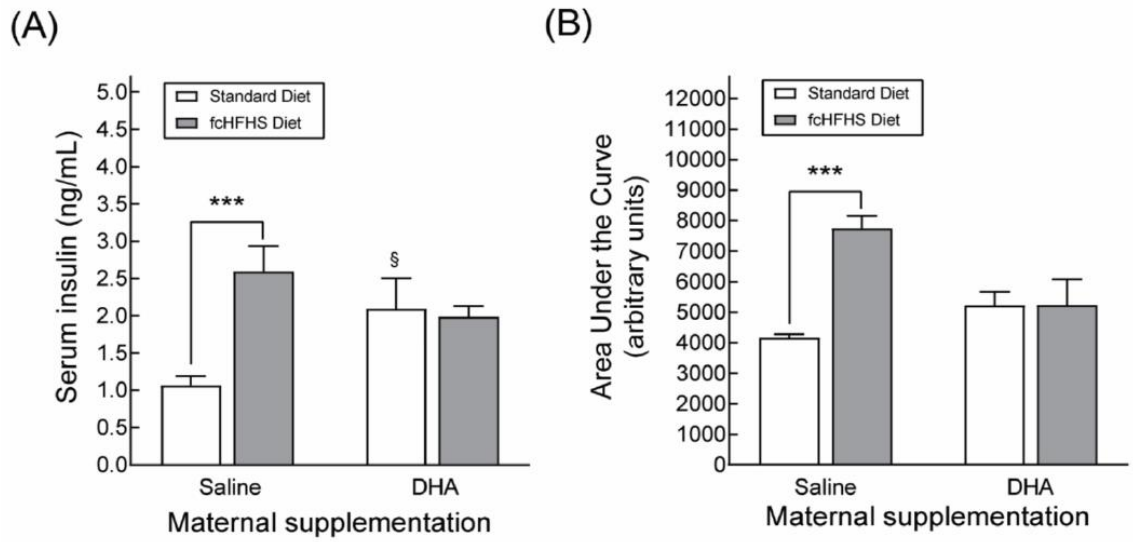


Figure 4. DHA maternal supplementation during gestation and lactation protects the offspring against insulinemia (**A**) and glucose intolerance (**B**) induced by the consumption of a high-calorie diet. Data correspond to the serum levels of insulin under ad libitum feeding conditions. The areas under the curve derive from an oral glucose tolerance test performed in 3-month-old male rats after a fasting period of 8 h. *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$ compared to rats fed standard chow born to saline-supplemented dams as determined by two-way ANOVA using maternal supplementation and postnatal diet as factors.

3.2.2. Hepatic Lipid Accumulation

It has been shown that DHA supplementation in parallel with high-calorie feeding protects against the development of obesity-associated liver steatosis [34,35]. Therefore, in order to further investigate the beneficial effects of maternal DHA supplementation, we assessed the accumulation of triglycerides and cholesterol in liver samples from our four experimental groups. Rats on the FcHFHS diet born to saline-supplemented dams displayed a higher concentration of triglycerides in the liver compared to the SAL-STD group, but there were no differences in hepatic triglycerides' concentration between animals of the DHA-STD and DHA-fcHFHS diet groups (Figure 5A). In addition, obese animals born to saline-supplemented dams showed increased concentrations of cholesterol in the liver compared to rats of the SAL-STD diet group (Figure 5B). However, no significant differences in hepatic cholesterol were observed between obese and non-obese animals born to DHA-supplemented dams.

3.2.3. Hepatic Gene Expression

In order to determine the mechanisms underpinning the beneficial effects of DHA supplementation, the hepatic expression levels of genes involved in glucose and lipid metabolism were examined. The results of these analyses showed that the protective effects of maternal DHA supplementation against hepatic steatosis were associated with decreased expression of mRNAs encoding for genes that positively regulate de novo lipogenesis and triglyceride synthesis (Figure 6A). Similarly, hepatic expression of genes promoting β-oxidation was downregulated by maternal DHA supplementation (Figure 6B).

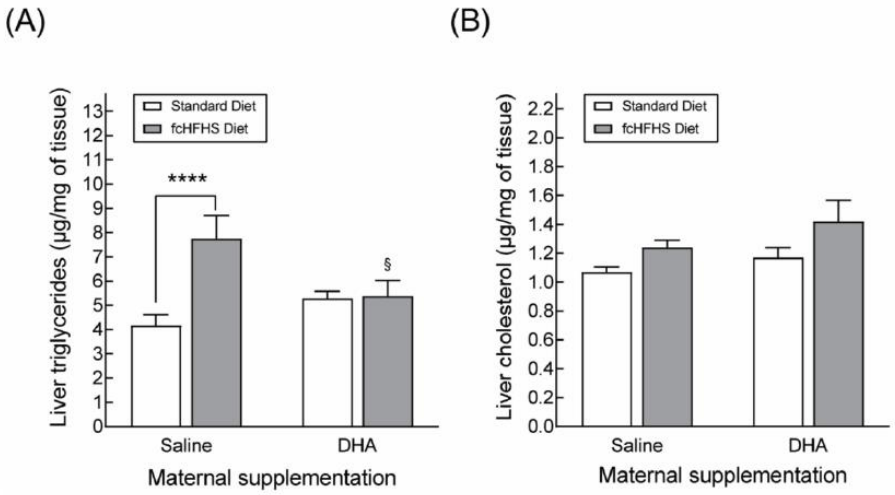


Figure 5. Protective effects of maternal DHA supplementation against obesity-induced hepatic steatosis in the offspring. Data correspond to the concentrations of triglycerides (**A**) and cholesterol (**B**) determined in liver samples from 3-month-old male rats born to saline- or DHA-supplemented dams. The offspring were fed standard chow or rendered obese by exposure to a fcHFHS diet from weaning. **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$ compared to rats born to saline-supplemented dams exposed to the fcHFHS diet after weaning (two-way ANOVA using maternal supplementation and postnatal diet as factors).

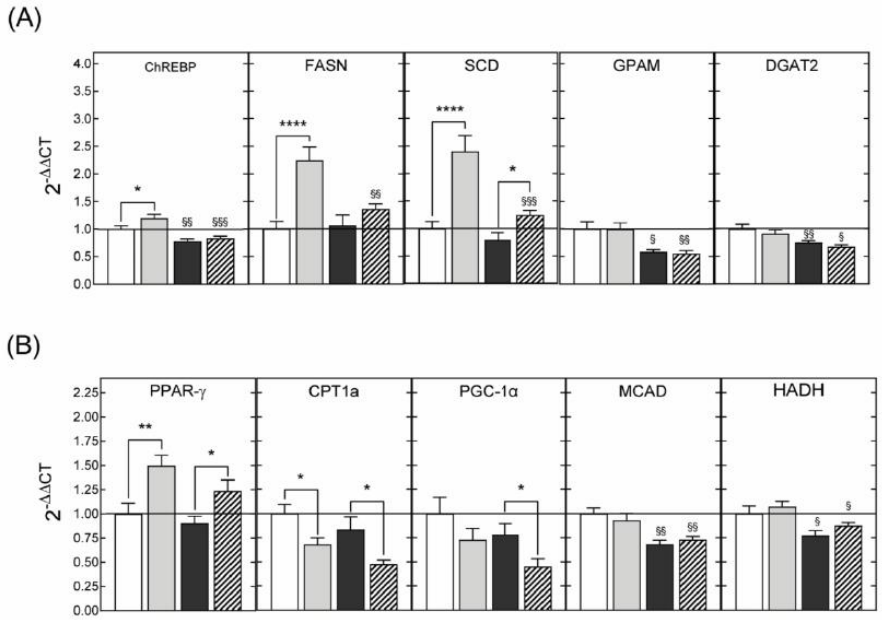


Figure 6. Expression levels of mRNAs encoding proteins involved in de novo lipogenesis (**A**) or fatty acid oxidation (**B**) in liver samples from 3-month-old male rats born to dams supplemented with saline or with DHA during gestation and lactation. The offspring were fed standard chow or rendered obese by exposure to a fcHFHS diet from weaning. Variations in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the expression in animals of the SAL-STD group (white bars) as a calibrator. Grey bars, SAL-fcHFHS group; black bars, DHA-STD group; stripped bars, DHA-fcHFHS diet group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$ §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ compared to animals born to saline supplemented dams that were exposed to the same diet (standard or fcHFHS diet), after weaning (two-way ANOVA with maternal supplementation and postnatal diet as factors).

3.3. Impact of Maternal DHA Supplementation on the Offspring at Six Months

The deleterious effects of metabolic programming often worsen with age and might be sex-dependent. With the aim of determining the persistence of the protective effects of DHA and potential sex differences in response to maternal DHA supplementation, a new series of experiments was conducted in which 6-month-old male and female animals born to saline- or DHA-supplemented dams were examined.

3.3.1. Anthropometric Characteristics and Serum Metabolite Profile

As expected, 6-month-old male animals exposed to the fcHFHS diet since weaning, showed an aggravation of their metabolic state compared to 3-month-old male animals exposed to the same diet. This was reflected in greater increases in body weight (+24%), body fat (+9%) and liver triglycerides (+316%) and cholesterol (+299%) in response to the fcHFHS diet (Table 3). Female rats exposed to the fcHFHS diet also showed significant metabolic alterations, some of which exceeded those observed in obese male rats in severity. This was particularly notable with respect to serum triglyceride levels (Table 3).

Table 3. Anthropometric and metabolic characteristics of 6-month-old male and female rats born to saline- or DHA-supplemented dams.

MALES				
	Supplemented Saline		Supplemented DHA	
	Standard Diet	fcHFHS Diet	Standard Diet	FcHFHS Diet
Body weight (g)	633 ± 19	754 ± 24 ***	630 ± 20	770 ± 24 ***
Adipose Index	6.51 ± 0.43	9.79 ± 0.37 ****	7.05 ± 0.11	10.72 ± 0.85 ***
Leptin (ng/mL)	14.99 ± 1.76	26.04 ± 1.91 **	15.69 ± 1.37	30.27 ± 3.55 ***
Triglycerides (mg/dL)	101.44 ± 10.96	151.09± 20.08 *	65.61 ± 7.49	119.45± 18.16 *
Cholesterol (mg/dL)	73.62 ± 5.54	74.83 ± 2.90	79.80 ± 6.11	72.94 ± 2.85
Glucose (mg/dL)	155.24 ± 9.04	177.42 ± 22.61	175.40 ± 27.71	209.04 ± 14.87
Insulin (ng/mL)	1.43 ± 0.18	2.99 ± 0.67 *	1.26 ± 0.22	4.08 ± 0.92 **
FEMALES				
	Supplemented Saline		Supplemented DHA	
	Standard Diet	fcHFHS Diet	Standard Diet	FcHFHS Diet
Body weight (g)	349 ± 80	451 ± 19 ****	357 ± 11	407 ± 26 ****
Adipose Index	7.33 ± 0.56	22.70 ± 0.42 ****	7.67 ± 0.42	10.00 ± 1.59 ***
Leptin (ng/mL)	6.53 ± 0.74	22.70 ± 3.04 ***	6.81 ± 1.05	16.13 ± 3.10 *
Triglycerides (mg/dL)	125.17 ± 13.27	339.99 ± 98.61 *	140.59 ± 20.99	285.48 ± 36.99 *
Cholesterol (mg/dL)	61.13 ± 3.91	85.11 ± 5.24	84.13 ± 4.10 §§	96.36 ± 3.83
Glucose (mg/dL)	171.65 ± 4.17	182.70 ± 10.07	183.89 ± 11.55	182.30 ± 13.42
Insulin (ng/mL)	0.93 ± 0.18	3.40 ± 0.76 **	1.45 ± 0.25	2.50 ± 0.57

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to animals fed standard diet of the same sex and the same experimental group (supplemented saline or DHA, Student's *t*-test). §§ $p < 0.01$ compared to the supplemented saline standard diet group (two-way ANOVA using maternal supplementation and postnatal diet as factors followed by Šídák's multiple comparisons test). Data correspond to six animals per group.

While male animals from both DHA-supplemented and non-supplemented dams showed glucose intolerance (Figure 7A,C), only obese female rats from saline-supplemented dams displayed impaired glucose tolerance (Figure 7B,D). In other words, maternal DHA supplementation protected female—but not male—offspring against high-calorie diet-induced glucose intolerance.

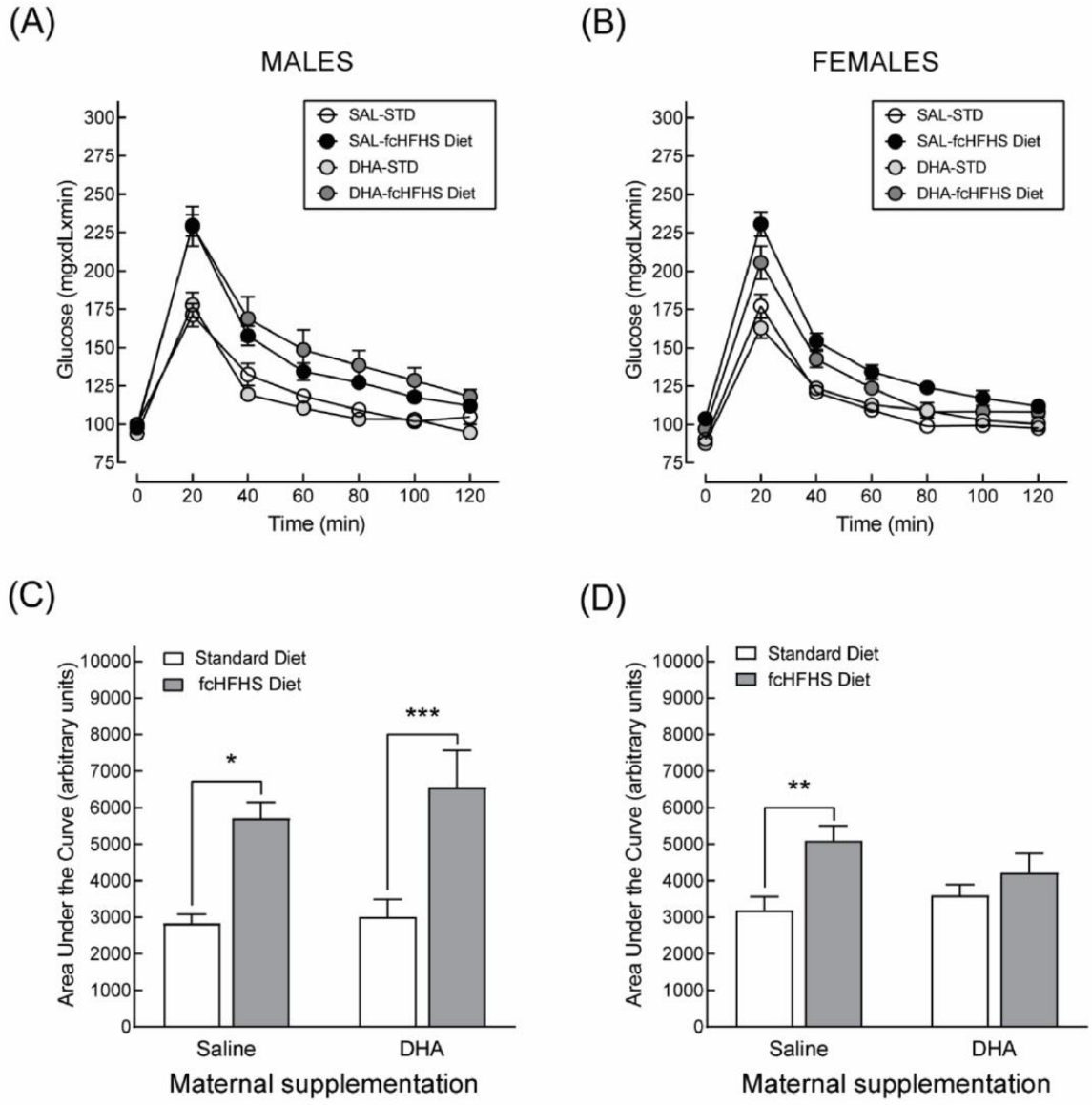


Figure 7. Long-term protective effects of maternal supplementation with DHA during gestation and lactation against high-calorie diet induced glucose intolerance. Data correspond to the curves (**A**,**B**) and the areas under the curves (**C**,**D**) derived from an oral glucose tolerance test performed in 6-month-old male and female rats born to saline or DHA supplemented dams. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; (Student's *t*-test).

