

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Université de la Méditerranée Aix-Marseille II
Faculté de Médecine de Marseille
UMR INRA 1260
« Nutriments Lipidiques et Prévention des maladies Cardiovasculaires »

Thèse présentée le 17 décembre 2010 par

Qin DU

**Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée
Option : Nutrition et Sécurité Alimentaire**

**OPTIMISATION DES PROFILS LIPIDIQUES DU CERVEAU
DE RATS DEFICIENTS EN OMEGA-3 AU SEVRAGE PAR
L'UTILISATION DE MATIERE GRASSE LAITIERE
-CONSEQUENCES AU NIVEAU DU LIPIDOME-**

JURY:

Mr Pierre CARAYON	Président
Mr Philippe GUESNET	Rapporteur
Mme Blandine COMTE	Rapporteur
Mme Bernadette DELPLANQUE	Co-directrice de Thèse
Mr Jean-Charles MARTIN	Co-directeur de Thèse
Mr Florent JOFFRE	Examineur
Mme Pascale LE RUYET	Examineur
Mme Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN	Examineur

Remerciements

Ce travail de thèse a été conduit au sein de l'unité de recherche INRA 1260 « Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques » à l'université Aix-Marseille 1 et 2 avec le financement de l'Assistance Publique hôpitaux de Marseille. La partie présentée de l'expérimentation animale dans ce manuscrit a été réalisée dans l'UMR 8195 CNRS « Centre de Neurosciences Paris-Sud », NMPA « Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire » à l'université Paris sud.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Philippe Guesnet et Mme Blandine Comte de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et d'y avoir consacré un temps précieux.

Je remercie sincèrement Monsieur Pierre Carayon, mon directeur de stage clinique, qui m'a permis de consacrer assez de temps aux recherches de cette thèse et qui a eu gentillesse d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je souhaite également remercier Monsieur Florent Joffre pour sa participation à mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement Mme Pascale Le Ruyet, pour sa participation à mon jury de thèse. Vous m'avez aussi permis de présenter mes résultats dans des congrès internationaux.

Je remercie également Madame Marie-Josèphe Amiot-Carlin de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et bien vouloir être examinateur de mon projet de thèse.

Je tiens à remercier,

Monsieur Jean-Charles Martin, mon directeur de thèse, qui m'a fait découvrir le monde de la recherche en lipides. Merci de m'avoir proposé ce sujet de thèse, de m'avoir encadrée et soutenue durant ces trois années et d'avoir m'avoir inculqué la rigueur scientifique. Vous m'avez appris à connaître la lipidologie et la statistique multivariée. Et merci aussi pour votre bonne humeur dans le bureau, cela m'a appris le vrai français et le vrai sens humoristique français.

Madame Bernadette Delplanque, ma co-directrice de thèse, de m'avoir acceptée en thèse et de m'avoir encadrée et soutenue durant ces 2 années. Vous m'avez appris à être patiente devant mes résultats. Et merci aussi de m'avoir appris la biochimie des acides gras patiemment par mail ou par téléphone, et malgré la distance, de m'avoir aussi appris le français.

Monsieur Richard Planells et Mme Marguerite Gastaldi, d'avoir accepté le sujet de l'obésité infantile et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, bien que le projet ait été reporté. Et merci aussi de votre participation à mon comité de thèse, et de m'avoir donnée de conseils, ainsi que pour leur soutien au moment de la rédaction du rapport en fin de 2^{ème} année.

Monsieur Denis Lairon, pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein du laboratoire, ainsi que ses encouragements.

Madame Nicole Pagès, pour sa participation dans le suivi du protocole animal et son implication dans les corrections de cette thèse.

Monsieur Victor Pirisi, pour son soutien technique en CPG et pour la méthylation des acides gras.

Madame Nathalie Bazet, Monsieur Romain Bott, Monsieur Claude Villard, pour leurs soutiens techniques de LC-MS, et pour m'avoir montré et appris les difficultés de cette technique.

Madame Christiane Malezet, pour m'avoir montré et appris la technique de la PCR en temps réel.

Madame Catherine Defoort, Madame Martine Armand, Béatrice et Cyrielle, qui ont toujours répondu à toutes mes petites questions en CPG avec le sourire, et leurs précieux conseils en CPG et à Catherine pour son aide sur le SIMCA.

Madame Geneviève Agnani, Monsieur Daniel Gripois, Madame Sandra Van der Gheest, pour leur participation dans le suivi du protocole animal.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'UMR de m'avoir permis d'évoluer dans un laboratoire chaleureux et merci à tous ceux qui m'ont soutenue et aidée à un moment ou à un autre, au cours de ces 3 années.

Je remercie l'ensemble du personnel du service de Biochimie et Biologie moléculaire de l'Hôpital de la Timone de m'avoir permis de bien organiser le travail clinique et le travail de thèse au cours de ces années. En particulier, je tiens à remercier Mme Dominique Marido, la secrétaire du test à la sueur, pour ses aides, sa gentillesse, et ses encouragements permanents.

Je remercie tous les thésards présents et passés :

Amélie, Clémentine, Olfa, Cyrielle, Béatrice, Marco, Alessandra, Stéphanie pour tous les thés, repas, discussions, manips, rires, invitations de soirées....partagés !

Aussi tous les autres : Marie-Hélène, Matthieu, Florent, Nicole, Emmanuelle, Marion, Alain, Marie, Maya, Myriam Mimoun, Myriam Moussa, Ahd, Erwan, Frank, Gaëlle, Julie, Ziad, Eveline, Patrick, Fabien.....

Enfin, un grand Merci :

A mon mari Min, de m'avoir attendue patiemment pendant 3 ans, tu me soutiens, me supportes et m'aides dans cette vie de thésarde, vie loin de la famille.....

A mes parents qui m'ont permis de faire autant d'années d'étude, et dans les meilleures conditions possibles, et qui m'ont supportée et encouragée au cours de ces longues années, notamment ces 5 années en France.

Liste des publications

Articles

1. **Du Q**, Martin JC, Agnani G, Pages N, Le Ruyet P, Gripois D, Carayon P, Delplanque B. Dairy fat blends enriched in α -linolenic acid are more efficient than n-3 fatty acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brain of neonate rats. Submitted to **J.N.B**
2. Pages N, Maurois P, Vamecq J, Bac P, Martin JC, **Du Q**, Rapoport S, Delplanque B. Neuroprotective effect of dietary rapeseed oil (rich in omega3) on epileptic magnesium-deficient mice. In preparation to for submission.

Communications scientifiques

1. **Du Q**, Delplanque B, Agnani G, Planells R, Carayon P, Le Ruyet P, Martin JC. Identification of a lipidomic signature sensitive to palm or butter-fat based diets in the brain of omega3 deficient young rats. 5ème Congrès International Goût Nutrition Santé, Dijon, mars 2010.
2. **Du Q**, Delplanque B, Agnani G, Planells R, Carayon P, Le Ruyet P, Martin JC. Identification of a lipidomic signature sensitive to palm or butter-fat based diets in the brain of omega3 deficient young rats. 9th Congrès ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids), Maastricht, Juin 2010.
3. Delplanque B, **Du Q**, Agnani G, Martin JC, Pages N, Saddi A, Van der Geest S, Gripois D, Le Ruyet P. Post weaning restoration of brain DHA levels in deficient omega-3 rats is better with butter diets independently of ALA levels. 9th Congrès ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids), Maastricht, Juin 2010.
4. Delplanque B, **Du Q**, Agnani G, Martin JC, Pages N, Saddi A, Van der Geest S, Gripois D, Le Ruyet P. Post weaning restoration of brain DHA levels in deficient omega-3 rats is better with butter diets independently of ALA levels. 7th Congrès GERLI (Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique), Anglet, octobre 2010.
5. Delplanque B, **Du Q**, Saddi A, Martin JC, Pages N, Agnani G, Gripois D. Both ALA intake and the dietary fat matrix during gestation and lactation in the rat have a long lasting modulating effect on the brain DHA status in the offspring. 8th Congrès EFL (Euro Fed Lipid), Munich, novembre 2010.
6. Delplanque B, **Du Q**, Saddi A, Martin JC, Pages N, Agnani G, Gripois D. Impact du statut en omega-3 de la mère sur la teneur en DHA du cerveau de rats nouveau-nés, sevrés et à 6 semaines post-sevrage. 8th Congrès JNF (Journées Francophones de Nutrition), Lille, décembre 2010.
7. Delplanque B, **Du Q**, Agnani G, Martin JC, Pages N, Gripois D, Le Ruyet P. Les lipides en alimentation infantile : intérêt de la matière grasse laitière pour la restauration des

valeurs du DHA cérébral chez le jeune rat déficient en omega-3. 8th Congrès JNF (Journées Francophones de Nutrition), Lille, décembre 2010.

8. Delplanque B, **Du Q**, Saddi A, Martin JC, Pages N, Agnani G, Gripois D. Rapeseed-rich or ALA-poor dams diets modulate brain DHA levels of new-born, weaning and post-weaning young rats reared on different diets. 13th Congrès IRC (International Rapeseed Congress), Prague, juin 2011.