3.3.2. Hepatic Liver Accumulation

Maternal DHA supplementation also protected both male and female 6-month-old animals from the accumulation of hepatic triglycerides induced by the consumption of the fcHFHS diet (Figure 8A,B). Nevertheless, sex differences were observed in liver cholesterol, both in response to maternal DHA supplementation and in response to the fcHFHS diet. Namely, obese male animals showed an increase in hepatic cholesterol levels that was partially ameliorated by maternal DHA supplementation (Figure 8C).

In contrast, control and obese female rats born to saline-supplemented dams exhibited the same accumulation of cholesterol (Figure 8D). Surprisingly, obese female rats from DHA-supplemented dams showed a greater concentration of hepatic cholesterol than their non-obese, DHA-supplemented counterparts. However, these levels were still lower than those of female rats from the SAL-STD and SAL-fcHFHS diet groups (Figure 8D).

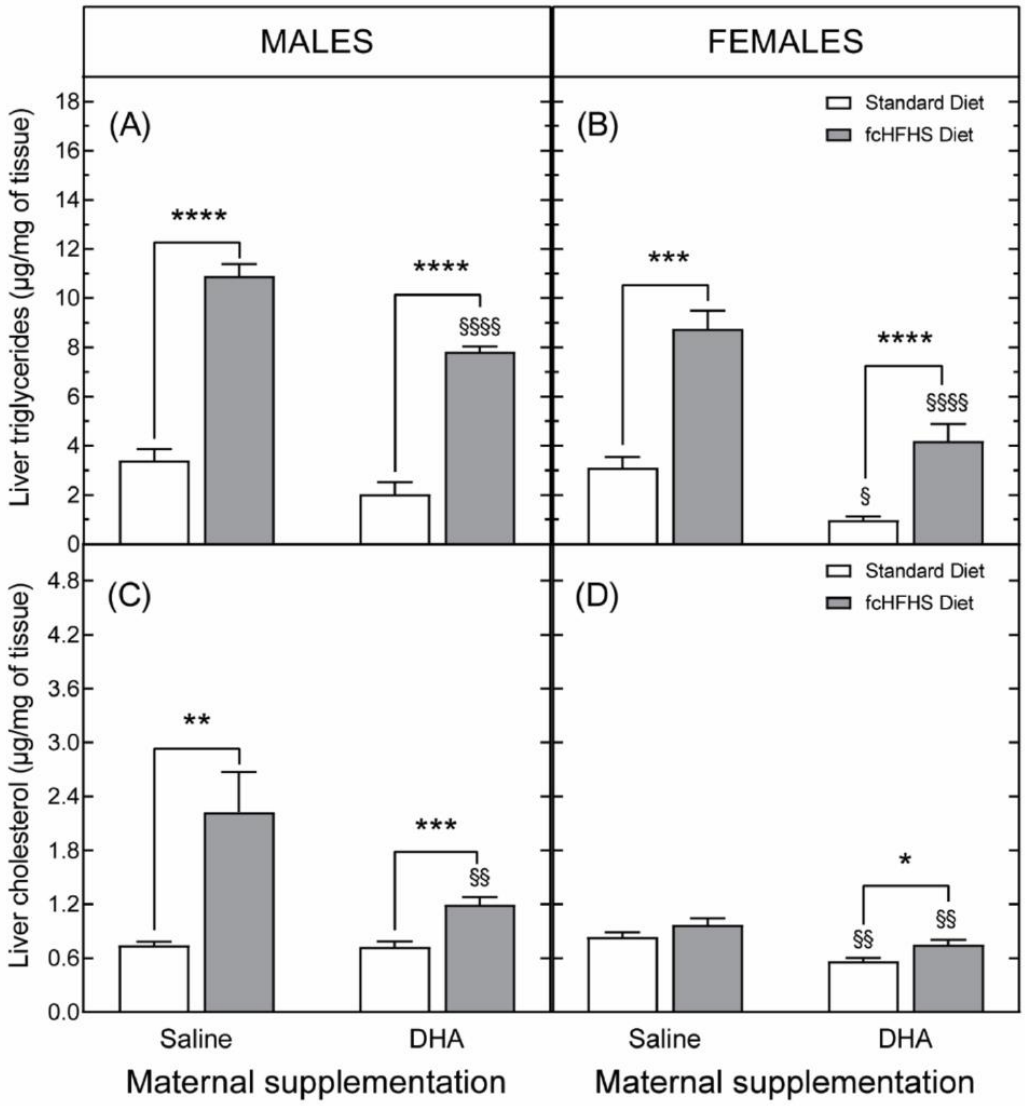


Figure 8. Long-term protective effects of DHA maternal supplementation during gestation and lactation against hepatic steatosis in the offspring. Data correspond to the concentrations of triglycerides (**A**,**B**) and cholesterol (**C**,**D**), determined in livers from 6-month-old male and female rats born to saline- or DHA-supplemented dams. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§§ $p < 0.0001$ compared to rats born to saline-supplemented dams exposed to the same diet (standard chow or fcHFHS diet) after weaning (two-way ANOVA).

3.3.3. Hepatic Gene Expression

Finally, in agreement with the results obtained in 3-month-old animals, there was a reduction in the hepatic expression levels of genes regulating beta oxidation in both males (Figure 9) and females (Figure 10).

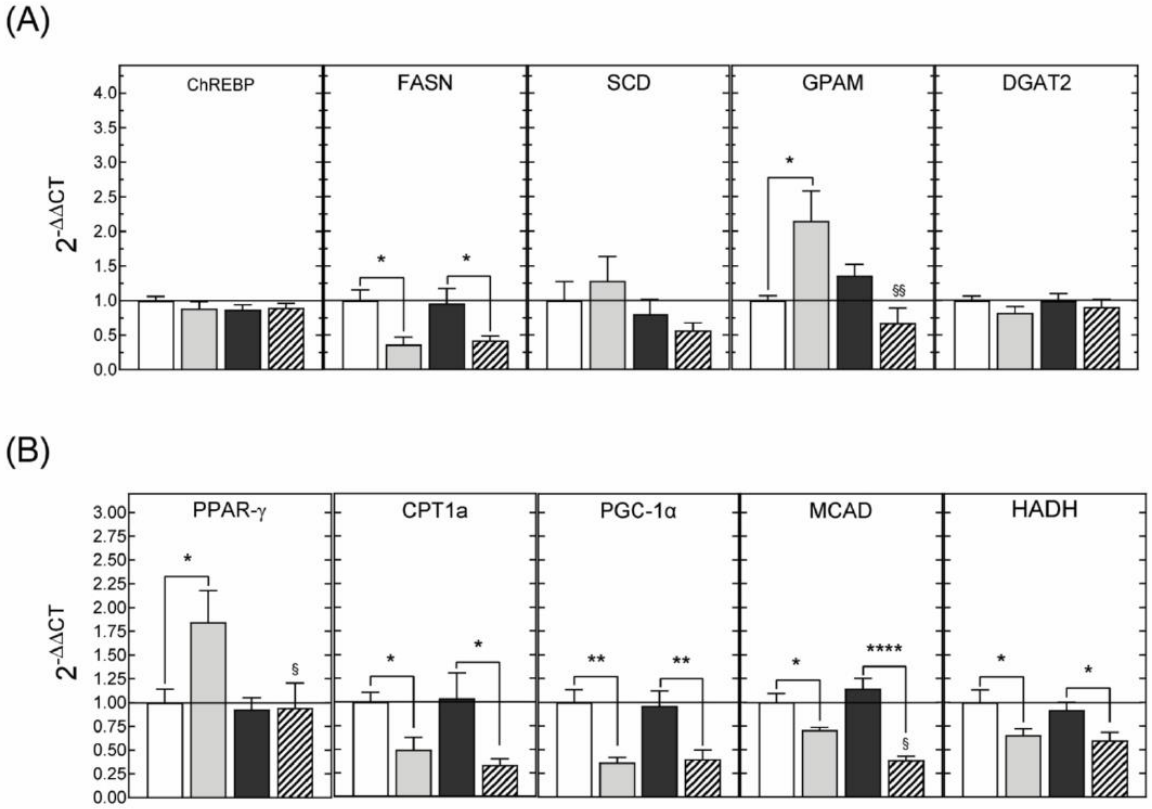


Figure 9. Expression levels of mRNAs encoding proteins involved in de novo lipogenesis (**A**) or fatty acid oxidation (**B**) in liver samples from 6-month-old male rats born to dams supplemented with saline or with DHA during gestation and lactation. The offspring were fed standard chow or rendered obese by exposure to a fcHFHS diet from weaning. Variations in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the expression in animals of the SAL-STD group (white bars) as a calibrator. Grey bars, SAL-fcHFHS group; black bars, DHA-STD group; stripped bars, DHA-fcHFHS diet group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$ §§ $p < 0.01$ compared to animals born to saline supplemented dams that were exposed to the same diet (standard or fcHFHS diet), after weaning (two-way ANOVA with maternal supplementation and postnatal diet as factors).

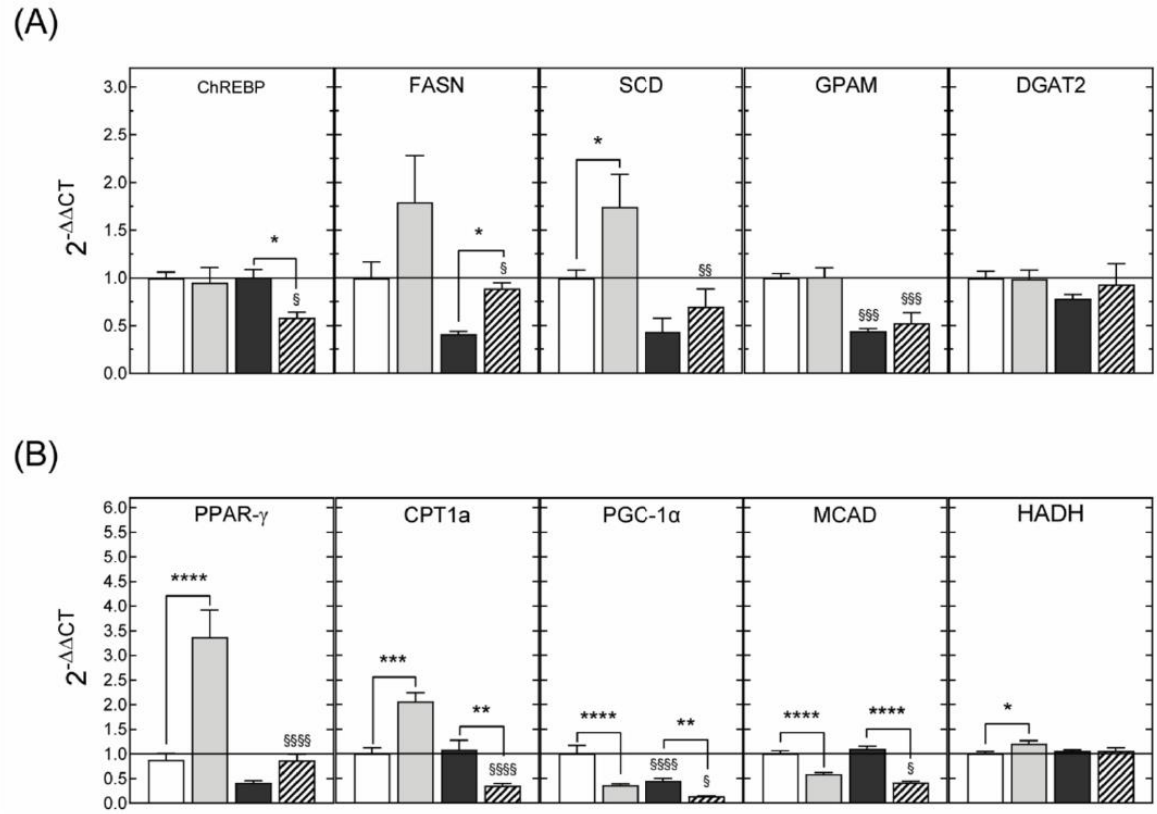


Figure 10. Expression levels of mRNAs encoding proteins involved in de novo lipogenesis (**A**) or fatty acid oxidation (**B**) in liver samples from 6-month-old female rats born to dams supplemented with saline or with DHA during gestation and lactation. The offspring were fed standard chow or rendered obese by exposure to a fcHFHS diet from weaning. Variations in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the expression in animals of the SAL-STD group (white bars) as a calibrator. Grey bars, SAL-fcHFHS group; black bars, DHA-STD group; stripped bars, DHA-fcHFHS diet group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Student's *t*-test); § $p < 0.05$ §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$; §§§§ $p < 0.0001$ compared to animals born to saline supplemented dams that were exposed to the same diet (standard or fcHFHS diet), after weaning (two-way ANOVA with maternal supplementation and postnatal diet as factors).

4. Discussion

The prevalence of obesity is increasing throughout the world, making this disorder a major public health concern. Although obesity is eventually the result of an imbalance between energy consumption and energy expenditure, numerous epidemiological and experimental studies have shown that the nutritional environment during gestation and during the very first stages of postnatal life plays a key role in determining susceptibility to obesity, as well as to developing metabolic pathologies in adulthood. The aim of this study was to investigate to what extent maternal DHA supplementation during gestation and lactation in the rat protects the offspring against metabolic disorders induced by a high-calorie diet. We focused on DHA because supplementation with this polyunsaturated fatty acid is a common clinical practice used for pregnant women [10,12,13]. Furthermore, it has been shown that the consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reduces body weight [17,18], decreases blood triglyceride levels [36,37], improves carbohydrate homeostasis [38,39], and limits increases in body fat and the development of hepatic steatosis when consuming a high fat diet [20,21]. Based on these observations, we hypothesized

that maternal DHA supplementation could positively program the metabolism of the offspring, allowing them to better cope with an obesogenic diet.

Evaluation of the anthropometric characteristics and blood metabolic profile of animals exposed to the fcHFHSD diet from weaning showed that maternal DHA supplementation did not reduce weight gain, fat mass accumulation or the increase in circulating triglyceride levels induced by consumption of a hypercaloric diet. In contrast, obese rats from DHA-supplemented dams showed lower levels of triglycerides and cholesterol in the liver and better glucose tolerance than their saline-supplemented counterparts. These results show that maternal DHA supplementation induces physiological changes in the offspring that are protective against the development of hepatic steatosis and glucose intolerance induced by high-calorie feeding.

Our observations on the lack of effect of maternal DHA supplementation on body weight, body fat, and blood triglycerides in the offspring were consistent with the results of previous studies in humans [40–42] and rats [43] showing that the intake of omega-3 PUFAs during the perinatal period had no influence on these parameters. It should be noted, however, that some human studies have documented an inverse relationship between maternal circulating levels of n-3 PUFAs and both body and abdominal fat mass in the offspring [44,45]. These divergent results may be explained in part by differences in the methods of n-3 long chain (LC)-PUFAs supplementation, variability in the techniques used to document body measurements, and the age at which these measurements were made. Additionally, the existence of genetic polymorphisms in the fatty acid desaturase (FADS) gene that catalyze the biosynthesis of unsaturated fatty acids (HUFAs) from PUFAs could be a factor [46].

Animals of the SAL-fcHFHS diet group, had a clear obese phenotype and high serum insulin levels but displayed identical blood glucose concentrations to those of the SAL-STD group both under ad libitum feeding conditions and after fasting. A lack of correlation between circulating glucose levels and the increase in body fat induced by the consumption of a high-fat or high-sugar diet has been reported by other authors [47,48]. It has been suggested that this dissociation could be explained by differences in the composition of the diet or by the level of propagation of insulin resistance, i.e., only in the liver or in the liver and at the peripheral level (skeletal muscle). Alternatively, in our experiments, the obesity-associated hyperglycemia could be masked by circadian variations in blood glucose levels that are at their peak during the early hours of the dark cycle [49], i.e., the time at which the animals were sacrificed. Additional studies are needed to determine which of these two mechanisms underpin our results.

The protective effects of maternal DHA supplementation against glucose intolerance in obese animals was accompanied by a decrease in serum insulin levels, suggesting that maternal DHA supplementation might protect the offspring from developing glucose intolerance by increasing insulin sensitivity. It is also worth noting that non-obese animals from DHA-supplemented dams displayed elevated insulin levels compared to non-obese animals from saline-supplemented dams. The enhanced release of insulin under acute exposure to DHA is well documented [50,51], and is generally accepted as the principal mechanism of the beneficial effects of DHA on insulin resistance. Our results therefore indicated that the protective effects of maternal DHA supplementation against the fcHFHS diet-induced glucose intolerance might also be underpinned by a DHA insulinotropic action.

Feeding a high-calorie diet leads to the development of hepatic steatosis. The accumulation of lipids, mainly in the form of triglycerides, which characterizes this pathological condition, is the consequence of the alteration of one or more liver metabolic processes including excessive lipid entry from the diet, increased de novo fatty acid synthesis, impaired lipid export into the bloodstream, and reduced metabolism through β-oxidation [52,53]. It is generally agreed that the protective effects of the consumption of DHA against the development of hepatic steatosis result mainly from the inhibition of lipogenesis combined with an increase in β-oxidation [25,54,55]. To determine whether the reduction of hepatic steatosis in animals of the DHA-fcHFHS diet group could be explained by the same mecha-

nisms, we assessed the hepatic expression of several genes involved in the regulation of these metabolic pathways using real time PCR. The results of these experiments showed that maternal DHA supplementation blocked the fcHFHS diet-induced increase in the expression of lipogenesis-promoting genes and reduced the levels of mRNAs-encoding genes that positively regulate triglyceride synthesis in both obese and non-obese 3-month-old animals. Therefore, the same mechanisms, operating against hepatic steatosis after the dietary consumption of DHA, seem to be activated in adult offspring rats born to DHA-supplemented dams, despite the fact that they displayed identical circulating DHA levels to animals from non-supplemented dams.

However, in contrast to reports in the literature indicating that omega-3 fatty acids promote lipid oxidation [25,55], the RT-PCR analyses that we carried out showed that maternal DHA supplementation resulted in reduced hepatic expression of genes involved in fatty acid oxidation. Several explanations can be put forward to account for these paradoxical observations. First, conflicting results exist about the impact of hepatic steatosis on the expression of genes regulating β-oxidation. For example, a decrease in CPT1a expression, coupled with enhanced long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) and HADH mRNAs levels, was detected in liver biopsies from patients with non-alcoholic fatty liver disease [56]. Inhibition of CPT1a expression is indicative of decreased β-oxidation, whereas the increased expression of LCAD and HADH suggested that lipid oxidation in these patients was enhanced. These contradictory results were consistent with other studies showing enhanced [57,58], decreased [59], or unchanged [60] fatty acid oxidation in the liver of patients with hepatic steatosis. Second, whether increased lipid oxidation in hepatic steatosis has beneficial effects at all has been challenged [61,62]. In fact, fatty liver has been associated with impaired mitochondrial activity, such that enhanced β-oxidation can lead to excessive production of reactive oxygen species (ROS) and the activation of fatty acid oxidation in cytochromes and peroxisomes and, therefore, to hepatic damage by oxidative stress and inflammation. Third, a comparative study of the β-oxidation capacity of DHA and EPA in the liver showed that EPA is much more effective in increasing mitochondrial fatty acid oxidation than DHA [63]. Since the fish oil-extract we used contains 7 times less EPA than DHA, our results could be explained by the low proportion of EPA in relation to DHA. Fourth, fatty acids derived from triglyceride lipolysis are converted to acetyl-CoA whose transformation by carboxylation to malonyl-CoA is the committed step in the de novo fatty acid synthesis. Yet, rats from DHA-supplemented dams also exhibited a reduced expression of the GPAM and DGAT2 genes whose enzymatic products catalyze triglyceride synthesis. Therefore, low levels of expression of genes regulating fatty acid oxidation could be a consequence of a reduction in the amount of substrate required to initiate β-oxidation. Finally, our results are consistent with other studies showing that EPA and DHA reduced HFD-induced hepatic steatosis without affecting the expression of genes involved in β-oxidation [64].

The deleterious effects of obesity increase with age [65,66] and differ by gender [67–69]. With the aim of determining the impact of these parameters on the protective effect of maternal DHA supplementation, in a second series of experiments, the metabolic characteristics of six-month-old male and female animals born to DHA-supplemented dams and subjected to the fcHFHS diet were analyzed. The results of these studies showed that the protective effects of maternal DHA supplementation against hepatic steatosis were common to both sexes. However, only female rats from DHA-supplemented dams were protected against the development of glucose intolerance associated with the exposure to the fcHFHS diet. This latter result could be interpreted as being evidence of sexual dimorphism in the effects of DHA, as reported in previous studies [70,71]. However, females are more insulin sensitive and glucose tolerant than males [72,73]. Thus, the lack of glucose intolerance in female rats in the DHA-fcHFHS diet group may also be linked to intrinsic metabolic differences between males and females. In support of this interpretation, exposure to the fcHFHS diet did not result in increased hepatic cholesterol levels in female rats from saline-supplemented dams, whereas in male animals exposed to the same

nutritional manipulations, hepatic cholesterol concentrations were significantly increased. Regarding the impact of aging, the results obtained in male animals indicated that the protective effects of maternal DHA supplementation against hepatic steatosis persisted with age, despite the greater accumulation of triglycerides and cholesterol in the liver in 6-month-old obese animals compared to 3-month-old rats of the same experimental group.

Notwithstanding the numerous human studies involving maternal DHA supplementation during pregnancy, very few animal studies have sought to determine the biochemical and molecular mechanisms underlying the putative beneficial effects of this nutritional intervention—particularly with regard to the metabolism of the offspring. To our knowledge, there have only been two studies in which the metabolic phenotype of offspring exposed in utero to DHA was investigated. In these studies, carried out in hamsters, it was shown that maternal consumption of an EPA/DHA-enriched diet during gestation and lactation protected the offspring against increases in plasma glucose levels, hepatic triglyceride secretion and lipemia induced by feeding a high-fat diet via the enhancement of tricarboxylic acid cycle efficiency [74,75]. However, in these studies, DHA was provided via the diet, in contrast to most clinical nutritional interventions, in which DHA is provided orally in well-defined amounts. The results presented herein thus extend and deepen the limited knowledge on the consequences of maternal DHA supplementation on the metabolism of the offspring by showing, on the one hand, the protective effects of this nutritional intervention against the development of glucose intolerance and hepatic steatosis associated with obesity and, on the other hand, the existence of sex-related differences in the effects of early life exposure to DHA.

It is remarkable that the inhibition of lipogenesis underlying the protective effects of DHA against fatty liver in obese individuals—as described in intervention studies in human and rodents [25,76,77]—also acts to prevent the development of high-calorie diet-induced hepatic steatosis when DHA supplementation is provided during development via the mother as shown in the present study. This lends our model and results a translational research value and raises the question of the mechanisms by which temporary exposure to DHA during embryogenesis and neonatal life downregulates the expression of lipogenic genes in the long term. The establishment of a particular epigenetic profile following the in utero/neonatal exposure to DHA could be one of these mechanisms. Actually, maternal DHA supplementation during the last trimester of pregnancy has been shown to increase methylation levels at the differentially methylated region (DMR) of insulin growth factor 2 (IGF2) in the offspring's cord blood mononuclear cells [78]. Likewise, lower methylation levels of differentially methylated regions located in genes involved in the regulation of lipid exchange, plasma membrane function, food intake, immune function, and neurodevelopment were detected in blood spots collected at birth from babies born to mothers supplemented with DHA from 20 weeks of gestation to delivery [79]. Interestingly, some of these changes were sex-dependent and persisted until 5 years of age. However, other studies failed to detect differences in DNA methylation levels in CD4 $\pm$ T-cells isolated from the cord blood of babies born to mothers that received DHA from 20 weeks of gestation until delivery [80]. In rodents, maternal DHA supplementation has been shown to restore intrauterine growth restriction-induced decreased levels of histone H4K20 methylation at the PPARγ promoter gene in the lung to normal values [81]. As an initial approach to determine if the protective effects of maternal DHA supplementation against the development of hepatic steatosis could involve a modification of the epigenome, we used western blot to examine two post-translational histone modifications related to transcriptional repression (H3K9me3 and H3K27me3) and two histone modifications related to transcriptional activation (H3K4me3 and H3K14me3). No differences in these epigenetic marks were detected between the different groups (unpublished observations). However, these negative results did not exclude the involvement of other epigenetic mechanisms (DNA methylation, miRNAs expression) in the protective effects of DHA.

5. Conclusions

In summary, the present study provided compiling evidence to show that maternal DHA supplementation in rats during pregnancy protected the offspring against glucose intolerance and hepatic steatosis induced by the consumption of a hypercaloric diet. The beneficial effects on glucose homeostasis declined with age in a sex-dependent manner. However, the preventive action against hepatic steatosis persisted at least until 6 months of age and was associated with decreased hepatic expression of lipogenic genes. These results indicate that maternal DHA supplementation during pregnancy can program a healthy metabolic state in the offspring which protects against the deleterious effects of an obesogenic diet. The involvement of epigenetic mechanisms in the beneficial programming action of DHA deserves further investigation.

Author Contributions: F.B.-J. and E.Z. conceived the study and designed the experiments. A.D.-A., S.O.H., L.A.R.C., C.E.M.-G. and J.A.G.-S. performed the experiments. M.C. performed the mass spectrometry analysis. A.D.-A., S.O.H., L.A.R.C., C.E.M.-G., M.C. analyzed the data. K.O. contributed with conceptual ideas. F.B.-J. wrote the original draft. F.B.-J. and E.Z. acquired the funding. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French National Research Agency (ANR, grant ANR-16-CE21-0007-01) and the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, award number 2015-16-273510).

Institutional Review Board Statement: All experiments were performed following the European Union Directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU) and according to the guidelines of the Declaration of Helsinki in an animal facility agreed by the French Veterinary Department (register number A44276), and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Pays de la Loire (authorization number 2017012013318453/APAFIS 8215).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: Amran Daher Abdi is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministry of Research and Innovation of the Government of the Republic of Djibouti. Sandra Olvera Hernández was supported by the program "Food for Tomorrow" of the French Region Pays de la Loire and the European Regional Development Fund (FEDER). Luis Reyes Castro received support from the EU in the framework of the Marie-Curie FP7 COFUND People Programme, through the award of an AgreenSkills fellowship. Carla Mezo González and Juan Antonio García-Santillán are supported by an international PhD fellowship from CONACYT. Authors are grateful to Blandine Castellano, Isabelle Grit and Agnès David for technical help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Godfrey, K.M.; Reynolds, R.M.; Prescott, S.L.; Nyirenda, M.; Jaddoe, V.W.V.; Eriksson, J.G.; Broekman, B.F.P. Influence of Maternal Obesity on the Long-Term Health of Offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2017**, *5*, 53–64. [CrossRef]
2. Victora, C.G.; Adair, L.; Fall, C.; Hallal, P.C.; Martorell, R.; Richter, L.; Sachdev, H.S. Maternal and Child Undernutrition Study Group Maternal and Child Undernutrition: Consequences for Adult Health and Human Capital. *Lancet* **2008**, *371*, 340–357. [CrossRef]
3. Edlow, A.G. Maternal Obesity and Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders in Offspring. *Prenat. Diagn.* **2017**, *37*, 95–110. [CrossRef]
4. Correia-Branco, A.; Keating, E.; Martel, F. Maternal Undernutrition and Fetal Developmental Programming of Obesity: The Glucocorticoid Connection. *Reprod. Sci.* **2015**, *22*, 138–145. [CrossRef]
5. Barker, D.J.P. The Developmental Origins of Chronic Adult Disease. *Acta Paediatr. Suppl.* **2004**, *93*, 26–33. [CrossRef]
6. Symonds, M.E.; Sebert, S.P.; Hyatt, M.A.; Budge, H. Nutritional Programming of the Metabolic Syndrome. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2009**, *5*, 604–610. [CrossRef]
7. Fernandez-Twinn, D.S.; Hjort, L.; Novakovic, B.; Ozanne, S.E.; Saffery, R. Intrauterine Programming of Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetologia* **2019**, *62*, 1789–1801. [CrossRef]