Liste des abréviations

ACO: Acyl-CoA oxydase
ACP: Analyse en composante principale
AG: Acides gras
AGI: Acides gras indispensables
AGPI: Acides gras polyinsaturés
AGPI-LC: Acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS: Acides gras saturés
AGMI: Acides gras monoinsaturés
ALA: Acide α -linoléique
ARA: Acide arachidonique
CoA: Coenzyme A
COX: Cyclooxygenase
CPT1: Carnitine palmitoyltransférase-1
DGLA: Acide dihomogammalinoléique
DHA: Acide docosahexaénoïque
DPA: Acide docosapentaénoïque
EPA: Acide eicosapentaénoïque
ETA: Acide eicosatétraénoïque
FABP: Fatty acid binding protein
FADS1: Fatty Acid Desaturase 1
FADS2: Fatty Acid Desaturase 2
GLA: Acide γ -linoléique
HPLC: Chromatographie liquide haute performance
LA: Acide linoléique
LPL: Lipoprotéine lipase
LTs: Leucotriènes
LXR α : Liver X receptors
MGLA: Matière Grasse Laitière Anhydre
MS: Spectrométrie de masse
NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NDA: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NPD1: Neuroprotectine D1

OPLS: Orthogonal partial least square
O2PLS-DA: Orthogonal projection to latent structures discriminant analysis
OSC: Orthogonal signal correction
PC: Phosphatidyl Choline
PE: Phosphatidyl Ethanolamine
PGs: Prostaglandines
PGIs: Prostacyclines
PI: Phosphatidyl Inositol
PL: Phospholipides
PLS: Partial least-squares
PLS-DA: Partial least-squares discriminant analysis
PLT: Glycérophospholipides totaux
PS: Phosphatidyl Sérine
PPARs: Peroxisome proliferation activated receptors
RMN: Résonance magnétique nucléaire
RXR: Retinoid X receptor
SA: Acide stéaridonique
SCD1: Stéaroyl-CoA désaturase
SNC: Système nerveux central
SREBPs: Sterol regulatory element binding proteins
TG: Triglycérides
TXs: Thromboxanes
VIP: Variable importance in projection

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un phospholipide (phosphoglycérolipide)	17
Figure 2 : Structure d'un triglycéride	17
Figure 3 : Structure de l'acide stéarique.....	18
Figure 4 : Structure de l'acide oléique	18
Figure 5 : Structures de l'acide α -linoléique et de l'acide linoléique.....	19
Figure 6 : Bilan de la synthèse <i>de novo</i> de l'acide palmitique (C16 :0)	21
Figure 7 : Bilan de la synthèse des acides gras monoinsaturés	22
Figure 8 : Voies de synthèse des acides linoléique et α -linoléique chez les végétaux.....	23
Figure 9 : Différentes voies métaboliques des AGI	24
Figure 10 : Voies de bioconversion des AGPI de la série n-6 et n-3 chez l'Homme.....	26
Figure 11 : Schéma simplifié de métabolismes des AGPI et formation des eicosanoïdes	33
Figure 12 : Schéma du transport du DHA dans le tissu et de la formation de NPD1	35
Figure 13 : Représentation schématique des technologies-omiques.....	43
Figure 14 : La nutriginomique se sert d'outils technologiques de pointe dérivés de la génomique pour identifier et caractériser les «signatures alimentaires».....	44
Figure 15 : La place de la métabolomique dans l'intégration des sciences en « omique »	45
Figure 16 : Structures de chaque catégorie lipidique	47
Figure 17 : Représentation schématique de la lipidomique et de la métabolomique	48
Figure 18 : Schématisation de la stratégie analytique la plus fréquemment utilisée pour une approche ciblée de lipidomique.....	49
Figure 19 : Schéma de classification des lipides cérébraux principaux	50
Figure 20 : Structures de sphingolipides	51
Figure 21 : Structures de glycérophospholipides	52
Figure 22 : Schéma des protocoles expérimentaux	56
Figure 23 : Un exemple de chromatogramme du profil d'acides gras cérébraux	61
Figure 24 : L'interface MZedDB pour l'annotation des adduits issus de l'analyse en haute résolution issue de la spectrométrie de masse	69
Figure 25 : Principes de l'analyse en composantes principales.	70
Figure 26 : Principe de l'analyse PLS..	71
Figure 27: Analyse en O2PLS-DA des acides gras cérébraux.....	119
Figure 28 : Analyse en O2PLS-DA des acides gras cérébraux.....	120
Figure 29 : Analyse en ACP de lipidomes cérébraux.	123
Figure 30 : Analyse en PLS-DA des lipides cérébraux de rats..	125
Figure 31 : Test de permutation effectué sur l'analyse PLS-DA présentée en figure 30.....	126
Figure 32 : Variables « VIP » plot effectué sur l'analyse PLS-DA présentée en figure 30... ..	126
Figure 33 : Analyse en PLS-DA des lipides cérébraux après sélection de variables.....	127
Figure 34 : Dendrogramme obtenu par classification hiérarchique ascendante des données présentée en figure 33	128
Figure 35 : carte des variables (Loading plot) représentant les 119 variables lipidiques sélectionnées en fonction de leur contribution à la composante 1.	129
Figure 36 : Les blocks ou variables composites correspondent aux regroupements calculés figure 35. Les couleurs correspondent à la valeur des scores des variables composites, reflet des changements induits par les régimes au niveau des 119 ions constitutifs	130
Figure 37 : Block vert clair ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes.	132

Figure 38 : block vert foncé; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes.	133
Figure 39 : block fuchsia ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes.	134
Figure 40 : block jaune ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes	135
Figure 41 : block bleu ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes.	136
Figure 42 : le block rouge ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes.	137
Figure 43 : graphe VIP des ensembles lipidomiques sensibles à l'influence nutritionnelle de la figure 37	138
Figure 44 : Triterpénoïde, formule brute $C_{30}H_{48}O_7S$, masse exacte 552,312079 uma.....	139

Liste des tableaux

Tableau 1 : sources alimentaires en AGPI	39
Tableau 2 : Recommandations en lipides pour les formules infantiles	42
Tableau 3 : Classification des lipides et les exemples typiques	47
Tableau 4 : La composition du régime alimentaire (%AGT).....	59
Tableau 5 : La composition du régime alimentaire (g pour 100g d'aliment).....	59
Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces des gènes étudiés	64
Tableau 7 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses sur le système Agilent RRLC 1200 à l'aide de la colonne NUCLEODUR [®] C18 Isis.....	66
Tableau 8 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre hybride, Q-TOF en mode d'ionisation ESI+	67
Tableau 9 : Valeurs d'acides gras (pourcentage des AGT) ségrégeants les rats soumis aux 4 régimes.	120
Tableau 10 : DHA du cerveau (pourcentage des acides gras totaux).....	122
Tableau 11 : Block vert clair ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 22 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposé.....	132
Tableau 12 : block vert foncé ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 59 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identifications proposées	133
Tableau 13 : block fuchsia ; 9 ions les plus caractéristiques sur les 9 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée	134
Tableau 14 : block jaune ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 24 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée	135
Tableau 15 : block bleu ; 3 ions les plus caractéristiques sur les 3 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée	136
Tableau 16 : block rouge; 2 ions les plus caractéristiques sur les 2 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée	137

Sommaire

Sommaire	11
Avant-propos	13
Introduction	15
I. Acides gras et nutrition infantile	
1. Généralité sur les acides gras.....	16
1.1. Acides gras saturés (AGS).....	18
1.2. Acides gras monoinsaturés (AGMI).....	18
1.3. Acides gras polyinsaturés (AGPI).....	19
2. Métabolisme des acides gras.....	19
2.1. Métabolisme des AGS.....	20
2.2. Métabolisme des AGMI.....	21
2.3. Métabolisme des AGPI.....	23
2.3.1. Origines et différentes voies métaboliques des AGPI.....	23
2.3.2. Voies de conversion de l'acide α -linoléique (ALA) et de l'acide linoléique (LA).....	25
2.3.3. Effet de l'apport en acides gras alimentaires sur la conversion des AGPI.....	28
2.3.4. Effet du sexe sur la conversion des AGPI.....	29
3. Rôles biologiques des acides gras.....	31
3.1. Acides gras et régulation de gènes.....	31
3.2. Acides gras et messagers cellulaires	33
3.3. Acides gras et développement infantile : cas des AGPI.....	36
3.3.1. AGPI et le développement du cerveau et du système visuel.....	36
3.3.2. Autre effets des AGPI.....	38
4. Source et recommandation en AGPI.....	39
4.1. Sources alimentaires en AGPI.....	39
4.2. Recommandations en AGPI.....	40
4.3. Recommandations pour les laits infantiles.....	41
II. La lipidomique dans le cerveau	
1. Généralité de la lipidomique.....	43
1.1. Les différentes approches des « omiques ».....	43
1.2. La métabolomique.....	45
1.3. La lipidomique	46
1.3.1. Définition et classification des lipides	46
1.3.2. Une nouvelle approche ciblée : lipidomique.....	48
2. Lipidomique et cerveau.....	49
2.1. Des lipides cérébraux.....	49
2.1.1. Sphingolipides du cerveau.....	50
2.1.2. Glycophospholipides du cerveau.....	51
3. Lipidomique cérébrale	52

Objectif de l'étude	54
Matériels et méthodes	55
1. Animaux et régimes.....	56
1.1. Animaux et protocole nutritionnel	56
1.2. Composition des régimes acides gras alimentaires.....	58
2. Analyses des profils en acides gras des différents tissus.....	60
2.1. Protocoles.....	60
2.1.1. Analyse du profil en acides gras du cerveau.....	60
2.1.2. Analyse du profil en acides gras des globules rouges.....	62
2.1.3. Analyse du profil en acides gras du plasma.....	62
2.2. Analyse de l'expression des gènes dans la voie de biosynthèse des AGPI par désaturation/élongation	63
2.3. Analyse lipidomique du cerveau.....	65
2.3.1. Protocoles d'analyses.....	65
2.3.2. Analyse des données.....	67
3. Analyse statistiques.....	69
Résultats et discussions	75
1. Analyse des profils d'acides gras dans différents tissus.....	76
1.1. Article "Dairy fat blends enriched in α -linolenic acid are more efficient than n-3 fatty acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brain of neonate rats".....	76
1.2. Analyse des profils d'acides gras cérébraux.....	118
2. Analyse des profils lipidomiques dans le cerveau (Lipidomics).....	123
2.1. Analyse non supervisée de type ACP.....	123
2.2. Effet du régime sur le profile lipidomique dans le cerveau.....	124
2.2.1. Analyse supervisée de type PLS-DA.....	124
2.2.2. Validation du modèle PLS-DA.....	125
2.2.3. Réduction du nombre d'ion.....	126
2.2.4 Nouveau modèle de PLS-DA calculés avec les ions sélectionnés...127	
2.2.5 Classification des ions d'intérêt.....	127
2.2.6 Changements des blocks de lipides induits par l'effet du régime.....	129
2.3. Identification des biomarqueurs lipidomiques caractéristiques des régimes dans les différents ensembles (blocks).....	131
Conclusion générale	141
Perspectives	144

Avant-propos

Le cerveau est un organe particulièrement riche en lipides, tout particulièrement en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC). Ceux-ci y jouent un rôle fonctionnel fondamental, notamment au niveau des fonctions visuelles et cognitives. L'acide docosahexaénoïque (DHA) est le plus important de ceux-ci, et s'accumule rapidement et principalement dans le cerveau humain au cours de la période périnatale et des 2 premières années de la vie. Cet acide gras a une origine endogène, à partir de la bioconversion de l'acide gras parent de série n-3, l'acide α -linoléique (ALA), et une origine exogène, à partir d'apports alimentaires directs ; dans les deux cas, le DHA de l'organisme dépend exclusivement des apports de l'alimentation, soit en acide gras parental, soit sous forme pré-formée. Des apports inadéquats pendant cette période exceptionnellement importante pour le développement ont un retentissement à long terme.