8. Castro-Rodríguez, D.C.; Rodríguez-González, G.L.; Menjivar, M.; Zambrano, E. Maternal Interventions to Prevent Adverse Fetal Programming Outcomes Due to Maternal Malnutrition: Evidence in Animal Models. *Placenta* **2020**, *102*, 49–54. [CrossRef]
9. Hsu, C.-N.; Tain, Y.-L. The Good, the Bad, and the Ugly of Pregnancy Nutrients and Developmental Programming of Adult Disease. *Nutrients* **2019**, *11*, 894. [CrossRef]
10. Koletzko, B.; Lien, E.; Agostoni, C.; Böhles, H.; Campoy, C.; Cetin, I.; Decsi, T.; Dudenhausen, J.W.; Dupont, C.; Forsyth, S.; et al. The Roles of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Pregnancy, Lactation and Infancy: Review of Current Knowledge and Consensus Recommendations. *J. Perinat. Med.* **2008**, *36*, 5–14. [CrossRef]
11. Hsu, M.-C.; Tung, C.-Y.; Chen, H.-E. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Prevention and Treatment of Maternal Depression: Putative Mechanism and Recommendation. *J. Affect Disord.* **2018**, *238*, 47–61. [CrossRef] [PubMed]
12. Guu, T.-W.; Mischoulon, D.; Sarris, J.; Hibbeln, J.; McNamara, R.K.; Hamazaki, K.; Freeman, M.P.; Maes, M.; Matsuoka, Y.J.; Belmaker, R.H.; et al. International Society for Nutritional Psychiatry Research Practice Guidelines for Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Major Depressive Disorder. *Psychother. Psychosom.* **2019**, *88*, 263–273. [CrossRef]
13. Carlson, S.E.; Gajewski, B.J.; Alhayek, S.; Colombo, J.; Kerling, E.H.; Gustafson, K.M. Dose-Response Relationship between Docosahexaenoic Acid (DHA) Intake and Lower Rates of Early Preterm Birth, Low Birth Weight and Very Low Birth Weight. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2018**, *138*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
14. Ryan, A.S.; Astwood, J.D.; Gautier, S.; Kuratko, C.N.; Nelson, E.B.; Salem, N. Effects of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Neurodevelopment in Childhood: A Review of Human Studies. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2010**, *82*, 305–314. [CrossRef]
15. Ramakrishnan, U.; Stein, A.D.; Parra-Cabrera, S.; Wang, M.; Imhoff-Kunsch, B.; Juárez-Márquez, S.; Rivera, J.; Martorell, R. Effects of Docosahexaenoic Acid Supplementation during Pregnancy on Gestational Age and Size at Birth: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Mexico. *Food Nutr. Bull.* **2010**, *31*, S108–S116. [CrossRef]
16. Makrides, M.; Gibson, R.A.; McPhee, A.J.; Yelland, L.; Quinlivan, J.; Ryan, P. DOMInO Investigative Team Effect of DHA Supplementation during Pregnancy on Maternal Depression and Neurodevelopment of Young Children: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2010**, *304*, 1675–1683. [CrossRef]
17. 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. [CrossRef]
18. 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. [CrossRef]
19. Backes, J.; Anzalone, D.; Hilleman, D.; Catini, J. The Clinical Relevance of Omega-3 Fatty Acids in the Management of Hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 118. [CrossRef]
20. Spooner, M.H.; Jump, D.B. 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*, 103–110. [CrossRef] [PubMed]
21. Hong, L.; Zahradka, P.; Cordero-Monroy, L.; Wright, B.; Taylor, C.G. Dietary Docosahexaenoic Acid (DHA) and Eicosapentaenoic Acid (EPA) Operate by Different Mechanisms to Modulate Hepatic Steatosis and Hyperinsulemia in Fa/Fa Zucker Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 917. [CrossRef]
22. Harris, W.S.; Bulchandani, D. Why Do Omega-3 Fatty Acids Lower Serum Triglycerides? *Curr. Opin. Lipidol.* **2006**, *17*, 387–393. [CrossRef]
23. Shearer, G.C.; Savinova, O.V.; Harris, W.S. Fish Oil—How Does It Reduce Plasma Triglycerides? *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 843–851. [CrossRef] [PubMed]
24. Oscarsson, J.; Hurt-Camejo, E. Omega-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Their Mechanisms of Action on Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins in Humans: A Review. *Lipids Health Dis.* **2017**, *16*, 149. [CrossRef] [PubMed]
25. Green, C.J.; Pramfalk, C.; Charlton, C.A.; Gunn, P.J.; Cornfield, T.; Pavlides, M.; Karpe, F.; Hodson, L. Hepatic de Novo Lipogenesis Is Suppressed and Fat Oxidation Is Increased by Omega-3 Fatty Acids at the Expense of Glucose Metabolism. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2020**, *8*, e000871. [CrossRef]
26. Grevengoed, T.J.; Trammell, S.A.; Svenningsen, J.S.; Makarov, M.V.; Nielsen, T.S.; Jacobsen, J.C.B.; Treebak, J.T.; Calder, P.C.; Migaud, M.E.; Cravatt, B.F.; et al. An Abundant Biliary Metabolite Derived from Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Regulates Triglycerides. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, 143861. [CrossRef]
27. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Ward, L.C.; Brown, L. Effects of ALA, EPA and DHA in High-Carbohydrate, High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1041–1052. [CrossRef]
28. Ruzickova, J.; Rossmeisl, M.; Prazak, T.; Flachs, P.; Sponarova, J.; Veck, M.; Tvrzicka, E.; Bryhn, M.; Kopecky, J. Omega-3 PUFA of Marine Origin Limit Diet-Induced Obesity in Mice by Reducing Cellularity of Adipose Tissue. *Lipids* **2004**, *39*, 1177–1185. [CrossRef]
29. La Fleur, S.E.; van Rozen, A.J.; Luijendijk, M.C.M.; Groeneweg, F.; Adan, R.a.H. A Free-Choice High-Fat High-Sugar Diet Induces Changes in Arcuate Neuropeptide Expression That Support Hyperphagia. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 537–546. [CrossRef]
30. Burdge, G.C.; Sherman, R.C.; Ali, Z.; Wootton, S.A.; Jackson, A.A. Docosahexaenoic Acid Is Selectively Enriched in Plasma Phospholipids during Pregnancy in Trinidadian Women–Results of a Pilot Study. *Reprod. Nutr. Dev.* **2006**, *46*, 63–67. [CrossRef] [PubMed]

31. Stewart, F.; Rodie, V.A.; Ramsay, J.E.; Greer, I.A.; Freeman, D.J.; Meyer, B.J. Longitudinal Assessment of Erythrocyte Fatty Acid Composition throughout Pregnancy and Post Partum. *Lipids* **2007**, *42*, 335–344. [CrossRef] [PubMed]
32. Childs, C.E.; Hoile, S.P.; Burdge, G.C.; Calder, P.C. Changes in Rat N-3 and n-6 Fatty Acid Composition during Pregnancy Are Associated with Progesterone Concentrations and Hepatic FADS2 Expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2012**, *86*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
33. Chen, Z.-Y.; Yang, J.; Cunnane, S.C. Gestational Hyperlipidemia in the Rat Is Characterized by Accumulation of n −6 and n −3 Fatty Acids, Especially Docosahexaenoic Acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1127*, 263–269. [CrossRef]
34. Luo, X.; He, Z.; Sun, X.; Gu, X.; Zhang, W.; Gao, J.; Li, X.; Jia, R.; Wei, J.; Yu, Y.; et al. DHA Protects Against Hepatic Steatosis by Activating Sirt1 in a High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mouse Model. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 185–196. [CrossRef]
35. Valenzuela, R.; Videla, L.A. Impact of the Co-Administration of N-3 Fatty Acids and Olive Oil Components in Preclinical Nonalcoholic Fatty Liver Disease Models: A Mechanistic View. *Nutrients* **2020**, *12*, 499. [CrossRef]
36. Skulas-Ray, A.C.; Wilson, P.W.F.; Harris, W.S.; Brinton, E.A.; Kris-Etherton, P.M.; Richter, C.K.; Jacobson, T.A.; Engler, M.B.; Miller, M.; Robinson, J.G.; et al. Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation* **2019**, *140*, e673–e691. [CrossRef]
37. Bradberry, J.C.; Hilleman, D.E. Overview of Omega-3 Fatty Acid Therapies. *Pharm. Ther.* **2013**, *38*, 681–691.
38. Dangardt, F.; Chen, Y.; Gronowitz, E.; Dahlgren, J.; Friberg, P.; Strandvik, B. High Physiological Omega-3 Fatty Acid Supplementation Affects Muscle Fatty Acid Composition and Glucose and Insulin Homeostasis in Obese Adolescents. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *2012*, 395757. [CrossRef]
39. Storlien, L.H.; Kraegen, E.W.; Chisholm, D.J.; Ford, G.L.; Bruce, D.G.; Pascoe, W.S. Fish Oil Prevents Insulin Resistance Induced by High-Fat Feeding in Rats. *Science* **1987**, *237*, 885–888. [CrossRef]
40. Vahdaninia, M.; Mackenzie, H.; Dean, T.; Helps, S. The Effectiveness of ω-3 Polyunsaturated Fatty Acid Interventions during Pregnancy on Obesity Measures in the Offspring: An up-to-Date Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 2597–2613. [CrossRef]
41. Gonzalez-Casanova, I.; Stein, A.D.; Hao, W.; Garcia-Feregrino, R.; Barraza-Villarreal, A.; Romieu, I.; Rivera, J.A.; Martorell, R.; Ramakrishnan, U. Prenatal Supplementation with Docosahexaenoic Acid Has No Effect on Growth through 60 Months of Age. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1330–1334. [CrossRef]
42. Gutierrez-Gomez, Y.; Stein, A.D.; Ramakrishnan, U.; Barraza-Villarreal, A.; Moreno-Macias, H.; Aguilar-Salinas, C.; Romieu, I.; Rivera, J.A. Prenatal Docosahexaenoic Acid Supplementation Does Not Affect Nonfasting Serum Lipid and Glucose Concentrations of Offspring at 4 Years of Age in a Follow-Up of a Randomized Controlled Clinical Trial in Mexico. *J. Nutr.* **2017**, *147*, 242–247. [CrossRef]
43. Muhlhausler, B.S.; Miljkovic, D.; Fong, L.; Xian, C.J.; Duthoit, E.; Gibson, R.A. Maternal Omega-3 Supplementation Increases Fat Mass in Male and Female Rat Offspring. *Front. Genet.* **2011**, *2*, 48. [CrossRef]
44. Vidakovic, A.J.; Gishti, O.; Voortman, T.; Felix, J.F.; Williams, M.A.; Hofman, A.; Demmelmair, H.; Koletzko, B.; Tiemeier, H.; Jaddoe, V.W.V.; et al. Maternal Plasma PUFA Concentrations during Pregnancy and Childhood Adiposity: The Generation R Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 1017–1025. [CrossRef]
45. Donahue, S.M.A.; Rifas-Shiman, S.L.; Gold, D.R.; Jouni, Z.E.; Gillman, M.W.; Oken, E. Prenatal Fatty Acid Status and Child Adiposity at Age 3 y: Results from a US Pregnancy Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 780–788. [CrossRef]
46. Gonzalez-Casanova, I.; Rzehak, P.; Stein, A.D.; Garcia Feregrino, R.; Rivera Dommarco, J.A.; Barraza-Villarreal, A.; Demmelmair, H.; Romieu, I.; Villalpando, S.; Martorell, R.; et al. Maternal Single Nucleotide Polymorphisms in the Fatty Acid Desaturase 1 and 2 Coding Regions Modify the Impact of Prenatal Supplementation with DHA on Birth Weight. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 1171–1178. [CrossRef] [PubMed]
47. La Fleur, S.E.; Luijendijk, M.C.M.; van Rozen, A.J.; Kalsbeek, A.; Adan, R.a.H. A Free-Choice High-Fat High-Sugar Diet Induces Glucose Intolerance and Insulin Unresponsiveness to a Glucose Load Not Explained by Obesity. *Int. J. Obes.* **2011**, *35*, 595–604. [CrossRef] [PubMed]
48. Diepenbroek, C.; Eggels, L.; Ackermans, M.T.; Fliers, E.; Kalsbeek, A.; Serlie, M.J.; la Fleur, S.E. Differential Effects of Hypercaloric Choice Diets on Insulin Sensitivity in Rats. *J. Endocrinol.* **2017**, *232*, 49–57. [CrossRef] [PubMed]
49. La Fleur, S.E.; Kalsbeek, A.; Wortel, J.; Buijs, R.M. A Suprachiasmatic Nucleus Generated Rhythm in Basal Glucose Concentrations. *J. Neuroendocr.* **1999**, *11*, 643–652. [CrossRef]
50. Bhaswant, M.; Poudyal, H.; Brown, L. Mechanisms of Enhanced Insulin Secretion and Sensitivity with N-3 Unsaturated Fatty Acids. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 571–584. [CrossRef]
51. Bai, T.; Yang, H.; Wang, H.; Zhi, L.; Liu, T.; Cui, L.; Liu, W.; Wang, Y.; Zhang, M.; Liu, Y.; et al. Inhibition of Voltage-Gated K± Channels Mediates Docosahexaenoic Acid-Stimulated Insulin Secretion in Rat Pancreatic β-Cells. *Food Funct.* **2020**, *11*, 8893–8904. [CrossRef]
52. Alves-Bezerra, M.; Cohen, D.E. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* **2017**, *8*, 1–8. [CrossRef]
53. Loomba, R.; Friedman, S.L.; Shulman, G.I. Mechanisms and Disease Consequences of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell* **2021**, *184*, 2537–2564. [CrossRef] [PubMed]
54. Scorletti, E.; Byrne, C.D. Omega-3 Fatty Acids, Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **2013**, *33*, 231–248. [CrossRef] [PubMed]

55. Kim, H.-J.; Lee, K.-T.; Park, Y.B.; Jeon, S.-M.; Choi, M.-S. Dietary Docosahexaenoic Acid-Rich Diacylglycerols Ameliorate Hepatic Steatosis and Alter Hepatic Gene Expressions in C57BL/6J-Lep(Ob/Ob) Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 965–973. [CrossRef] [PubMed]
56. Kohjima, M.; Enjoji, M.; Higuchi, N.; Kato, M.; Kotoh, K.; Yoshimoto, T.; Fujino, T.; Yada, M.; Yada, R.; Harada, N.; et al. Re-Evaluation of Fatty Acid Metabolism-Related Gene Expression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *20*, 351–358. [CrossRef] [PubMed]
57. Dasarathy, S.; Kasumov, T.; Edmison, J.M.; Gruca, L.L.; Bennett, C.; Duenas, C.; Marczewski, S.; McCullough, A.J.; Hanson, R.W.; Kalhan, S.C. Glycine and Urea Kinetics in Nonalcoholic Steatohepatitis in Human: Effect of Intralipid Infusion. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol* **2009**, *297*, G567–G575. [CrossRef]
58. Bugianesi, E.; Gastaldelli, A.; Vanni, E.; Gambino, R.; Cassader, M.; Baldi, S.; Ponti, V.; Pagano, G.; Ferrannini, E.; Rizzetto, M. Insulin Resistance in Non-Diabetic Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Sites and Mechanisms. *Diabetologia* **2005**, *48*, 634–642. [CrossRef]
59. Croci, I.; Byrne, N.M.; Choquette, S.; Hills, A.P.; Chachay, V.S.; Clouston, A.D.; O'Moore-Sullivan, T.M.; Macdonald, G.A.; Prins, J.B.; Hickman, I.J. Whole-Body Substrate Metabolism Is Associated with Disease Severity in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gut* **2013**, *62*, 1625–1633. [CrossRef]
60. Kotronen, A.; Seppälä-Lindroos, A.; Vehkavaara, S.; Bergholm, R.; Frayn, K.N.; Fielding, B.A.; Yki-Järvinen, H. Liver Fat and Lipid Oxidation in Humans. *Liver Int.* **2009**, *29*, 1439–1446. [CrossRef]
61. Chen, Z.; Tian, R.; She, Z.; Cai, J.; Li, H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *152*, 116–141. [CrossRef] [PubMed]
62. Ipsen, D.H.; Lykkesfeldt, J.; Tveden-Nyborg, P. Molecular Mechanisms of Hepatic Lipid Accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 3313–3327. [CrossRef]
63. Madsen, L.; Rustan, A.C.; Vaagenes, H.; Berge, K.; Dyrøy, E.; Berge, R.K. Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid Affect Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in Relation to Substrate Preference. *Lipids* **1999**, *34*, 951–963. [CrossRef]
64. Suzuki-Kemuriyama, N.; Matsuzaka, T.; Kuba, M.; Ohno, H.; Han, S.; Takeuchi, Y.; Isaka, M.; Kobayashi, K.; Iwasaki, H.; Yatoh, S.; et al. Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157580. [CrossRef]
65. Rillamas-Sun, E.; LaCroix, A.Z.; Waring, M.E.; Kroenke, C.H.; LaMonte, M.J.; Vitolins, M.Z.; Seguin, R.; Bell, C.L.; Gass, M.; Manini, T.M.; et al. Obesity and Late-Age Survival without Major Disease or Disability in Older Women. *JAMA Intern. Med.* **2014**, *174*, 98–106. [CrossRef]
66. Tucsek, Z.; Toth, P.; Tarantini, S.; Sosnowska, D.; Gautam, T.; Warrington, J.P.; Giles, C.B.; Wren, J.D.; Koller, A.; Ballabh, P.; et al. Aging Exacerbates Obesity-Induced Cerebromicrovascular Rarefaction, Neurovascular Uncoupling, and Cognitive Decline in Mice. *J. Gerontol. Ser. A* **2014**, *69*, 1339–1352. [CrossRef]
67. Zore, T.; Palafox, M.; Reue, K. Sex Differences in Obesity, Lipid Metabolism, and Inflammation-A Role for the Sex Chromosomes? *Mol. Metab.* **2018**, *15*, 35–44. [CrossRef]
68. Link, J.C.; Reue, K. Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2017**, *37*, 225–245. [CrossRef] [PubMed]
69. Nadal-Casellas, A.; Proenza, A.M.; Lladó, I.; Gianotti, M. Sex-Dependent Differences in Rat Hepatic Lipid Accumulation and Insulin Sensitivity in Response to Diet-Induced Obesity. *Biochem. Cell Biol.* **2012**, *90*, 164–172. [CrossRef] [PubMed]
70. Davis, D.J.; Hecht, P.M.; Jasarevic, E.; Beversdorf, D.Q.; Will, M.J.; Fritsche, K.; Gillespie, C.H. Sex-Specific Effects of Docosahexaenoic Acid (DHA) on the Microbiome and Behavior of Socially-Isolated Mice. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *59*, 38–48. [CrossRef]
71. Mendonça, A.M.; Cayer, L.G.J.; Pauls, S.D.; Winter, T.; Leng, S.; Taylor, C.G.; Zahradka, P.; Aukema, H.M. Distinct Effects of Dietary ALA, EPA and DHA on Rat Adipose Oxylipins Vary by Depot Location and Sex. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2018**, *129*, 13–24. [CrossRef] [PubMed]
72. Tramunt, B.; Smati, S.; Grandgeorge, N.; Lenfant, F.; Arnal, J.-F.; Montagner, A.; Gourdy, P. Sex Differences in Metabolic Regulation and Diabetes Susceptibility. *Diabetologia* **2020**, *63*, 453–461. [CrossRef]
73. Blaak, E. Sex Differences in the Control of Glucose Homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2008**, *11*, 500–504. [CrossRef] [PubMed]
74. Kasbi-Chadli, F.; Ferchaud-Roucher, V.; Krempf, M.; Ouguerram, K. Direct and Maternal N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Improved Triglyceridemia and Glycemia through the Regulation of Hepatic and Muscle Sphingolipid Synthesis in Offspring Hamsters Fed a High-Fat Diet. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 589–599. [CrossRef]
75. Kasbi-Chadli, F.; Boquien, C.-Y.; Simard, G.; Ulmann, L.; Mimouni, V.; Leray, V.; Meynier, A.; Ferchaud-Roucher, V.; Champ, M.; Nguyen, P.; et al. Maternal Supplementation with N-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Perinatal Period Alleviates the Metabolic Syndrome Disturbances in Adult Hamster Pups Fed a High-Fat Diet after Weaning. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 726–733. [CrossRef]
76. Sun, C.; Wei, Z.; Li, Y. DHA Regulates Lipogenesis and Lipolysis Genes in Mice Adipose and Liver. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 731–737. [CrossRef]

77. Okada, L.S.D.R.R.; Oliveira, C.P.; Stefano, J.T.; Nogueira, M.A.; da Silva, I.D.C.G.; Cordeiro, F.B.; Alves, V.A.F.; Torrinhas, R.S.; Carrilho, F.J.; Puri, P.; et al. Omega-3 PUFA Modulate Lipogenesis, ER Stress, and Mitochondrial Dysfunction Markers in NASH—Proteomic and Lipidomic Insight. *Clin. Nutr.* **2018**, *37*, 1474–1484. [CrossRef]
78. Lee, H.-S.; Barraza-Villarreal, A.; Biessy, C.; Duarte-Salles, T.; Sly, P.D.; Ramakrishnan, U.; Rivera, J.; Herceg, Z.; Romieu, I. Dietary Supplementation with Polyunsaturated Fatty Acid during Pregnancy Modulates DNA Methylation at IGF2/H19 Imprinted Genes and Growth of Infants. *Physiol. Genom.* **2014**, *46*, 851–857. [CrossRef]
79. Van Dijk, S.J.; Zhou, J.; Peters, T.J.; Buckley, M.; Sutcliffe, B.; Oytam, Y.; Gibson, R.A.; McPhee, A.; Yelland, L.N.; Makrides, M.; et al. Effect of Prenatal DHA Supplementation on the Infant Epigenome: Results from a Randomized Controlled Trial. *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 114. [CrossRef]
80. Amarasekera, M.; Noakes, P.; Strickland, D.; Saffery, R.; Martino, D.J.; Prescott, S.L. Epigenome-Wide Analysis of Neonatal CD4(±) T-Cell DNA Methylation Sites Potentially Affected by Maternal Fish Oil Supplementation. *Epigenetics* **2014**, *9*, 1570–1576. [CrossRef]
81. Joss-Moore, L.A.; Wang, Y.; Baack, M.L.; Yao, J.; Norris, A.W.; Yu, X.; Callaway, C.W.; McKnight, R.A.; Albertine, K.H.; Lane, R.H. IUGR Decreases PPARγ and SETD8 Expression in Neonatal Rat Lung and These Effects Are Ameliorated by Maternal DHA Supplementation. *Early Hum. Dev.* **2010**, *86*, 785–791. [CrossRef]

NUTRITIONAL NEUROSCIENCE
https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1920678

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

Adult rats from undernourished dams show sex-dependent impaired expression in taste papillae and hypothalamus of genes responsible for sweet and fat detection and signalling

Sandra Olvera Hernández[a]*, Luis Antonio Reyes Castro[a,b], Amran Daher Abdi[a], Carla Elena Mezo-González[a], Armando Arredondo[c], Elena Zambrano[b] and Francisco Bolaños-Jiménez[a]

[a]UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRAE – Université de Nantes, 44096 Nantes France; [b]Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México; [c]National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, México

ABSTRACT

Aim: Individuals undernourished in utero or during early life are at high risk of developing obesity and metabolic disorders and show an increased preference for consuming sugary and fatty food. This study aimed at determining whether impaired taste detection and signalling in the lingual epithelium and the brain might contribute to this altered pattern of food intake.

Methods: The preference for feeding fat and sweet food and the expression in circumvallate papillae and hypothalamus of genes coding for sweet and fat receptors and transducing pathways were evaluated in adult rats born to control or calorie-restricted dams. Expression in the hypothalamus and the brain's reward system of genes involved in the homeostatic and hedonic control of food intake was also determined.

Results: Male and female undernourished animals exhibited increased expression in taste papillae and hypothalamus of T1R1, T1R2, CD36, gustducin, TRMP5 and PLC-β2 genes, all of which modulate sweet and fat detection and intracellular signalling. However, the severity of the effect was greater in females than in males. Moreover, male, but not female, undernourished rats consumed more standard and sweetened food than their control counterparts and presented increased hypothalamic AgRP and NPY mRNAs levels together with enhanced dopamine transporter and dopamine receptor D2 expression in the ventral tegmental area.

Conclusions: Maternal undernutrition induces sex-specific changes in food preferences and gene expression in taste papillae, hypothalamus and brain reward regions. The gene expression alterations in the male offspring are in line with their preference for consuming sugary and fatty food.

KEYWORDS
Metabolic programming; taste receptors; food preferences; hypothalamus; taste papillae; sex differences; maternal undernutrition; rat

Introduction

Maternal undernutrition leading to foetal undernutrition and low birth body weight occurs widely throughout the world. Foetal undernutrition also results from placental insufficiency, a major obstetric problem. Human epidemiological and carefully controlled experimental animal studies show that maternal undernutrition increases the risk of developing obesity and metabolic syndrome in the offspring via a metabolic programming process (see [1–3] and therein cited references for a complete description of this concept). The enhanced risk of metabolic disease exhibited by in utero malnourished individuals becomes evident under exposure to high-calorie diets, often evolves with age, is sex-dependent, may be transgenerational in nature and has been associated with a preference for consuming fatty and sugary food [4–6]. Experimental studies in rodents have further shown that, in addition to favouring the ingestion of high-calorie food [7,8], in utero/neonatal undernutrition induces hyperphagia which is associated with enhanced hypothalamic expression of the orexigenic peptides AgRP and NPY and a reduction in the expression levels of mRNA coding for the anorexigenic peptide POMC [9–11]. Early undernourished animals exhibit also increased motivation for food reward together with an altered expression pattern of opioid receptors and other reward-related genes in the nucleus accumbens (NAc) and other structures of the brain reward system [8,12–14]. Altogether, these latter findings have led to suggest that early malnutrition-induced preference for the consumption of foods high in fat

CONTACT Francisco Bolaños-Jiménez Francisco.Bolanos@univ-nantes.fr UMR1280 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRAE – Université de Nantes, CHU–Hôtel Dieu, HNB1–UMR PhAN, Alexis Ricordeau, 44096 Nantes Cedex 1, France
*Present address: Medical and Psychology School, Autonomous University of Baja California, Tijuana, B.C, Mexico.

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

and sweet, results from the dysfunction of the neuronal pathways involved in the hedonic control of food intake.

However, the hedonic value of food, and therefore, the choice of what to eat, is also determined by the gustatory system which detects and differentiates the five basic taste qualities – sweet, sour, bitter, salty, and umami – in addition to fat (see [15,16] for review). The first step in taste perception is the interaction of sapid components of food with specific receptors expressed in chemosensory cells of taste buds found in the oral cavity. In particular, sweet substances are detected by a heterodimer composed of the type 1 member 2 (T1R2) and type 1 member 3 (T1R3) taste receptors belonging to the family of G protein-coupled receptors. The binding of a sweet molecule to the T1R2/T1R3 heterodimer activates the associated G protein gustducin leading to the simulation of phospholipase C-beta 2 (PLC-β2), to the release of intracellular Ca^{2+} and the opening of the transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (*TRPM5*). This results eventually in membrane depolarization and the release of ATP which activates gustatory fibres responsible for transmitting the taste signal to taste Central Nervous System (CNS) areas which mediate taste perception and behaviour. A similar intracellular signalling pathway is activated upon the binding of free fatty acids to the free fatty acid receptor GPR120 and the fatty acid translocase CD36 as well as by the stimulation by umami of the heterodimer composed of type 1 member 1 taste receptor (T1R1) and T1R3 [15,16]. Notably, in addition to being expressed in the lingual epithelium, sweet taste receptors are present in the hypothalamus where their stimulation contributes to glucose sensing in leptin-responsive neurons [17].

Variations in receptor-mediated detection of sweet and fat as well as genetic polymorphisms in sweet and fat receptor genes have been associated with differences in food preferences and predisposition to weight gain and metabolic disorders [18–22]. On the basis of these observations, we hypothesized that impaired taste perception might contribute to the preference for consuming sweet and fatty induced by early malnutrition. To test this hypothesis, this study evaluated the preference for the intake of fat and sweet food of adult rats born to control or calorie-restricted dams and compared the impact of maternal malnutrition on the expression of genes regulating fat and sweet detection and signalling in taste buds and hypothalamus versus the expression of genes involved in the homeostatic and hedonic control of food intake.

Material and methods

Animals and nutritional manipulations

All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85–23, revised 1985), and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Pays de la Loire (authorization number 2017012013318453/APAFIS 8215). Three-month-old female and male Wistar rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France), and maintained under an inversed 12-/12-hour dark/light cycle (lights off at 7:00 AM), and at 23 ± 1°C with food and water *ad libitum*. After an adaptation period of 10 days, females in natural proestrus were allowed to copulate with a male until at least two ejaculations were displayed. This day was considered as gestational day 0. Twelve hours after coitus, mated female rats were housed individually and fed either *ad libitum* (C) or were undernourished (UN) from gestation through the end of lactation by reducing 50% their daily food ration in relation to the daily amount of food consumed by the control dams. To avoid infanticide behaviour and cannibalism of undernourished dams during the early post-parturition phase, UN mothers were fed ad libitum from gestational day 20 until 48 h after delivery when their daily ration of food was again reduced by 50% in relation to the amount of food consumed by control dams. At birth, litter size was adjusted to eight pups per litter maintaining a 1:1 male to female ratio. Pups were weaned at 21 days and fed standard chow (SAFE, Augy, France) until the end of the experiment. At the end, a total of six controls and six undernourished dams were used from which two pups of each sex were selected at random for analysis giving a total of 24 control pups and 24 UN pups.

Evaluation of food preferences

The preference for the consumption of fatty and sugary food was evaluated at 3 and 6 months of age during a series of test meals. Animals were food-deprived in their housing cages at the beginning of the dark phase of their dark/light cycle and transferred 6 h later to individual cages located in a dark room in which they had free access to three types of food made up of chow or chow enriched with 30% of fat or 30% of sugar. One hour later, animals were returned to their housing cages where they continued to be fed standard chow *ad libitum*. The amount of chow and palatable food (fat and sweet), consumed during the test meal, was determined by subtracting the amount of food remaining in the feeder from the amount of food offered at the

start of the meal. Care was taken to inspect the bottom of the cage in detail at the end of the meal to detect any spilt food. Animals were submitted to this test meal during five consecutive days. The averaged quantity of each food consumed during these five test meals was used as a parameter of their food preferences. Foods were prepared every day before the test using powdered standard chow as a base mixed with water, with sugar plus water or with lard to obtain food with a similar consistency. Animals had free access to water during food deprivation and test meals.

Tissue collection

Two days after the last test meal, 6 months-old rats were fasted for 2 h at the beginning of the dark phase of their light/dark cycle and sacrificed by cervical dislocation under isoflurane anaesthesia. The tongue was excised and the circumvallate papilla carefully dissected under a stereoscopic microscope. After i extraction of the brain from the skull, the whole hypothalamus was dissected and the rest of the brain was transferred to a rat brain matrix to obtain 1 mm thick sections from which punches of the nucleus accumbens and ventral tegmental area (VTA) were collected. All tissue samples were immediately frozen after dissection in liquid nitrogen and stored at −70°C.

Real-time quantitative RT-PCR experiments

Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNAse/RNAse-free for 30 min at 37°C. Afterwards, 1.5 µg of purified RNA was reversed transcribed using Superscript II RNAseH-Reverse-Transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 20 µl and the resulting cDNA was diluted 40-fold in DNAse and RNAse free water. Thereafter, 5 µl of each cDNA diluted sample was used as template for PCR amplification using SYBR Green (Biorad, France) as fluorogenic intercalating dye and the iCycler iQ Real-Time PCR detection system instrument from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). PCR parameters were an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, and 30 s at 60°C. Primers used for the amplifications are presented in Supplemental Table 1.

Data analysis

Due to inter-individual behavioural variability, food intake data of each animal were considered as a single point. In contrast, for the analyses of RT-PCR results, the Ct values of the two animals from the same litter and from the same experimental group were averaged to yield a final number of 12 points per sex corresponding to 6 controls and to 6 undernourished dams. The relative expression levels of the mRNAs in the different samples were calculated using the $2^{\Delta\Delta CT}$ method and β-actin RNA as housekeeping gene. Prism 6 Software (GraphPad, Inc., CA, US), was used to perform all statistical analyses. Data were first checked for normality using Shapiro–Wilk normality test. Statistical differences between C and UN animals of the same sex were assessed by unpaired Student's *t*-test or Mann–Whitney test. Differences in food intake between male and female animals were analysed by two-way ANOVA using maternal diet and sex as factors followed by Sidak's multiple comparison test. Experimental results are expressed as mean ± S.E.M. Statistical significance was set at $p < .05$.