S'agissant de la biosynthèse endogène, les AGPI n-3 entrent en compétition avec les AGPI de la série n-6 pour les voies métaboliques. Donc leurs conversions sont influencées par le rapport n-6/n-3 alimentaire. D'autres facteurs comme les facteurs génétiques, l'âge et la quantité des acides gras alimentaires disponibles influent également sur la quantité et la qualité des AGPI néosynthétisés. En particulier, la synthèse endogène de ces AGPI-LC en période néonatale est trop faible pour répondre aux besoins des tissus en croissance, et plus particulièrement ceux du système nerveux central. C'est donc pour combler ces besoins en AGPI-LC n-3 qu'il est nécessaire d'assurer des apports adéquats et/ou d'en optimiser la capacité de biosynthèse.

Depuis les 50 dernières années, les laits infantiles ont connu une évolution constante en lien avec la meilleure connaissance des besoins du nourrisson. En Europe et aux Etats Unis, les formules infantiles sont généralement préparées à partir d'huile végétale et sont supplémentées en DHA et ARA depuis les années 2000. Cependant, en Asie, ils sont préparés avec des matières grasses laitières (MGLA). Ces dernières ont des compositions plus proches du lait maternel, contenant notamment du cholestérol et des acides gras saturés (AGS) à courte et moyenne chaîne. Bien que parfois les formules infantiles à base d'huile végétale comprennent de l'huile de coprah (44-51% acide laurique ; 13-18% acide myristique), le profil des AGS à courte et moyenne chaîne dans la MGLA est de toute façon plus proches du lait maternel. Il est bien connu que les AGS à courte et moyenne chaîne sont digérés plus efficacement et oxydés plus rapidement, et qu'ils présentent des bénéfices sur la santé. Par

exemple des études récentes ont montré que les AGS à courte chaîne sont capables de diminuer le cholestérol circulant et d'augmenter les proportions en AGPI dans les tissus. En plus, une étude réalisée chez l'Homme et en culture cellulaire a montré que l'acide myristique C14 :0, un acide gras à chaîne moyenne présent dans la MGLA peut faciliter la conversion des AGPI n-3 (Jan et al. 2004; Dabadie et al. 2005). Le potentiel de la MGLA pour améliorer la synthèse des AGPI-LC et leur accumulation dans le système nerveux central n'a été que peu étudié.

Mon travail de thèse a été réalisé dans cette perspective. Je me suis particulièrement attachée à étudier les effets de régimes à base d'huile de palme et de MGLA sur les profils d'acides gras dans différents tissus du rat, au niveau du plasma, des globules rouges, et du cerveau. Des approches récentes d'analyse globale des profils lipidiques ou « lipidomique » sont maintenant disponibles. Nous avons complété nos analyses sur l'effet des régimes sur les teneurs en AGPI-LC n-3 en réalisant une analyse lipidomique du cerveau des rats, afin de déterminer si au-delà des contenus en acides gras, le type d'alimentation en période néonatale pouvait influencer sur des structures lipidiques plus complexes.

I N T R O D U C T I O N

Introduction

I Acides gras et nutrition infantile

1. Généralités sur les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques (-COOH) aliphatiques comprenant des atomes de carbone en nombre varié et présentant ou non des doubles liaisons C-C. Leur formule générale est $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$. Dans les cellules et le sang des mammifères, ils sont présents en faible concentration à l'état libre, l'essentiel étant engagé dans des liaisons de type ester ou amide. Ces molécules de base sont présentes dans l'ensemble des lipides et jouent à ce titre un rôle fondamental.

Dans le corps humain, ils interviennent ainsi dans divers processus :

- Ce sont des sources majeures d'énergie pour la croissance et la physiologie de l'organisme. Ils sont stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux. Lors d'un effort, l'organisme puise dans ces réserves afin de produire de l'ATP.
- Ils servent à la synthèse d'autres lipides, en particulier les phospholipides (PL, figure 1) qui jouent un rôle majeur dans la composition des membranes cellulaires et sub-cellulaires. La composition en AG des PL confère aux membranes des propriétés physiques (élasticité, viscosité) particulières.
- Ils interviennent aussi comme messagers intra- et extra-cellulaires : certains acides gras, dont les acides gras polyinsaturés de la série n-6 et n-3, sont les précurseurs des eïcosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, prostacyclines et leucotriènes) (Claria and Serhan 1995; Chiang et al. 1999; Bandeira-Melo et al. 2000; Levy et al. 2001; Ariel and Serhan 2007; Levy et al. 2007). Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes des séries 2 (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes) et de la série 4 (leucotriène), hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine, *etc.*
- Les acides gras (polyinsaturés principalement) et leurs dérivés oxygénés peuvent également être des ligands de récepteurs nucléaires (PPARs, SREBPs, LXRx) (Hertz et al. 1998; Xu et al. 1999; Yahagi et al. 1999; Ou et al. 2001; Xu et al. 2001; Yoshikawa et al.

2002), et jouent de ce fait un rôle important dans la régulation de l'activité de certains gènes.

Ils interviennent ainsi dans le fonctionnement du système nerveux central incluant la vision mais aussi dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, l'asthme, les processus inflammatoires, ou encore les cancers.

Ils représentent l'essentiel des graisses alimentaires. Les acides gras alimentaires existent sous forme de complexes lipidiques, comme des acylglycérols (triglycérides et phospholipides), d'acides gras libres, et de stérides. Parmi eux, les triglycérides (TG, figure 2) sont les sources principales des lipides du bol alimentaire : 100 g de triglycérides peuvent produire 95 g d'acides gras. Différents types (qualité) et/ou proportions (quantité) d'acides gras alimentaires peuvent agir sur la santé et le développement infantile.

Figure 1 : Structure d'un phospholipide (phosphoglycérolipide)

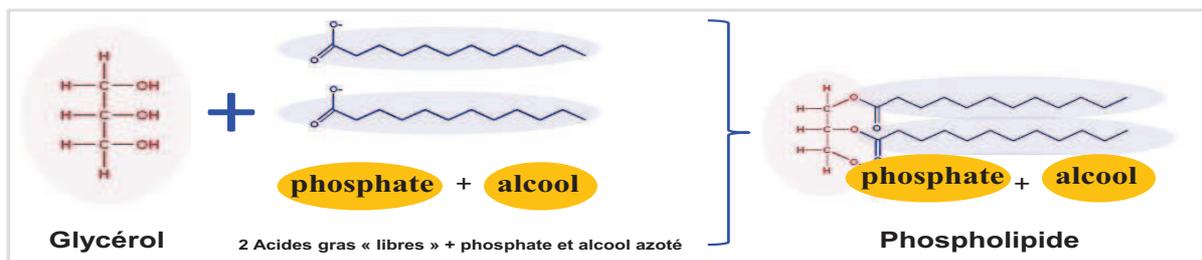
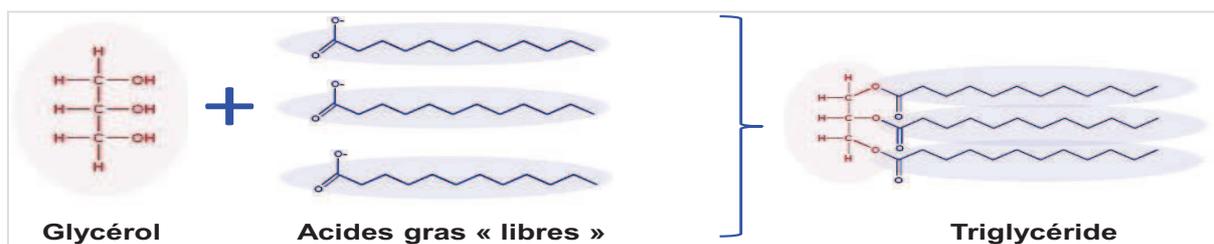


Figure 2 : Structure d'un triglycéride



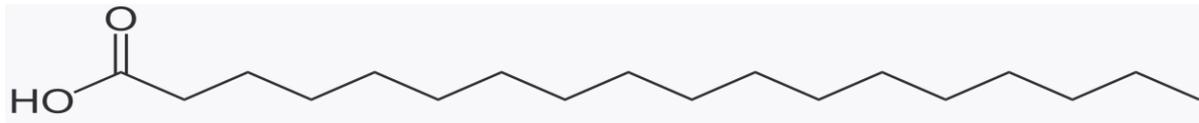
Les acides gras naturels les plus communs possèdent une chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone avec ou sans doubles liaisons. Selon le nombre de carbones, on distingue les acides gras à chaîne courte (nombre de carbones inférieur à 8), moyenne (nombre de carbones compris entre 8 et 12), longue (nombre de carbones variant entre 14 et 18) et très longue (nombre de carbones égal ou supérieur à 20).