Results

Phenotypic characteristics and serum metabolic profile

Dams allocated to C and UN groups exhibited the same body weight at the beginning of gestation (C = 241 ± 2 g vs UN = 240 ± 2 g). Nevertheless, while the body weight of control dams gradually increased during pregnancy, the body weight of undernourished mothers remained relatively stable so that at the end of gestation they weighed 27% lower than control dams (C = 397 ± 3.98 g vs UN = 291.25 ± 4.37 g, $p < .0001$). These weight differences were more pronounced during the lactation period due to higher weight loss after delivery in malnourished rats (- 25%) than in controls (- 19%). Otherwise, neither the number of offspring per mother nor the male/female offspring ratio was affected by calorie restriction.

The anthropometric and metabolic characteristics of control and undernourished offspring at 6 months of age are presented in Table 1. Both female and male UN rats exhibited reduced body weight and adipose tissue as well as lower circulating levels of leptin compared with control animals. In utero and neonatal malnutrition induced also a significant reduction of serum triglycerides in males but not in female rats. Conversely, female, but not male, UN rats presented higher levels of serum cholesterol in relation to their control counterparts.

Food preference test

When exposed for the first time to a new food, humans and animals often display taste neophobia which is reflected as a reluctancy to eat the unfamiliar food. Furthermore, the amount of food intake varies from day to day even though food consumption is assessed at the

Table 1. Anthropometric and metabolic characteristics of 6-month-old male and female rats born to ad libitum fed or food-restricted dams.

	Males		Females	
	Controls	Undernourished	Controls	Undernourished
Body weight (g)	620.73 ± 10.96	551.67 ± 14.89**	343.64 ± 5.77	298.91 ± 4.28***
Adipose Index	6.35 ± 0.41	4.52 ± 0.22**	6.52 ± 0.41	4.90 ± 0.28**
Leptin (ng/mL)	13.56 ± 1.84	8.51 ± 0.98*	7.27 ± 0.88	4.58 ± 0.51*
Insulin (ng/mL)	1.58 ± 0.19	1.53 ± 0.30	1.36 ± 0.41	0.92 ± 0.24
Triglycerides (ng/dL)	101.44 ± 10.01	73.33 ± 5.80*	136.57 ± 14.35	120.35 ± 25.52
Cholesterol (ng/dL)	73.62 ± 5.07	77.66 ± 9.05	63.98 ± 3.91	79.03 ± 3.10*
Glucose (ng/dL)	163.07 ± 9.82	177.26 ± 20.19	174.76 ± 4.21	169.71 ± 5.63

*$p < .05$; **$p < .01$; ***$p < .001$ compared to control animals of the same sex.

same time of the day and under the same conditions. To avoid the bias that could be introduced by these phenomena, food preference tests were performed over five consecutive days and the amount of food consumed during each test over the 5-day-period was averaged and used as a readout of food preference. The coefficient of variation for food intake across the test meals among animals in the same group ranged from 7% to 37% in both control and malnourished animals regardless of sex. Likewise, C and UN male and female animals displayed the same feeding pattern during the test meals with a reduced food intake on the first day compared to the following days. Otherwise, food consumption remained stable in each group from the second day until the end of the tests.

During the 1 h test meals, all animals showed a marked preference for the consumption of sweet food versus chow and high-fat food independently of maternal diet, sex and age (Figure 1). In fact, the quantity of sugary food consumed by control male animals represented on average 70% of their total amount of food intake and this percentage was 57% in the case of female rats. However, clear sex-dependent differences in the choice of the other taste categories were observed. Thus, female rats from control and UN groups consumed significantly more chow (Figure 1(A,E)) and high-fat food (Figure 1(C, G)) than their male counterparts at both three and six months of age as revealed by the two-way ANOVA analysis of the data (Table 2). At six months, control female rats consumed also more sweet food than control males (Figure 1(F)). Consequently, female rats ingested more calories in relation to their body weight than males (Figure 1(D, H)).

Concerning the impact of maternal undernutrition, male UN rats ate significantly more chow and sweet food than control males and showed reduced intake of fatty food at three months compared with controls (Figure 1(A–C)). In contrast, there were no differences in preference for consuming chow, fatty or sugary food between C and UN female rats (Figure 1(E–G)). Of notice, however, ageing favoured the consumption of sweet (95.82 ± 4.08 kcal/kg vs 79.64 ± 8.14 kcal/kg) and fat (50.69 ± 3.55 kcal/kg vs 29.02 ± 2.05 kcal/kg), food in malnourished female animals as determined by two-way ANOVA for repeated measures using maternal diet and age as factors [F (age) = 16.89, $p < .0007$ for sweet; F (age) = 36.71, $p < .0001$ for fat].

Gene expression changes of taste receptors and signalling pathways

There was a significant increase in the relative expression levels of sweet taste receptor T1R2 as well as in the levels of T1R1 and fatty acid receptor CD36 mRNAs in the circumvallate papillae of undernourished animals compared with controls (Figure 2 top graphs). The relative expression of the genes encoding gustducin, TRMP5 and PLC-β2 proteins, which are all involved in sweet and fat intracellular signalling, was also enhanced by maternal undernutrition. In contrast, control and undernourished rats exhibited the same levels of sweet T1R3 receptor mRNA. The alterations induced by maternal undernutrition on the expression levels of sweet and fat receptors and signalling molecules were common to male and female rats (Figure 2 top graphs). However, the magnitude of the effect was much greater in females than in males excepting for T1R1 and CD36 genes.

Maternal undernutrition enhanced also the expression of genes encoding proteins involved in taste detection and transduction in the hypothalamus but to a lesser extent in males than in females (Figure 2 bottom graphs). Moreover, in contrast to the changes observed in taste papillae, the hypothalamic levels of gustducin and PLC-β2 mRNAs were decreased in undernourished males (Figure 2 left bottom graph).

Gene expression changes of genes involved in the hedonic control of food intake

The impact of maternal undernutrition on the expression of several genes involved in food reward

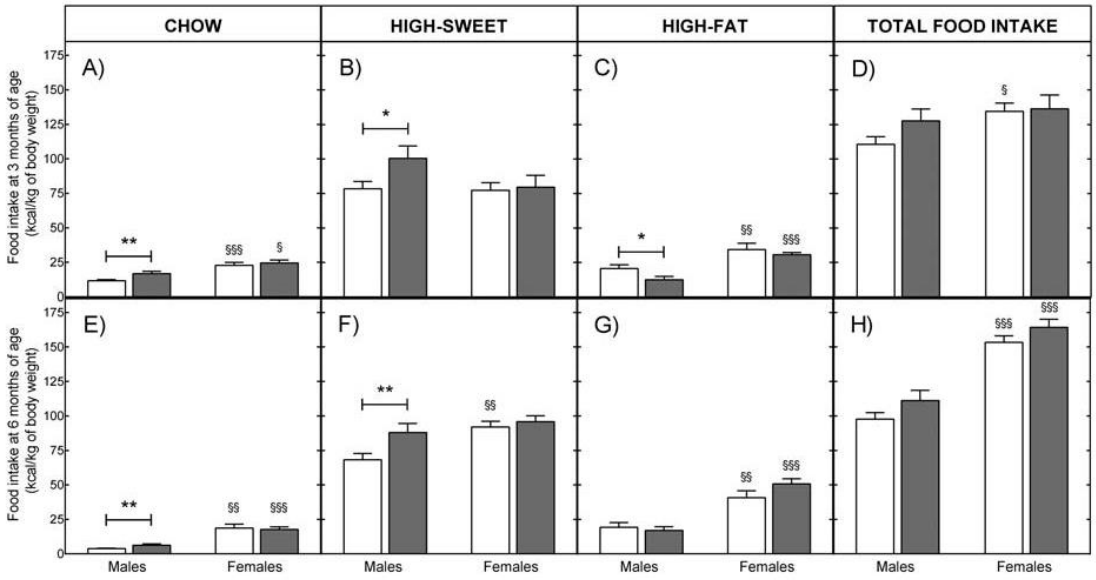


Figure 1. Food preferences of male and female rats born to control (white bars) or undernourished (grey bars) dams. Each bar represents the average amount of chow, sweet or fatty food ingested per test meal during five consecutive days at 3 (top graphs) and 6 (bottom graphs) months of age. Food intake is expressed in Kcal in relation to body weight. Data correspond to the mean ± SEM with $n = 12$ for control and UN animals of each sex issued from 6 different litters (two animals of each dam). $^{*}p < .05$; $^{**}p < .01$ (Student's *t*-test). $^{\S}p < 0.05$; $^{\S\S}p < .01$; $^{\S\S\S}p < .001$ compared with male animals of the same experimental group as determined by two-way ANOVA analysis using maternal diet and sex as factors followed by Sidak's multiple comparison test.

was evaluated in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. These experiments showed that the expression of the dopamine transporter (DAT) in the NAc was decreased by malnutrition in male animals but increased in female rats (Figure 3 top graphs). Conversely, whereas the expression of DAT in the VTA was increased in male undernourished rats in relation to their controls, the levels of DAT mRNA in undernourished females tended to decrease (Figure 3 bottom graphs). The effects of undernutrition varied also according to the brain region. Thus, compared to their control counterparts, female undernourished rats exhibited decreased and increased expression of, respectively, dopamine receptor D2 and mu opioid receptor mRNAs in the Nac (Figure 3 right top graph), but not in the VTA (Figure 3 right bottom graph), whereas the expression of mu opioid receptors decreased in the VTA but not in the NAc of male rats (Figure 3 left top and bottom graphs).

Gene expression changes of genes involved in the homeostatic control of food intake

UN males exhibited increased levels of mRNAs encoding the orexigenic peptides AgRP and NPY but these changes were not observed in female animals (Figure 4). In contrast, maternal undernutrition did not modify the expression of the anorexigenic genes CART and POMC neither in male nor in female rats.

Discussion

Since the concept of the developmental origins of health and disease was proposed, a large number of experimental studies have been performed with the aim of determining the role of the neuronal circuits regulating food intake on the increased disease susceptibility to metabolic disorders resulting from maternal undernutrition. Feeding behaviour, that is, the choice of what to eat and how much to eat, is modulated by complex regulatory mechanisms categorized as homeostatic or non-homeostatic [23]. The former mechanism relies on the action at the brain of several peptide neurotransmitters released from the periphery in response to the energetic status of the body. These peptides act directly to regulate food intake or modulate feeding by controlling the expression within the hypothalamus of NPY, AgRP, POMC, CART and other neurotransmitters. NPY and AgRP promote food intake (orexigenic effect), while increased POMC and CART expression decrease food intake (anorexigenic effect). The non-homeostatic control of food intake is driven by signals associated with

Table 2 Results of the two-way ANOVA analyses of food intake data represented in Figure 1.

		Chow intake		Sweet intake		Fat intake		Total intake	
	Source of variation	*F*-value	*p*-value	*F*-value	*p*-value	*F*-value	*p*-value	*F*-value	*p*-value
3-Month-old	Interaction	0.9838	.3324	1.935	.1721	0.4918	.4873	0.9859	.3267
	Sex	29.12	.0001	2.411	.1286	24.81	.0001	4.557	.039
	Maternal diet	3.819	.0581	2.966	.093	3.455	.0706	1.492	.2291
6-Month-old	Interaction	0.6219	.437	2.669	.1132	1.93	.1757	0.05349	.8188
	Sex	36.32	.0001	10.72	.0027	39.52	.0001	91.61	.0001
	Maternal diet	0.1246	.7267	5.873	.0218	0.7494	.394	4.575	.0413

Note: Statistics analyses were performed using GraphPad prism software version 6.0 with Sidak's multiple comparison test as *post hoc* test.

cognitive processes, such as decision making and learning, engaged by the sensory systems in response to environmental factors and the reward and reinforcing properties of food. The analysis and processing of these signals is performed by a group of brain regions designed collectively as the brain reward system among which the mesolimbic dopaminergic pathway that connects the ventral tegmental area to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus. Stimulation of μ-opioid receptors in the VTA blocks the release of GABA onto DA neurons leading to elevated dopamine levels in the NAc and enhanced motivation to consume or 'wanting', whereas the activation of μ-opiod receptors located within the NAc increases food 'liking'. That is, the perceived palatability of a food or the pleasure derived from the consumption of food [24].

Previous studies have shown that protein or calorie restriction during pregnancy and/or lactation induces hyperphagia [9–11] and a high preference for consuming sweet and fatty food [7,8,14] in the offspring. These altered patterns of food intake are associated with increased expression of the orexigenic peptides NPY and AgRP in the hypothalamus and enhanced expression of tyrosine hydroxylase, dopamine transporter genes and μ-opioid receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area [12,14,25]. Here, we show that early malnutrition-induced preference for

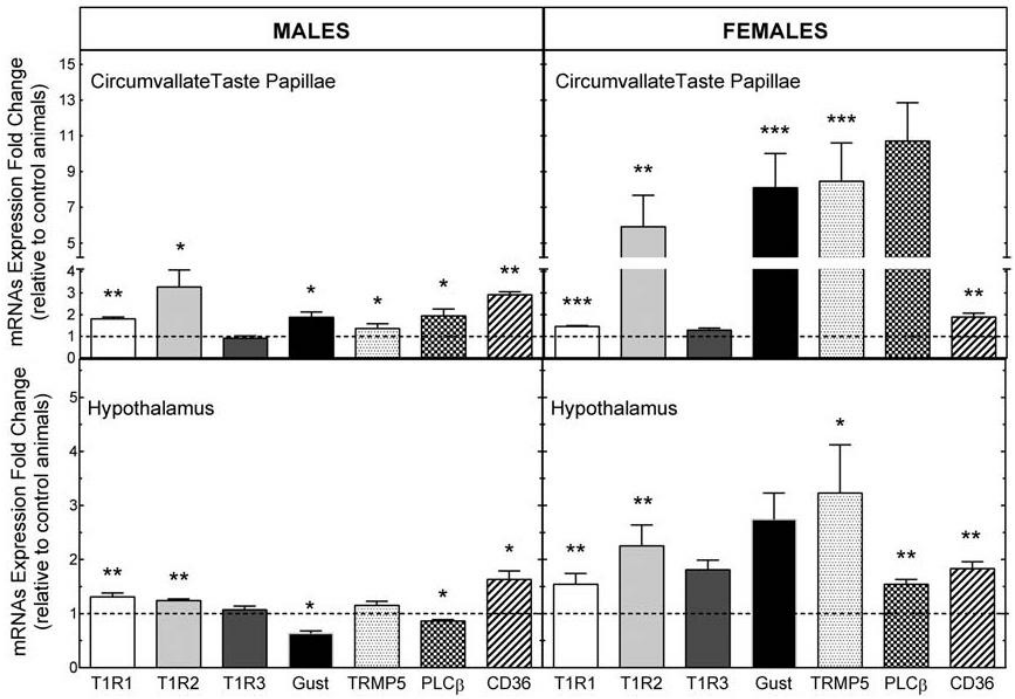


Figure 2. Relative abundance of mRNAs encoding sweet and fat taste receptors and transducing pathways in circumvallate papillae and hypothalamus of male and female 6-month-old rats born to control or calorie-restricted dams. Data correspond to the fold change in mRNA expression levels in relation to those of the control group (expression level 1), as determined by the $2^{\Delta\Delta CT}$ method using β-actin RNA as housekeeping gene. Expression levels from two animals of the same litter and from the same experimental group were averaged to yield a final number of 6 points per group and per sex. *$p < .05$; **$p < .01$; ***$p < .001$ versus control rats of the same sex.

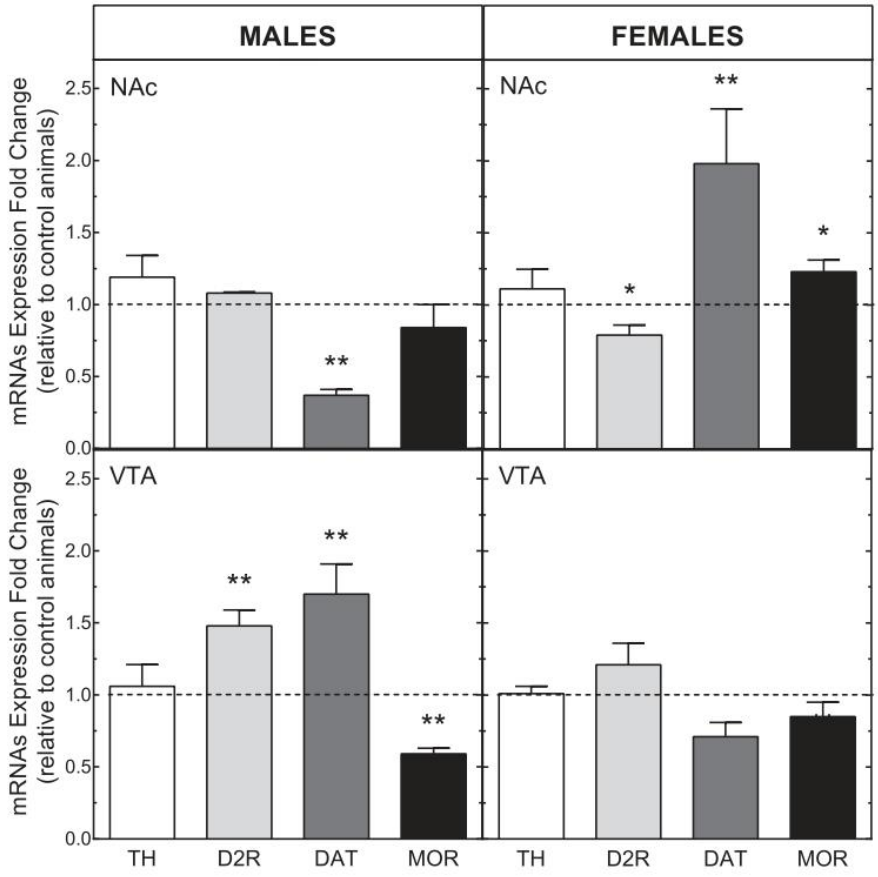


Figure 3. Relative abundance of genes encoding Tyrosine hydroxylase (TH), Dopamine receptor D2, Dopamine transporter (DAT) and Opioid receptor mu (MOR) in the nucleus accumbens (NAc) and ventral tegmental area (VTA) of male and female 6-month old rats born to control or calorie-restricted dams. Data correspond to the fold change in mRNA expression levels in relation to those of the control group (expression level 1), as determined by the $2^{\Delta\Delta CT}$ method using β-actin RNA as housekeeping gene. Expression levels from two animals of the same litter and from the same experimental group were averaged to yield a final number of 6 points per group and per sex. *$p < .05$; **$p < .01$ versus control rats of the same sex.

the consumption of palatable food is also paralleled by the upregulation in taste papillae and hypothalamus of mRNAs encoding for genes involved in sweet and fat taste detection and signalling. Therefore, in addition to the impairment of the homeostatic and hedonic neuronal circuits regulating food intake, maternal undernutrition results in alterations of the gustatory system.

Oral sucrose stimulates the brain reward system by enhancing the release of dopamine in the NAc [26] and the firing rate of nucleus accumbens neurons [27,28]. Increased dopamine levels in the NAc are also observed following exposure to a high-fat diet [29]. On the other hand, several lines of evidence from the literature indicate that there is a positive relationship between the preference for the consumption of sweet or fat food and the expression levels of sweet and fat taste receptors in the lingual epithelium. Namely, rats made obese by a high-fat diet exhibit both reduced expression of T1R3 receptor mRNA in the circumvallate papillae and decreased preference for the consumption of saccharine solutions [30]. Similarly, taste receptor cells isolated from the circumvallate papillae of obese mice display reduced responsiveness to sucrose and saccharine as well as decreased expression of gustducin and PLC-β2 [31]. Worth noting, these latter changes in sweet-sensing and gene expression at the cellular level were correlated to the decreased unconditioned licking responses to saccharine and sucrose exhibited by the same animals. Conversely, overnight fasting increased the preference for the consumption of high concentrations of linoleic acid which was associated with enhanced expression of CD36 mRNA in taste buds [32]. On the basis of these observations, it can be reasonably proposed that the herein reported enhanced expression of sweet and fat receptors and transducing pathways in the circumvallate papillae of male

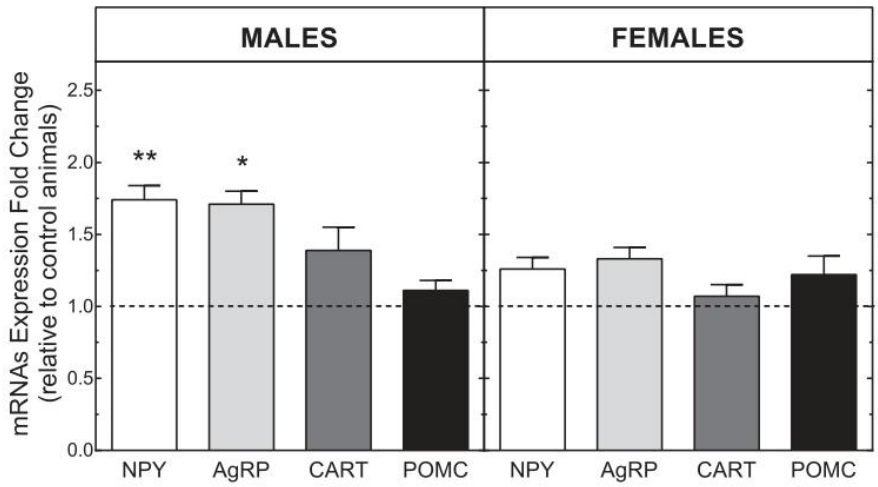


Figure 4. Relative abundance of mRNAs coding for orexigenic (NPY and AgRP) or anorexigenic (POMC and CART) peptides in the hypothalamus of male and female 6-month-old rats born to control or calorie-restricted dams. Data correspond to the mRNA expression levels in relation to those of the control group (expression level 1) amplified within the same PCR run and under the same experimental conditions. Expression levels from two animals of the same litter and from the same experimental group were averaged to yield a final number of 6 points per group and per sex. $*p < .05$; $**p < .01$; $*P < .01$ compared with control males.

malnourished rats leads to an overstimulation of the brain reward system, therefore, explaining their enhanced preference for consuming sweet and high-fat foods in comparison with control animals. This overstimulation of the reward system would be concomitant with the activation of food intake via non-homeostatic regulatory mechanisms driven by the increased expression in the hypothalamus of the orexigenic peptides NPY and AgRP.

It should be mentioned, however, that though the employed protocol allows the assessment of food preference, it does not provide a direct estimate of taste sensitivity. It also should be considered that different levels of regulation exist between transcript and protein product, including stability of the mRNA, the translation efficiency of the transcript and degradation of the protein, such that there is not always a direct link between mRNAs levels and their functional products, that is, their encoded proteins. Previous studies have indeed shown that adult offspring of dams fed a low protein diet exhibited decreased expression of μ-opioid receptor mRNA but the enhanced density of μ-opioid receptor binding sites [13,25]. Further studies using complementary methods, such as the 2-bottle preference test, are necessary to determine the direct consequences of the changes in the expression of taste receptor and taste signalling pathways induced by maternal malnutrition on the taste sensitivity of the offspring and to establish a mechanistic link between these changes and their associated impaired feeding pattern.

Given that animals were food-deprived for over a period of 6 h before the test meal, it could be argued that under our experimental conditions the incentive to eat is essentially driven by hunger and that there is a minimal influence on the taste system. This is however unlikely since previous studies have shown that overnight or a 24 h fasting do not alter the preference for the consumption of fatty or sugary food [33,34]. Likewise, the involvement of post-ingestive factors in the feeding pattern presented by the animals can be excluded.

Despite considerable evidence in the literature that taste preferences begin to be established during in utero development and early childhood [5,35,36], very few studies have attempted to determine the consequences of maternal undernutrition or maternal obesity on the mechanisms underpinning the detection and signalling of taste stimuli. To our knowledge, there are only two studies in which alterations in the gustatory system have been assessed in offspring following maternal undernutrition or maternal obesity. In the first of these studies, Salas et al. showed that offspring of calorie-restricted rats exhibit impaired morphology of the circumvallate papillae together with a reduced number of taste buds [37]. In the second study, Song et al. observed that maternal consumption of a high-fat diet increased the expression of both T1R1 and T1R3 receptors while reducing gustducin mRNA levels in the lingual epithelium of the offspring [38]. These changes were detected at weaning and were still present at three months of age but did not lead to preferential

consumption of a sucrose solution. Otherwise, neither the expression of PLC-β2 nor that of TRMP5 was affected by maternal obesity. In contrast to this report, here it was observed that maternal calorie-restriction results in the upregulation of the fatty acid receptor CD36 and of all genes encoding sweet detection and signalling proteins with the exception of the T1R3 receptor gene.

In addition to being expressed in taste papillae, sweet taste receptors are present in various tissues involved in the regulation of energy homeostasis such as the pancreas, liver, adipose tissue, brain and intestine (see [39] for review). Although the physiological function of these extra-oral taste receptors remains largely undetermined, the emerging picture is that they play a pivotal role in glucose sensing and glucose homeostasis. Thus, activation of intestinal sweet taste receptors stimulates glucose absorption via the release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) from enteroendocrine cells [40] and the upregulation of the sodium–glucose cotransporter 1 (SGLT1) in enterocytes [41]. In the pancreas, sweet taste receptors stimulate insulin secretion [42] and their activation in the arcuate nucleus of the hypothalamus results in the increased firing of glucose-excitatory neurons [17]. The characteristic of these neurones is that they become activated by high concentrations of glucose. Enhanced expression of taste receptors in the hypothalamus of malnourished animals could therefore lead to a low activation threshold of glucose-excitatory neurons and, consequently, to a potentiation of the effects of glucose. Brain injection of glucose or sucralose, an artificial sweetener whose sweetening effects are linked exclusively to its interaction with sweet taste receptors, results in decreased feeding [17]. The same has been shown upon stimulation of hypothalamic CD36 receptors by fatty acids [43]. It is thus paradoxical that malnourished animals show both increased food consumption and a higher density of hypothalamic sweet and fat taste receptors. However, sweet and fat taste receptors are also expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and it has been reported that the injection of glucose into this hypothalamic nucleus has an inhibitory effect on food intake [44]. Hence, in the absence of an integrative understanding of the function of brain taste receptors, it is not possible to draw definite conclusions about the behavioural consequences of a change in hypothalamic taste receptor expression levels.

Male and female rats reacted differently to maternal undernutrition, both in terms of food preferences and gene expression. In particular, there were no differences in sweet, fat or total food intake between control and malnourished female rats despite the fact that the latter displayed higher expression levels of sweet and fat taste receptors in taste buds than undernourished males. Sex differences in food preferences in response to maternal undernutrition have also been documented by other studies. For example, using a very similar developmental programming model than the one used in this report, Alves et al. observed that male, but not female, undernourished rats consumed a higher amount of sweet food than non-undernourished animals [14], whereas Bellinger et al. showed that female, but not male, offspring of protein-restricted dams consumed significantly less fat when exposed to a self-selection feeding trial than their control counterparts [7]. Female rats exhibit reduced food intake during the proestrus phase of their ovarian cycle resulting from a rise in oestradiol secretion [45,46]. It could, therefore, be inferred that the lack of effect of maternal undernutrition on food preference in female rats is the consequence of the influence of female gonadal hormones on food intake and not of a sex-dependent difference in metabolic programming. However, the proestrus period in rats is 12-4 h long so that the effects of oestradiol on food intake are not maintained throughout the 4–5 days of their ovarian cycle. Furthermore, under our experimental conditions, food consumption remained stable from day 2 to day 5 of the test in both female and male rats and both male and female animals showed the same inter-individual variation in food intake across the tests. This latter result is identical to that reported recently by Smarr et al. [47]. The present observations add therefore to the existing evidence showing that metabolic programming, as many physiological functions and pathological alterations, differ between males and females and highlight the need to consider the sex as a biological variable in studies on the impact of the maternal nutritional status on offspring's health. Identifying the mechanisms underlying the differences in metabolic programming between sexes is a major challenge.

The upregulation of taste receptors and transducing pathways induced by maternal malnutrition expands on previous observations indicating that impaired nutrient sensing is a key mechanism of metabolic programming. Namely, decreased or increased activation of, respectively, mTOR and AMPK kinases were documented in adult offspring of dams fed a low protein diet during gestation and lactation [48,49]. The mTOR signalling pathway is under-stimulated in low energy conditions while, on the contrary, AMPK is over-stimulated. On the other hand, fasting entrains an up regulation of hypothalamic sweet taste receptors [50]. These observations suggest that adaptive responses of

nutrient-sensing pathways to energy shortfalls during in utero and neonatal development persist into adulthood in the absence of any nutritional deficiency.

In conclusion, maternal undernutrition induces long-lasting sex-specific changes in food preferences and gene expression in taste papillae, hypothalamus and brain reward regions. The gene expression changes in malnourished males are in favour of increased feeding and are in line with their preference for consuming sugary and fatty food.

Acknowledgements

Sandra Olvera Hernández was supported by the programme 'Food for Tomorrow' of the French Region Pays de la Loire and the European Regional Development Fund (FEDER). Luis Reyes Castro received support from the EU in the framework of the Marie-Curie FP7 COFUND People Programme, through the award of an AgreenSkills fellowship. Amran Daher Abdi is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministry of Research and Innovation of the Government of the Republic of Djibouti. Carla Mezo González is supported by an international PhD fellowship from the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the French National Research Agency (ANR, grant ANR-16-CE21-0007-01) and CONACYT (award number 2015-16-273510).

Notes on contributors

Sandra Olvera-Hernández holds a B.Sc. in Medicine, a Master's and PhD degree in Neuropharmacology and a post-doctoral training in the Developmental Origins of Health and Disease. She is currently a professor at the Faculty of Medicine and Psychology of the Universidad Autónoma de Baja California in Mexico. Her research is focused on the analysis of the impact of diet on brain function.

Luis Antonio Reyes-Castro holds a BSc in Clinical Biochemistry, a Master degree in Clinical Biochemistry and a PhD in Biomedical Science. He is currently a Medical Science Researcher at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, in Mexico, where he studies the mechanisms underlying the behavioural alterations exhibited by the offspring of obese rats.

Amran Daher Abdi is a PhD student with a BSc in Biochemistry and a Master training in Nutrition. She is currently pursuing a PhD in Nutrition and Metabolic Pathologies. Her studies aim at determining if, and how, maternal supplementation during pregnancy with Omega-3 fatty acids (DHA, EPA), prevents the development of metabolic and mental disorders in the offspring resulting from high-calorie feeding.