Selon le nombre de doubles liaisons, on distingue les acides gras saturés (absence de double liaison), les acides gras mono-insaturés (1 double liaison) et les acides gras polyinsaturés (2 ou plusieurs doubles liaisons). La présence de ces doubles liaisons et leur position confère à chaque acide gras des propriétés physico-chimiques particulières.

1.1. Acides gras saturés (AGS)

Les atomes de carbone dans la chaîne carbonée sont liés entre eux par de simples liaisons. Tous les atomes de C sont saturés en hydrogène. Un exemple de structure d'AGS est présenté en figure 3.

Figure 3 : Structure de l'acide stéarique en C18 (C18 :0)



1.2. Acides gras monoinsaturés (AGMI)

Ils présentent une double liaison entre deux atomes de carbone. La double liaison est souvent située sur le carbone 9 en partant de l'extrémité opposée au groupement acide. Un exemple de structure d'AGMI est présenté en figure 4. Dans la Figure 4, le symbole n-9 indique que la première double liaison est portée par le 9^e carbone en partant de l'extrémité du groupement méthyl terminal. Le symbole Δ 9 indique que la double liaison se situe le 9^e carbone en partant de l'extrémité du groupement carboxyle.

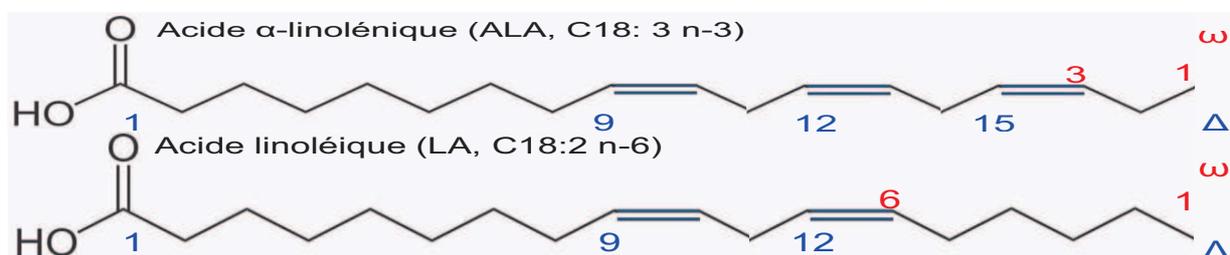
Figure 4 : Structure de l'acide oléique en C18 :1 qui possède 1 double liaison en position Δ 9 (C18:1 n-9) (AGMI ω 9)



1.3. Acides gras polyinsaturés (AGPI)

La chaîne carbonée présente un nombre de doubles liaisons égal ou supérieur à 2. Selon la position de la première double liaison dans la chaîne carbonée, on distingue 2 grandes familles d'AGPI: les AGPI de la série ω -3 (première insaturation située au niveau du carbone 3 compté à partir du méthyl terminal), et ceux de la série ω -6 (première insaturation localisée au niveau du carbone 6 compté à partir du méthyl terminal) (Figure 5). Dans la Figure 5, les symboles n-3 ou n-6 indiquent que la première double liaison est portée par le 3^e ou 6^e carbone en partant de l'extrémité du groupement méthyl terminal. Les symboles Δ 9, 12, 15 de l'ALA indiquent que les doubles liaisons se situent le 9^e, 12^e et 15^e carbones en partant de l'extrémité du groupement carboxyle ; et les symboles Δ 9, 12 du LA indiquent que les doubles liaisons se situent le 9^e et 12^e carbones en partant de l'extrémité du groupement carboxyle.

Figure 5 : Structures de l'acide α -linoléique en C18 (3 doubles liaisons en position Δ 9, 12, 15) (C18:3 n-3) (AGPI ω 3) et de l'acide linoléique en C18 (2 doubles liaisons en position 9, 12) (C18 :2 n-6) (AGPI ω 6)



2. Métabolisme des acides gras

Dans la cellule, la lipogénèse (ou biosynthèse) et la lipolyse (principalement la β -oxydation d'un point de vue quantitatif) des acides gras sont les deux composantes du métabolisme des acides gras. Chez l'Homme, la lipogénèse a lieu dans le cytoplasme des cellules, principalement du foie, des tissus adipeux et des glandes mammaires. Elle permet la synthèse d'acides gras saturés par condensation de molécules d'acétates. Cependant, elle ne permet pas de synthétiser des acides gras saturés à plus de 16 carbones (acide palmitique) ou

des acides gras insaturés. Cette synthèse consomme de l'ATP et nécessite comme cofacteur du Coenzyme A (CoA) et du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP). L'élongation des acides gras saturés au-delà de 16 atomes de carbone est réalisée dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Dans le premier cas, l'élongation implique des élongases d'acides gras. Dans le second cas, l'élongation implique paradoxalement certaines enzymes de la lipolyse. La synthèse des acides gras insaturés à partir des acides gras saturés se fait, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, par des désaturases d'acide gras. La désaturation est consommatrice d'oxygène moléculaire (O_2) et utilise comme cofacteur du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD).

La β -oxydation consiste à dégrader des acides gras en unités acétyl en produisant de l'énergie sous forme d'ATP. Ce processus a lieu principalement dans la mitochondrie. Cependant, la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne a lieu essentiellement dans les peroxysomes. Les études chez l'Homme et l'animal ont montré que les taux de β -oxydation des acides gras diffèrent en fonction de leurs structures. En général, la β -oxydation des acides gras insaturés est plus rapide que celle des AGS à longueur de chaîne identique, et les acides gras à chaînes plus longues s'oxydent moins vite que ceux à chaînes plus courtes.

Notre organisme peut synthétiser et dégrader des acides gras, mais aussi les mettre en réserve dans le tissu adipeux sous forme triglycérides où l'acide oléique C18 :1n-9 en est le constituant prédominant (près de 50% des acides gras). En cas de besoin, les graisses de réserve peuvent être dégradées par β -oxydation en produisant de l'énergie ou sont transformées dans le foie vers d'autres voies métaboliques.

La répartition des acides gras entre ces différentes voies métaboliques dépend donc de leur longueur et du degré de saturation de la chaîne carbonée (Scalfi et al. 1991; Bach et al. 1996).

2.1. Métabolisme des AGS

Les AGS des cellules de mammifères peuvent provenir à la fois d'origines exogènes (apport des AGS alimentaires) et endogènes (fabriqués par néosynthèse à partir d'acétate, avec apport d'énergie) (Figure 6). Les unités acétates sont sous la forme d'acétyl-CoA. Cette

voie peut synthétiser des acides gras saturés à chaîne carbonée de différentes longueurs, dont le produit final est l'acide palmitique (C16 :0).

Figure 6 : Bilan de la synthèse *de novo* de l'acide palmitique (C16 :0)



Une fois absorbé ou synthétisé, l'AGS a différents devenir possibles :

- Son oxydation totale peut fournir de l'énergie
 - Son oxydation partielle, peut fournir des unités acétates utilisables dans la néosynthèse des AGS et AGMI
 - Son stockage peut se faire sous forme de TG ou PL
 - Sa bioconversion peut conduire aux dérivés à longue chaîne, grâce à une élongase.
- Une fois synthétisés, les acides gras peuvent être transformés en AGMI stockés sous la forme de triglycérides dans le tissu adipeux.

En général, les AGS à chaîne courte et à chaîne moyenne traversent directement la paroi intestinale. Ils passent dans la veine porte et atteignent le foie où ils sont rapidement oxydés (Curr and Harwood 1991). Plusieurs études ont montré que la digestion directe et l'oxydation rapide d'AGS à chaînes courtes ou moyennes sont capables d'influer sur les dépenses énergétiques (Seaton et al. 1986; Scalfi 1991; Dulloo et al. 1996). Chez le Rat, l'oxydation des AGS diminue quand la longueur de la chaîne carbonée augmente (acide laurique > acide myristique > acide palmitique > acide stéarique) (Leyton et al. 1987; Rioux et al. 2000).

2.2. Métabolisme des AGMI

Chez les mammifères, les AGMI peuvent provenir directement d'apports alimentaires ou indirectement de la bioconversion des AGS exogènes ou endogènes. Cette conversion est effectuée par une $\Delta 9$ -désaturase, qui introduit une double liaison en position 9-10. Les deux substrats favoris de la $\Delta 9$ -désaturase, l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) sont convertis respectivement en acide palmitoléique (C16 :1n-7) et acide oléique (C18 :1n-9)

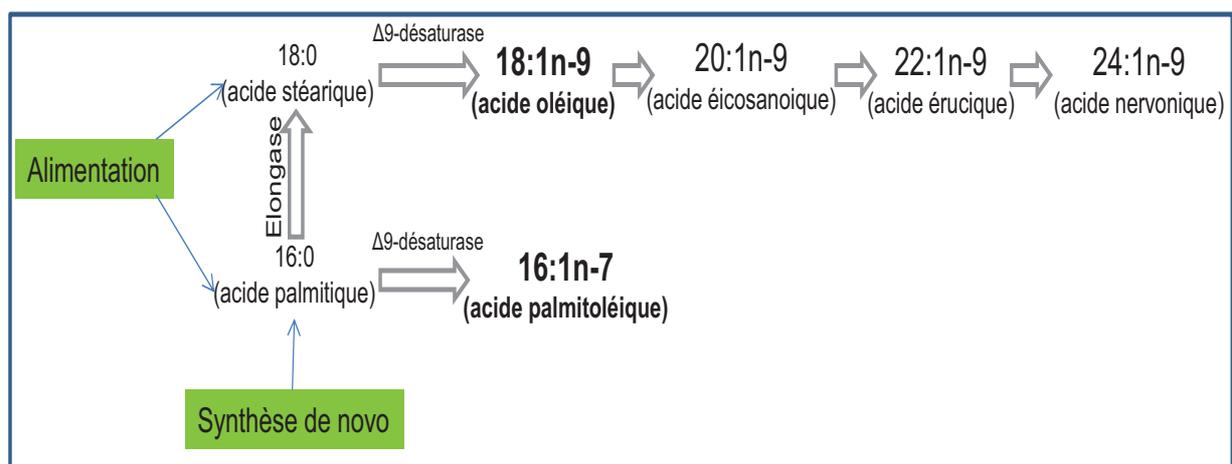
(Enoch et al. 1976). La $\Delta 9$ -désaturase, ou Stéaroyl-CoA désaturase (SCD1) est l'enzyme clé dans cette voie de synthèse. D'après un certain nombre d'études, la SCD1 serait importante dans plusieurs processus métaboliques ou pathologies, comme le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Legrand and Hermier 1992; de Antueno et al. 1993), l'obésité (Enser 1979; Legrand and Hermier 1992; Kouba et al. 1993) et les cancers (Borgeson et al. 1989; Li et al. 1994). Son activité conduit ainsi principalement à la synthèse de l'acide oléique C18 :1n-9. Cet acide gras constitue la brique élémentaire de la synthèse des triglycérides, l'espèce lipidique de mise en réserve des graisses.

Comme pour les AGS, l'AGMI a plusieurs devenir possibles :

- Son oxydation totale peut fournir l'énergie
- Son oxydation partielle, peut fournir des unités acétate nécessaires à la néosynthèse des AGS et AGMI
- Son stockage peut se faire sous forme de TG ou PL
- Sa bioconversion peut conduire à des dérivés à longues chaînes.

Les AGMI sont facilement transformés *via* les processus de conversion et de β -oxydation. L'acide oléique et l'acide palmitoléique sont les précurseurs des autres AGMI de la série n-9 et n-7 (Figure 7).

Figure 7 : Bilan de la synthèse des acides gras monoinsaturés



Chez le Rat, l'ordre préférentiel de β -oxydation des acides gras insaturés les plus courants est: ALA > acide oléique > LA > ARA (Leyton 1987). Cependant, des études réalisées

chez l'Homme en utilisant des traceurs isotopiques stables ont rapporté des résultats contradictoires. Jones et al. (1985) ont montré que l'acide oléique a un taux d'oxydation supérieur à LA et l'ALA. Delany et al. (1995) ont trouvé que l'ALA a un taux d'oxydation plus élevé que le LA et l'acide oléique, alors que les taux d'oxydation du LA et de l'acide oléique sont identiques selon (Demmelmair et al. 1995). Une étude plus récente a montré que l'acide oléique et l'ALA ont le même taux d'oxydation, qui est plus élevé que celui du LA (McCloy et al. 2004). On ne résoudra les différences observées entre ces différentes études qu'en homogénéisant les méthodes mesurant l'oxydation des acides gras, et en utilisant des protocoles nutritionnels identiques menant à ces observations.

2.3. Métabolisme des AGPI

2.3.1. Origines et différentes voies métaboliques des AGPI

Dans les cellules de mammifères, les AGPI peuvent provenir seulement de l'apport alimentaire. Les AGPI ne peuvent pas être néo-synthétisés chez l'Homme et la plupart des mammifères, car il n'existe pas de désaturations en $\Delta 12$ et $\Delta 15$: Ces deux désaturases ne sont présentes que chez les végétaux (Figure 8) (Wallis et al. 2002).

Figure 8 : Voies de synthèse des acides linoléique et α -linoléique chez les végétaux

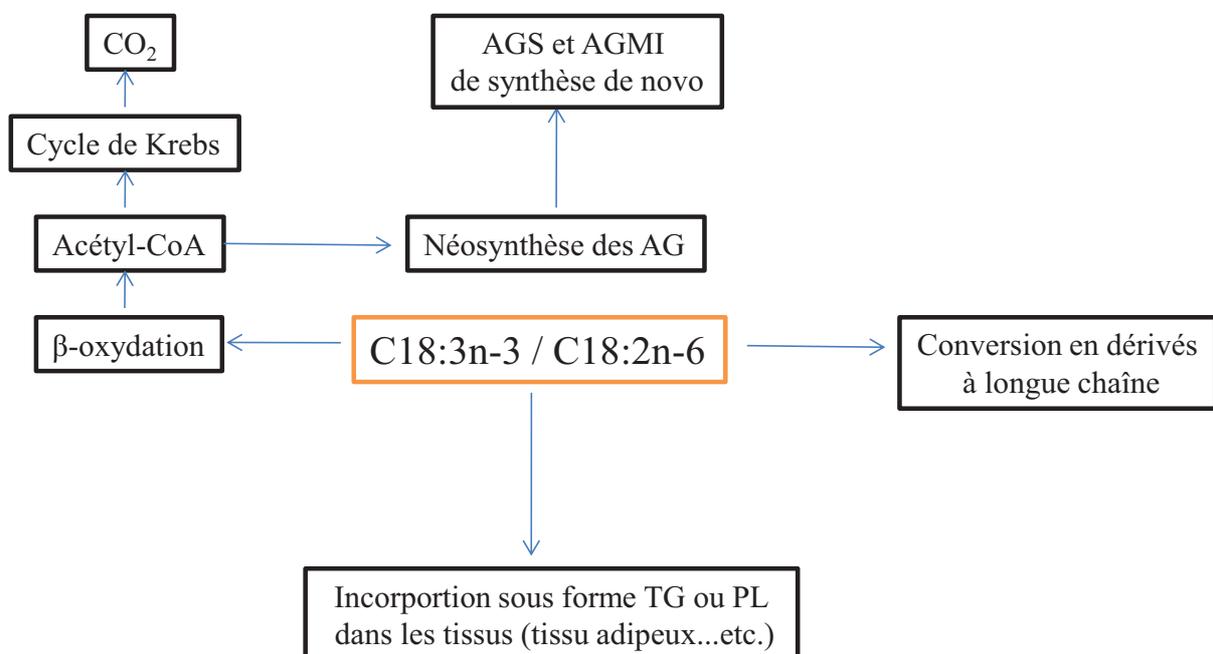


Les AGPI, notamment les AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) sont nécessaires à la croissance, au développement de l'enfant et d'une façon plus générale au maintien de la santé humaine (Innis 1991; Helland et al. 2001; Ghys et al. 2002; Innis 2003). Cependant, l'organisme humain ou animal n'étant pas capable de les néosynthétiser, les AGPI n-3 et n-6 à 20- et 22- atomes de carbone (AGPI-LC n-3 ou n-6) dérivent donc de leurs précurseurs respectifs, l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3) et l'acide linoléique (LA, C18 :2n-6) (Voss et al. 1991; Sprecher et al. 1995; Sauerwald et al. 1997; Innis 2005). Ces deux précurseurs d'acides gras n-3 et n-6 sont appelés acides gras indispensables (AGI) car ils doivent impérativement être apportés par l'alimentation.

Après absorption intestinale, plusieurs devenir possibles s'offrent à ces précurseurs : ALA et LA (Figure 9).

- L'oxydation totale peut fournir de l'énergie
- L'oxydation partielle, peut fournir des unités acétates utilisées pour la néosynthèse des AGS et AGMI
- L'ALA et le LA peuvent être stockés sous forme de TG ou PL
- Ils peuvent enfin être convertis en dérivés à longue chaîne

Figure 9 : Différentes voies métaboliques des AGI



La répartition des AGI, notamment de l'ALA, entre ces différentes voies métaboliques est connue grâce à des études utilisant des traceurs isotopiques stables (marqués au ¹³C). Plusieurs revues complètes ont été publiées sur le sujet (Burdge et al. 2003; Burdge and Wootton 2003; Burdge and Calder 2005; Burdge 2006).

Tant l'ALA que le LA, sont connus comme substrats de la β-oxydation. Quand la fraction orientée vers la β-oxydation a été mesurée dans des conditions identiques, il est apparu que l'ALA était deux fois plus impliqué dans les processus d'oxydation que les acides palmitique, stéarique et oléique (DeLany et al. 2000). Les études mesurant, chez l'Homme

adulte, la quantité de ^{13}C retrouvé dans le CO_2 expiré, ont montré que la proportion d'ALA complètement oxydé atteignait 20 à 33% (DeLany 2000; Vermunt et al. 2000; Bretillon et al. 2001; Burdge et al. 2002; Burdge 2003; Burdge and Wootton 2003) selon la durée des mesures (9-48 heures). La fraction de LA orientée vers la β -oxydation était plus faible que celle de l'ALA (10-19%), dans les mêmes conditions expérimentales (Jones 1985; DeLany 2000).

ALA et LA peuvent être partiellement oxydés pour fournir des unités acétates à la base de la synthèse d'AGS et d'AGMI (Dhopeswarkar and Subramanian 1976). Les proportions d'ALA et de LA partiellement oxydés sont comparables chez l'animal (Sheaff Greiner et al. 1996). En effet, leur fraction orientée vers l'oxydation partielle est plus élevée que celle intervenant dans leur conversion en dérivés à longues chaînes (Sheaff Greiner 1996).