Carla Elena Mezo-González holds a BSc in Biology and a Master degree in Molecular Biomedicine. She is currently pursuing a PhD in Nutrition and Metabolic Pathologies. Her research interest includes the study of the impact of maternal obesity during pregnancy on the learning capacities of the offspring.

Armando Arredondo holds a B.Sc. in Medicine, a Master Degree on Health Systems Organization and Management and a PhD in Public Health. He is actually Lecturer at the School of Public Health of the National Institute of Public Health in Mexico.

Elena Zambrano is a biochemistry scientist. She obtained a PhD in Biology followed by postdoctoral training in foetal physiology in the Laboratory for Pregnancy and New-born Research at Cornell University, Ithaca, NY. USA. She works for the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán in Mexico since 1991. Elena Zambrano's current research focus is on the Developmental Origins of Health and Disease using rodents as an experimental animal model.

Francisco Bolaños-Jiménez is a molecular neuroscientist. After postdoctoral studies at the Pasteur Institute (Paris) and at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (Strasbourg), he joined The National Institute for Agricultural Research (INRA). His research interests are focused on how the alteration of the epigenetic mechanisms regulating gene expression sets up the link between under-(or over-) nutrition in early life and the development of a pathological phenotype at adulthood.

References

[1] Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull. 2001;60:5–20. doi:10.1093/bmb/60.1.5.

[2] Correia-Branco A, Keating E, Martel F. Maternal undernutrition and fetal developmental programming of obesity. Reprod Sci. 2015;22:138–45. doi:10.1177/1933719114542012.

[3] Smith BL, Reyes TM. Offspring neuroimmune consequences of maternal malnutrition: potential mechanism for behavioral impairments that underlie metabolic and neurodevelopmental disorders. Front Neuroendocrinol. 2017;47:109–22. doi:10.1016/j.yfrne.2017.07.007.

[4] Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. Am J Clin Nutr. 2008;88:1648–52. doi:10.3945/ajcn.2008.26140.

[5] Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. Int J Pediatr. 2012;2012:1–5. doi:10.1155/2012/657379.

[6] Bischoff AR, Portella AK, Paquet C, Dalle Molle R, Faber A, Arora N, et al. Low birth weight is associated with increased fat intake in school-aged boys. Br J Nutr. 2018;119:1295–302. doi:10.1017/S0007114518000892.

[7] Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. Br J Nutr. 2004;92:513–20. doi:10.1079/BJN20041224.

[8] Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, et al. Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. Brain Res. 2015;1618:41–9. doi:10.1016/j.brainres.2015.05.019.

[9] Fukami T, Sun X, Li T, Desai M, Ross MG. Mechanism of programmed obesity in intrauterine fetal growth restricted offspring: paradoxically enhanced appetite stimulation in fed and fasting states. Reprod Sci. 2012;19:423–30. doi:10.1177/1933719111424448.

[10] Orozco-Sólis R, de Souza S L, Matos RJ B, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. Physiol Behav. 2009;96:481–92. doi:10.1016/j.physbeh.2008.11.016.

[11] Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;279:E83–87. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.1.E83.

[12] Vucetic Z, Totoki K, Schoch H, Whitaker KW, Hill-Smith T, Lucki I, et al. Early life protein restriction alters dopamine circuitry. Neuroscience. 2010;168:359–70. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.010.

[13] Grissom NM, Reyes TM. Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: similarities and differences from behavior to epigenetics. Int J Dev Neurosci. 2013;31:406–14. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.11.006.

[14] Alves MB, Dalle Molle R, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. Behav Brain Res. 2015;287:73–81. doi:10.1016/j.bbr.2015.03.019.

[15] Roper S, Chaudhari N. Taste buds: cells, signals and synapses. Nat Rev Neurosci. 2017;18, 485–97. doi:10.1038/nrn.2017.68.

[16] Liu D, Archer N, Duesing K, Hannan G, Keast R. Mechanism of fat taste perception: association with diet and obesity. Prog Lipid Res. 2016;63:41–9. doi:10.1016/j.plipres.2016.03.002.

[17] Kohno D. Sweet taste receptor in the hypothalamus: a potential new player in glucose sensing in the hypothalamus. J Physiol Sci. 2017;67:459–65. doi:10.1007/s12576-017-0535-y.

[18] Chamoun E, Mutch DM, Allen-Vercoe E, Buchholz AC, Duncan AM, Spriet LL, et al. A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors, and health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58:194–207. doi:10.1080/10408398.2016.1152229.

[19] Ramos-Lopez O, Panduro A, Martinez-Lopez E, Roman S. Sweet taste receptor TAS1R2 polymorphism (Val191Val) is associated with a higher carbohydrate intake and hypertriglyceridemia among the population of west Mexico. Nutrients. 2016;8:101. doi:10.3390/nu8020101.

[20] Corpeleijn E, van der Kallen CJH, Kruijshoop M, Magagnin MGP, de Bruin TWA, Feskens EJM, et al. Direct association of a promoter polymorphism in the CD36/FAT fatty acid transporter gene with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. Diabet Med. 2006;23:907–11. doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01888.x.

[21] Eriksson L, Esberg A, Haworth S, Holgerson PL, Johansson I. Allelic variation in taste genes is associated with taste and diet preferences and dental caries. Nutrients. 2019;11, 1491. doi:10.3390/nu11071491.

[22] Inoue M, Glendinning JI, Theodorides ML, Harkness S, Li X, Bosak N, et al. Allelic variation of the Tas1r3 taste receptor gene selectively affects taste responses to sweeteners: evidence from 129.B6-Tas1r3 congenic mice. Physiol Genomics. 2007;32:82–94. doi:10.1152/physiolgenomics.00161.2007.

[23] Berthoud H-R, Münzberg H, Morrison CD. Blaming the brain for obesity: integration of hedonic and homeostatic mechanisms. Gastroenterology. 2017;152:1728–38. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.050.

[24] Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. Physiol Behav. 2009;97:537–50. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.044.

[25] Thanos PK, Zhuo J, Robison L, Kim R, Ananth M, Choai I, et al. Suboptimal maternal diets alter mu opioid receptor and dopamine type 1 receptor binding but exert no effect on dopamine transporters in the offspring brain. Int J Dev Neurosci. 2018;64:21–8. doi:10.1016/j.ijdevneu.2016.09.008.

[26] Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286:R31–37. doi:10.1152/ajpregu.00282.2003.

[27] Villavicencio M, Moreno MG, Simon SA, Gutierrez R. Encoding of sucrose's palatability in the nucleus accumbens shell and its modulation by exteroceptive auditory cues. Front Neurosci. 2018;12; doi:10.3389/fnins.2018.00265.

[28] Taha SA, Fields HL. Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. J Neurosci. 2005;25:1193–202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3975-04.2005.

[29] Martel P, Fantino M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. Pharmacol Biochem Behav. 1996;53:221–6. doi:10.1016/0091-3057(95)00187-5.

[30] Chen K, Yan J, Suo Y, Li J, Wang Q, Lv B. Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. Brain Res. 2010;1325:53–62. doi:10.1016/j.brainres.2010.02.026.

[31] Ahart ZC, Martin LE, Kemp BR, Dutta Banik D, Roberts SGE, Torregrossa A-M, et al. Differential effects of diet and weight on taste responses in diet-induced obese mice. Obesity. 2020;28:284–92. doi:10.1002/oby.22684.

[32] Braymer H D, Zachary H, Schreiber AL, Primeaux SD. Lingual CD36 and nutritional status differentially regulate fat preference in obesity-prone and obesity-resistant rats. Physiol Behav. 2017;174:120–7. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.015.

[33] Schéle E, Bake T, Rabasa C, Dickson SL. Centrally administered ghrelin acutely influences food choice in rodents. PLoS ONE. 2016;11:e0149456. doi:10.1371/journal.pone.0149456.
[34] Mitchell N, Roseberry AG. Effects of cocaine and fasting on the intake of individual macronutrients in rats. Front Neurosci. 2019;13:805. doi:10.3389/fnins.2019.00805.
[35] Podzimek Š, Dušková M, Broukal Z, Rácz B, Stárka L, Dušková J. The evolution of taste and perinatal programming of taste preferences. Physiol Res. 2018;67:S421–9. doi:10.33549/physiolres.934026.
[36] Nehring I, Kostka T, von Kries R, Rehfuess EA. Impacts of in utero and early infant taste experiences on later taste acceptance: a systematic review. J Nutr. 2015;145:1271–9. doi:10.3945/jn.114.203976.
[37] Salas M, Rubio L, Torrero C, Carreon M, Regalado M. Effects of perinatal undernutrition on the circumvallate papilla of developing Wistar rats. Acta Histochem. 2016;118:581–7. doi:10.1016/j.acthis.2016.06.003.
[38] Song L, Chen K, Yan J, Zhang Y, Mao X, Lu B, et al. Maternal high-fat diet during gestation and lactation increases conditioned aversion threshold for sucrose and alters sweet taste receptors expression in taste buds in rat offspring. Physiol Behav. 2019;212:112709. doi:10.1016/j.physbeh.2019.112709.
[39] Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014;17:379–85. doi:10.1097/MCO.0000000000000058.
[40] Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:15069–74. doi:10.1073/pnas.0706890104.
[41] Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KSH, Ilegems E, Daly K, et al. T1r3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na+-glucose cotransporter 1. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:15075–80. doi:10.1073/pnas.0706678104.
[42] Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Tyrberg B. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. PNAS. 2012;109:E524–32. doi:10.1073/pnas.1115183109.
[43] Moullé VS, Foll CL, Philippe E, Kassis N, Rouch C, Marsollier N, et al. Fatty acid transporter CD36 mediates hypothalamic effect of fatty acids on food intake in rats. PLOS ONE. 2013;8:e74021. doi:10.1371/journal.pone.0074021.
[44] Brojeni MS, Nasseri F, Haghparast A, Eliassi A. Paraventricular nucleus-microinjected glucose increases food intake in 18 h food-deprived rats: a central regulatory mechanism on serum ghrelin and leptin levels. Eur J Pharmacol. 2020;876:173073. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173073.
[45] Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats★. Physiol Behav. 1976;17:201–8. doi:10.1016/0031-9384(76)90064-0.
[46] Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. Horm Behav. 2002;42:461–71. doi:10.1006/hbeh.2002.1835.
[47] Smarr B, Rowland NE, Zucker I. Male and female mice show equal variability in food intake across 4-day spans that encompass estrous cycles. PLOS ONE. 2019;14:e0218935. doi:10.1371/journal.pone.0218935.
[48] da Silva Aragão R, Guzmán-Quevedo O, Pérez-García G, Manhães-de-Castro R, Bolaños-Jiménez F. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. Br J Nutr. 2014;112:328–37. doi:10.1017/S0007114514000865.
[49] Guzmán-Quevedo O, Da Silva Aragão R, Pérez García G, Matos RJB, de Sa Braga Oliveira A, Manhães de Castro R, et al. Impaired hypothalamic mTOR activation in the adult rat offspring born to mothers fed a low-protein diet. PLoS ONE. 2013;8:e74990. doi:10.1371/journal.pone.0074990.
[50] Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. Front Integr Neurosci. 2009;3:12.

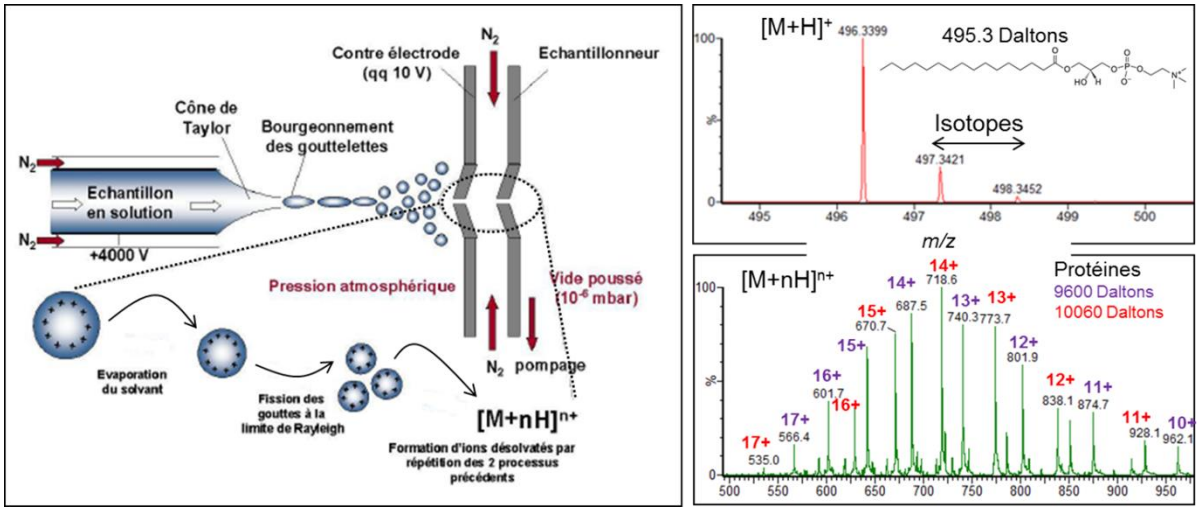
ANNEXE 2 : Paramètres analytiques sélectionnés pour la quantification des sphingolipides (291).

Name	Cone/collision (V)	MRM transition (m/z)
S1P d18:1	28/14	380.2 → 264.3
S1P d17:1, IS	28/14	366.2 → 250.3
Cer (d18:1/16:0)	28/26	538.5 → 264.3
Cer (d18:1/18:1)	28/24	564.5 → 264.3
Cer (d18:1/18:0)	30/26	566.5 → 264.3
Cer (d18:1/20:1)	28/26	592.3 → 264.3
Cer (d18:1/20:0)	28/26	594.3 → 264.3
Cer (d18:1/22:1)	30/30	620.6 → 264.3
Cer (d18:1/22:0)	30/30	622.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:1)	28/30	648.6 → 264.3
Cer (d18:1/24:0)	34/26	650.6 → 264.3
Cer (d18:1/17:0), IS	28/28	552.5 → 264.3
SM (d18:1/16:0)	58/26	703.6 → 184.1
SM (d18:1/18:1)	32/40	729.6 → 184.1
SM (d18:1/18:0)	58/32	731.5 → 184.1
SM (d18:1/20:1)	38/30	757.4 → 184.1
SM (d18:1/20:0)	46/26	759.7 → 184.1
SM (d18:1/22:1)	38/30	785.7 → 184.1
SM (d18:1/22:0)	40/30	787.7 → 184.1
SM (d18:1/24:1)	38/30	813.7 → 184.1
SM (d18:1/24:0)	36/30	815.7 → 184.1
SM (d18:1/17:0), IS	56/30	717.6 → 184.1

MRM: multiple reaction monitoring; S1P: sphingosine-1-phosphate; Cer: ceramide; SM: sphingomyelin; IS: internal standard.

ANNEXE 3 : Illustration de l'électronébulisation (292).

ANNEXE 4 : Schéma d'une source électrospray et exemples de spectres de masse (292).



ANNEXE 5 : Détails des méthodes d'élution.

Methods	Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
Targeted analysis of sphingolipids2	0.0	60	40
	4.0	1	99
Acquity® BEH C18 column	5.5	1	99
2.1 × 50 mm, 1.7 µm	6.0	60	40
400 µL/min	8.0	60	40
60 °C			

ANNEXE 6 : Détails des méthodes d'élution.

Methods	Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
	0.0	60	40
Non-targeted lipidomic1	2.0	57	43
	2.1	50	50
Acquity® CSH C18 column	12.0	46	54
2.1 × 100 mm, 1.7 µm	12.1	30	70
400 µL/min	18.1	1	99
55 °C	20.0	1	99
	22.0	60	40