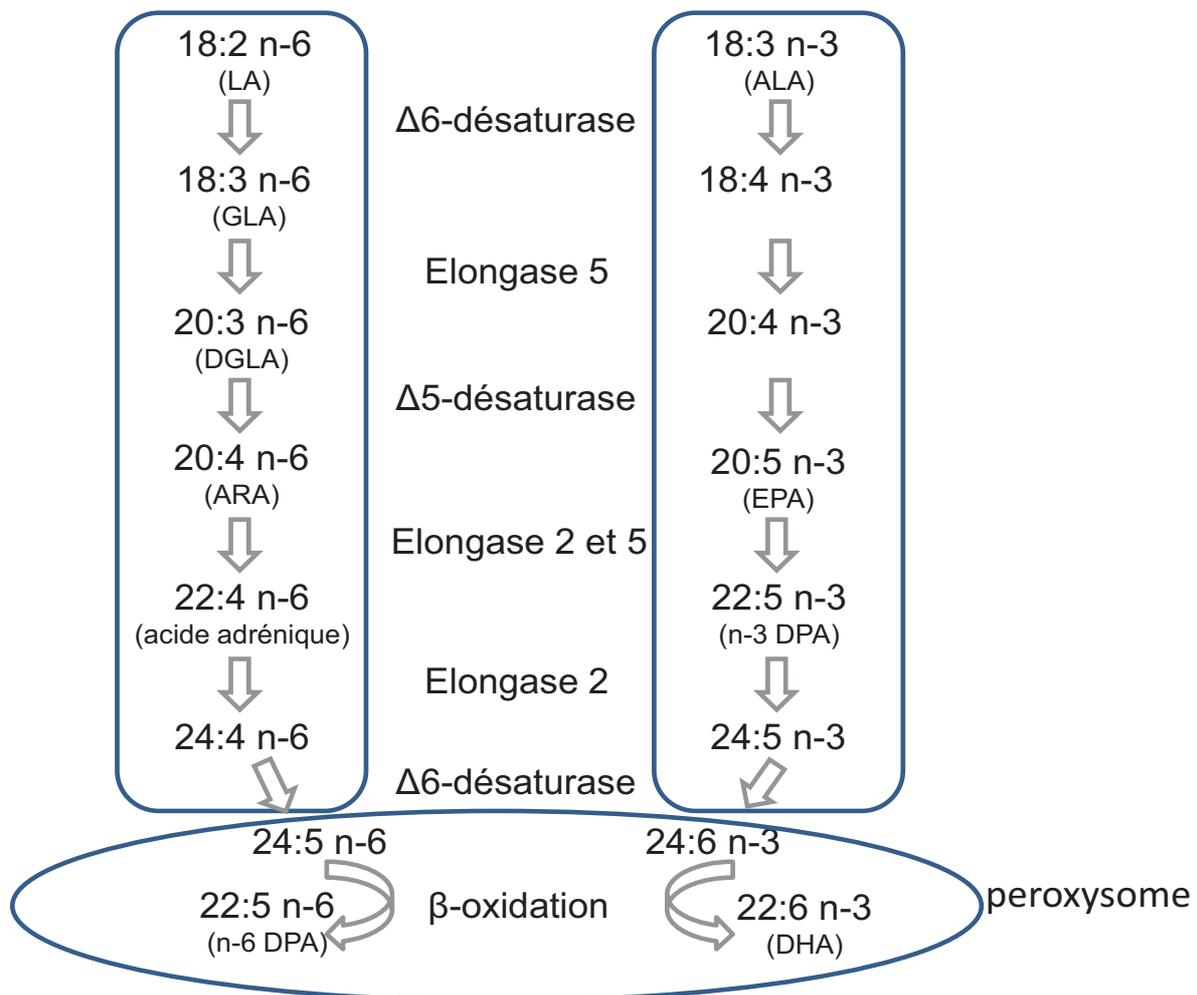
Plus de 75% de l'ALA ingéré est oxydé totalement ou partiellement. La proportion d'ALA ingéré disponible pour le stockage sous forme de TG ou de PL dans les tissus ou pour la conversion en AGPI à longues chaînes est donc très faible (Brenna 2002). Une étude chez le Rat en croissance a montré que 60% de l'ALA ingéré est dirigé vers l'oxydation, 20% est stocké dans le tissu adipeux, et 17% est transformé en dérivés à longues chaînes (Poumes-Ballihaut et al. 2001). La fraction de LA ingéré qui sera orientée vers l'oxydation est plus faible que celle de l'ALA, alors que celle impliquée dans la conversion en acides gras à longues chaînes l'est d'avantage.

2.3.2. Voies de conversion de l'ALA et du LA

Les voies de synthèse des AGPI n-3 et n-6 (Figure 10) commencent toutes par l'introduction d'une double liaison en position $\Delta 6$ sur l'ALA et le LA par une $\Delta 6$ -désaturase, pour former respectivement l'acide stéaridonique (SA, C18 :4 n-3) et l'acide γ -linoléinique (GLA, 18 :3 n-6). Cette étape est limitante dans la voie de conversion, et elle est suivie d'une élongation de la chaîne acyle par une élongase 5 : le SA est transformé en acide eicosatétraénoïque (ETA, C20 :4 n-3) et le GLA en acide dihomogLA (DGLA, C20 :3 n-6). Ensuite une désaturation intervient en position $\Delta 5$ grâce à une $\Delta 5$ -désaturase pour former l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 :5 n-3) et l'acide arachidonique (ARA, C20 :4 n-6) respectivement. L'acide docosapentaénoïque (DPA n-3, C22 :5 n-3) et le C22 :4 n-6 sont synthétisés respectivement à partir de l'EPA et de l'ARA par les élongases 2 ou 5 qui rajoutent 2 Carbones. Sous l'action de l'élongase 2, le DPA n-3 et C22 :4 n-6 sont donc allongés de 2 carbones pour former les C24 :5 n-3 et C24 :4 n-6, puis une désaturation par la

$\Delta 6$ -désaturase conduit aux C24 :6n-3 et C24 :5 n-6. Cette $\Delta 6$ -désaturase utilisée pour la conversion des C24 :5n-3 et C24 :4n-6 est la même $\Delta 6$ -désaturase que celle impliquée dans la conversion de l'ALA et du LA (D'Andrea et al. 2002). Les réactions de désaturation et d'élongation ci-dessus ont lieu au niveau du réticulum endoplasmique, sauf la dernière étape de β -oxydation qui a lieu dans les peroxyosomes, où se produit la β -oxydation des AGPI à longue chaîne (Diczfalusy 1994; Moore et al. 1995; Sprecher 2000; Sprecher 2002). Le C24 :6n-3 est ensuite transporté du réticulum endoplasmique vers les peroxyosomes où la chaîne acétyle est diminuée de deux carbones par un cycle de β -oxydation pour former le DHA qui représente le « produit fini » (*end product*) le plus important dans la voie de conversion des AGPI de la série n-3. L'acide docosahexaénoïque (DHA, C22 :6n-3) est ensuite transporté en retour dans le réticulum endoplasmique. Cette restriction peut expliquer que la fraction d'ALA transformée en DHA est faible. Le C22 :4 n-6 est formé à partir du DPAn-6 par le même mécanisme de β -oxydation qui coupe deux Carbones (C22 :5 n-6).

Figure 10 : Voies de bioconversion des AGPI de la série n-6 et n-3 chez l'Homme



Les deux voies (AGPI n-3 et n-6) de bioconversion métabolique sont indépendantes. Il n'y a pas de réactions croisées entre elles. Cependant, les réactions de catalyse dans les 2 voies utilisent les mêmes enzymes d'élongation et de désaturation, ce qui crée une compétition entre les conversions des 2 familles d'AGPI n-3 et n-6. Dans les voies métaboliques, la première réaction de désaturation par la $\Delta 6$ -désaturase est limitante. La compétition entre ces deux familles d'AGPI s'exerce principalement au niveau de cette étape de conversion limitée par la $\Delta 6$ -désaturase. En effet, la $\Delta 6$ -désaturase a plus d'affinité pour l'ALA que pour le LA (Sprecher 2002). Dans l'alimentation occidentale, les AGPI peuvent représenter jusqu'à 20% des graisses alimentaires. Le régime occidental typique est riche en n-6 et relativement faible en n-3. Ainsi, une concentration très élevée en LA par apport à l'ALA peut réduire la synthèse de dérivés AGPI à longue chaîne de la série n-3 (Horrobin 1993).

Du fait de l'importance physiologique des AGPI n-3, de nombreuses études ont utilisé des traceurs isotopiques pour mesurer l'efficacité de cette conversion. La capacité de conversion des AGPI est limitée et variée sous les différentes conditions analysées. En général, l'apport en ALA alimentaire conduit à une augmentation de l'ALA, de l'EPA et du n-3 DPA, sans beaucoup de changement du DHA dans le sang ou le lait maternel. Des auteurs ont montré que la conversion de l'ALA en l'EPA était comprise entre 0,2% et 6% et de l'ALA en DPA n-3 variait entre 0,13% et 6% (Pawlosky et al. 2001; Burdge 2004; Burdge and Calder 2005; Lin and Salem 2007). Cependant toutes les études s'accordent pour reconnaître que la conversion de l'ALA en DHA est très faible, entre 0.02% et 4% (Emken 1994; Salem et al. 1999; Vermunt 2000; Pawlosky 2001; Burdge and Wootton 2002). Cette conversion de l'ALA en DHA est plus beaucoup plus faible que celle de l'ALA en EPA ou DPA.

Plusieurs raisons peuvent expliquer la conversion faible de l'ALA en DHA. En particulier, l'ALA est le plus oxydé des AGPI (Nettleton 1991), et donc de ce fait moins disponible pour la bioconversion en dérivés supérieurs. Il se peut que la limitation survienne après la formation de DPA n-3 et peut refléter les activités métaboliques de conversion du DPA n-3 en DHA par les intermédiaires C24 (James et al. 2003). Ces derniers auteurs ont mesuré les effets des augmentations respectives de l'apport en ALA, en C18:4 n-3, et en EPA sur la concentration en EPA, en DPA n-3 et en DHA du PL plasmatique. Ils n'ont observé que des augmentations en EPA et en DPA n-3 dans les phospholipides plasmatiques, mais sans changement en DHA.

Dans les voies d'élongation et de désaturation des AGPI n-3 et n-6 (figure 10), les enzymes clés sont la $\Delta 5$ -désaturase et la $\Delta 6$ -désaturase (Cho et al. 1999; Cho et al. 1999). Ces enzymes limitent la vitesse de synthèse des AGPI à longues chaînes, pour synthétiser l'ARA, l'EPA et le DHA à partir de leur précurseurs alimentaires LA et ALA. Les deux désaturases, codées respectivement par les gènes « Fatty Acid Desaturase 1 » (FADS1) et la « Fatty Acid Desaturase 2 » (FADS2), et situées au niveau du réticulum endoplasmique sont nécessaires pour former les AGPI de la série n-3 et n-6.

2.3.3. Effet de l'apport en acides gras alimentaires sur la conversion des AGPI

La conversion des AGPI est influencée par des facteurs génétiques, le sexe et la quantité des acides gras alimentaires disponibles (Hoffman et al. 2000), ainsi que la qualité de l'apport nutritionnel.

La conversion de l'ALA et du LA en AGPI à plus longue chaîne est influencée significativement par la composition en acides gras alimentaires (Katan et al. 1997; Sun et al. 2007). Dans ce contexte, la bioconversion de la famille n-3 dépend à la fois de la quantité de l'apport en AGPI n-3 alimentaire et du rapport n-6/n-3 dans l'alimentation. Cependant l'importance relative de chacun de ces deux facteurs dans la bioconversion reste encore un sujet de débat.

De nombreuses études ont présenté les effets d'une augmentation en ALA alimentaire sur la composition en acides gras du plasma et des cellules chez l'adulte (Revue détaillée par (Burdge and Calder 2005). Ils n'ont observé qu'une augmentation en EPA et en DPA n-3 du plasma, mais aucun changement en DHA. Cependant une étude montre une réduction du DHA plasmatique par des apports accrus en ALA (Finnegan et al. 2003). Ces auteurs suggèrent qu'une augmentation en ALA alimentaire n'est pas suffisante pour satisfaire les besoins physiologiques en DHA. Il a été montré ainsi qu'une réduction de LA parallèlement à une augmentation de l'ALA dans l'alimentation serait la façon la plus appropriée pour augmenter la synthèse de l'EPA et du DHA (Sinclair et al. 2002; Goyens et al. 2006).

Tout comme la quantité en valeur absolue d'ALA alimentaire, le rapport n-6/n-3 alimentaire peut aussi moduler la conversion de l'ALA et LA en leurs dérivés à plus longues chaînes (Liou et al. 2007; Sun 2007; Harnack et al. 2009). Cependant, les données quantitatives sur la conversion des AGPI-LC modulée par le rapport n-6/n-3 restent insuffisantes. Des études chez l'Homme sain recevant des régimes apportant la même quantité d'ALA avec des quantités croissantes de LA de façon à faire varier les rapports n-6/n-3 de 10 :1 à 4 :1 montrent qu'un rapport n-6/n-3 plus faible conduit à une augmentation en EPA dans les PL du plasma (Liou 2007). Une autre étude *in vitro* sur les cellules HepG2 montre que la conversion dépend plus du rapport n-6/n-3 que de la quantité de l'apport en ALA (Harnack 2009). D'autres études chez l'Homme sont encore nécessaires pour confirmer cette observation.

2.3.4. Effets du sexe sur la conversion des AGPI

Les études humaines ont montré des différences dans le métabolisme des AGPI n-3 entre femmes et hommes, se traduisant par exemple par des concentrations plasmatiques en DHA plus élevées chez les femmes (Childs et al. 2008). Des études utilisant des traceurs isotopiques montrent que les hommes (Burdge 2002) et les femmes (Burdge and Wootton 2002) ayant reçu la même dose d'ALA marqué (par des isotopes stables), présentaient des taux sanguins en DHA marqué plus faibles chez les hommes que chez les femmes. Chez les femmes, l'ALA marqué peut être transformé en 3 dérivés, EPA, DPAn-3 et DHA alors que chez l'homme, il n'est converti qu'en EPA et DPA n-3 (Burdge and Calder 2005). Les femmes auraient donc une meilleure capacité de synthèse du DHA à partir du précurseur ALA (Burdge and Wootton 2003; Cunnane et al. 2003). Cette capacité, est certainement liée à sa fonction dans la reproduction, notamment pour subvenir aux besoins en DHA du fœtus et du nourrisson pendant les périodes de gestation et de lactation.

Burdge et Wootton (2002) ont montré que les conversions de l'ALA en EPA et en DHA chez les femmes à l'âge de 28 ans étaient nettement supérieures (2,5 fois et >200 fois respectivement) que chez les hommes du même âge dans une autre étude comparable (Burdge 2002). Cette observation était confirmée par une autre étude mesurant la conversion du DPA n-3 en DHA. Celle-ci était 4 fois supérieure chez les femmes que chez les hommes (Pawlosky et al. 2003). Leur observation peut suggérer une différence sexe-

dépendante au niveau de l'activité des voies de désaturation et d'élongation. Cette hypothèse a été-étayée par James qui a montré que la translocation du C24:6 n-3 entre le réticulum endoplasmique et les peroxysomes est plus limitée chez les hommes que chez les femmes (James 2003).

La conversion sexe-dépendante de l'ALA en EPA et en DHA peut être aussi expliquée par des effets de régulation au niveau de la partition vers la β -oxydation plus faible chez les femmes que chez les hommes en raison de la présence d'œstrogènes (Burdge and Calder 2005; Pawlosky et al. 2007).

La proportion d'oxydation de l'ALA chez les femmes (22%) (Burdge and Wootton 2002) était plus faible que chez les hommes (33%) (Burdge 2002) mesurée dans les mêmes conditions. Ceci pourrait s'expliquer par les différences de masse de tissus maigres. La β -oxydation des acides gras est plus active dans les muscles squelettiques et cardiaques, le foie, et les reins. Les femmes ont constitutionnellement plus de tissus adipeux faiblement β -oxydants et moins de muscles squelettiques fortement β -oxydants. Ceci est aussi en accord avec la capacité des femmes à métaboliser plus volontiers les sucres que les lipides comme substrats énergétique comparativement aux hommes (Jones et al. 1998; Jones et al. 1999).

La présence d'œstrogènes pourrait être une autre hypothèse permettant d'expliquer la meilleure conversion de l'ALA chez les femmes. Des études cliniques ont montré que le DHA est 3 fois plus élevé chez les femmes traitées par médicaments contraceptifs contenant du 17 α - ethylnyloestradiol (Burdge and Wootton 2002). L'hypothèse selon laquelle les œstrogènes peuvent augmenter l'activité des voies de désaturation/élongation est aussi en accord avec des études montrant que le traitement avec des hormones sexuelles stéroïdes conduisaient à accroître les concentrations plasmatiques en DHA et ARA (Ottosson et al. 1984; Burdge and Wootton 2002; Giltay et al. 2004; Extier et al. 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les hormones sexuelles pourraient augmenter la conversion des AGPI ne sont pas élucidés.

Chez le Rat, la synthèse du DHA se produit principalement dans le foie (Igarashi et al. 2007; Rapoport et al. 2007), mais aussi d'autres organes, comme le cerveau, (Moore 1993; Moore 2001). Bien que la concentration plasmatique en DHA soit plus élevée, la concentration cérébrale en DHA est presque identique chez les mâles et les femelles. Les différences plasmatiques en DHA ne sont pas suffisantes pour modifier l'accumulation du DHA dans le cerveau (Extier 2010). Ainsi les productions supplémentaires du DHA par la synthèse du foie chez la femelle ne sont pas incorporées dans le cerveau, mais probablement

stockées et mobilisées pour la gestation future. On considère généralement que la synthèse de DHA dans le cerveau n'est pas effective. Ceci peut expliquer par les études chez le rat, qui ont montré que le cerveau accumule préférentiellement le DHA préformé plutôt que de le synthétiser à partir des précurseurs (Anderson et al. 1990; Sheaff Greiner 1996).

3. Rôles biologiques des acides gras

3.1. Acides gras et régulation de gènes

Les acides gras, notamment les AGPI, jouent un rôle biologique important dans la régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Les AGPI peuvent activer l'expression des gènes du transport et d'oxydation des acides gras et inhiber l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de lipides *de novo* (Jump 2002; Sampath and Ntambi 2005; Jump 2008).

De nombreuses études ont montré que les acides gras alimentaires influent sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines du foie par des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription sont les récepteurs nucléaires qui peuvent reconnaître et fixer des sites spécifiques de l'ADN et ensuite déclencher la transcription de gènes cibles en réponse à des ligands spécifiques (Jump 2002). Il y a 3 familles de facteurs de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation de gènes hépatiques par les acides gras, tels que les PPARs (peroxisome proliferation activated receptors), les SREBPs (sterol regulatory element binding proteins), et les LXRs (liver X receptors).

✓ PPARs

Les PPARs sont les récepteurs nucléaires les mieux caractérisés. Ils sont régulés par des acides gras (Desvergne and Wahli 1999). Il existe 3 isoformes dans la famille des PPARs: PPAR α , β et γ . Ils jouent un rôle central dans l'oxydation et le stockage d'acides gras. Les PPAR α sont fortement exprimés dans le foie et les muscles et leur activation est liée à une régulation à la hausse de la transcription de gènes clés de l'oxydation des acides gras et du métabolisme des lipoprotéines, tels que l'acyl-CoA oxydase (ACO), la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1), la lipoprotéine lipase (LPL), l'apoAI et les apoCIII (Sampath

and Ntambi 2005; Brown and Plutzky 2007; Jump 2008). Les PPAR γ sont fortement exprimés dans le tissu adipeux et leur activation est liée à une augmentation en FABP (Fatty acid binding protein) et de la LPL (Lipoprotein lipase) (Berger et al. 1996).

Tous les acides gras (saturés ou insaturés) sont capables d'activer toutes les isoformes des PPARs, les AGPI étant plus efficaces que les AGMI et plus encore que les AGS (Keller et al. 1993; Kliewer et al. 1997). De plus les eicosanoïdes, dérivés des AGPI n-3 et n-6, sont également de puissants activateurs des PPARs, montrant plus d'affinités que leurs précurseurs (Krey et al. 1997).

✓ SREBPs

Les SREBPs jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expressions de gènes intervenant dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Eberle et al. 2004). Il existe 3 isoformes : SREBP-1a et 1c dérivés d'un gène SREBP, SREBP-2 dérivé d'un autre gène SREBP. L'activation de SREBP-1a est liée à une régulation à la hausse des gènes impliqués à la fois dans la synthèse du cholestérol et des acides gras (Shimano et al. 1996); l'activation de SREBP-1c est liée à une régulation à la hausse des gènes associés à la synthèse d'acides gras (Shimano et al. 1997) ; l'activation de SREBP-2 est liée à une régulation à la hausse de la transcription des gènes associés à la synthèse du cholestérol (Horton et al. 1998). Donc, SREBP-1c est le seul impliqué dans la régulation de la lipogenèse par les AGPI. Les AGPI peuvent inhiber les SREBP1, mais sans affecter le SREBP2 (Horton 1998). Dans le foie, les AGPI n-6 et n-3 diminuent le taux d'ARN de SREBP-1c en accélérant sa dégradation (Xu 2001), et en diminuant sa transcription via un autre facteur de transcription LXR (Yoshikawa et al. 2002), et aussi potentiellement *via les* PPAR (Yoshikawa et al. 2003).

✓ LXRs

Les LXRs régulent la transcription des gènes du métabolisme du cholestérol, d'acides gras et des acides billiaires (Peet et al. 1998; Schoonjans et al. 2000; Geyeregger et al. 2006). Leur ligands préférentiels sont les oxystérols et les AGPI (Janowski et al. 1999). Il existe 2 isoformes: LXR α et LXR β . Les LXRs sont associés sous forme d'hétérodimères avec le RXR (retinoid X receptor) avant de se lier à l'élément de réponse sur le promoteur du gène cible. Les AGPI inhibent directement la liaison de l'hétérodimère LXR/RXR (Yoshikawa

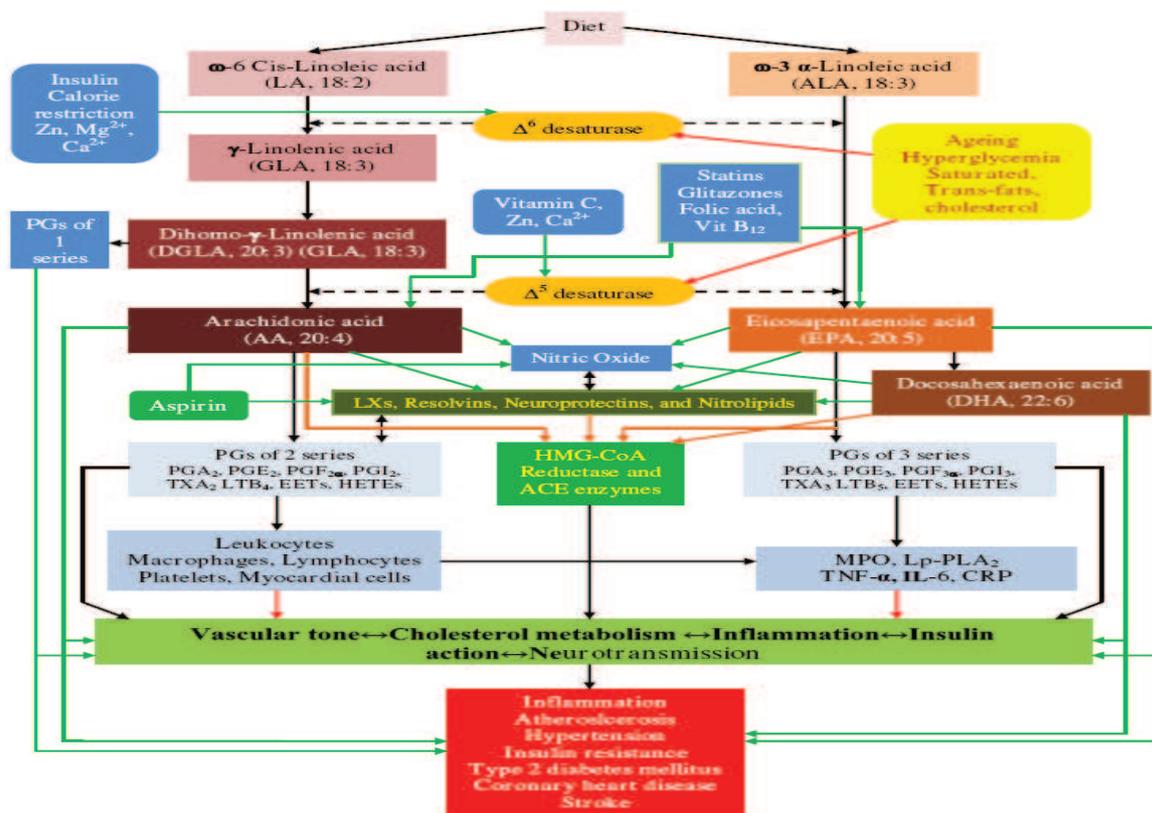
2002). Ils jouent également un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme de la lipogénèse (Peet 1998). Des études ont montré que la régulation de la lipogénèse par LXRs se fait principalement *via* l'expression de SREBP-1c. L'inhibition de SREBP-1c est plus intense avec l'EPA ou l'ARA qu'avec le LA et plus encore qu'avec l'acide oléique (Yoshikawa 2002).

Les AGPI induisent l'oxydation des acides gras *via* le PPAR α , et inhibent l'expression de SREBP-1 et LXR-SREBP-1c ce qui diminue la synthèse d'acides gras *de novo* et du cholestérol.

3.2. Acides gras et messagers cellulaires

Les AGPI à longues chaînes en C20- et C22- présents dans les glycophospholipides de membranes, possèdent en plus de leurs rôles structuraux dans les membranes cellulaires, un rôle de messager en générant les précurseurs des eicosanoïdes et des docosanoïdes (Figure 11).

Figure 11 : Schéma simplifié du métabolisme des AGPI et formation des eicosanoïdes (Das 2008)



Les eicosanoïdes sont synthétisés à partir des AGPI à chaîne C20- par l'oxygénation. Ce sont des molécules de signalisation impliquées dans de nombreux systèmes, notamment l'inflammation et l'immunité, et agissant aussi en qualité de messagers dans le système nerveux central (SNC). On distingue 4 familles d'eicosanoïdes: les prostaglandines (PGs), les leucotriènes (LTs), les thromboxanes (TXs) et les prostacyclines (PGIs). Chaque famille d'eicosanoïdes comprend 2 ou 3 séries. Les AGPI à chaîne C22- (notamment le DHA) sont des précurseurs des docosanoïdes. Les eicosanoïdes et les docosanoïdes sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, tels que la modulation de l'inflammation, l'agrégation plaquettaire, la réponse immunitaire, la croissance et la prolifération cellulaire, etc (Lee and Hwang 2008). Les effets des AGPI n-3 et n-6 sur la santé peuvent principalement être expliqués par ces diverses activités des eicosanoïdes et des docosanoïdes (Funk 2001).

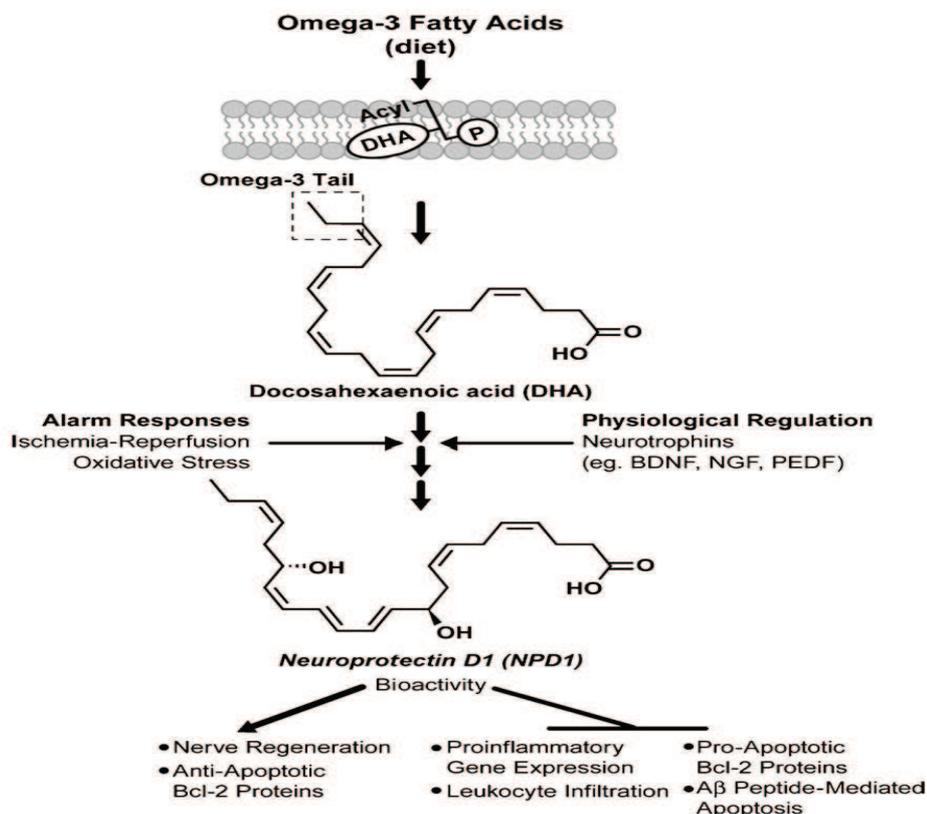
Le DGLA est le précurseur des PGs de la série 1 comme PGE₁. L'ARA conduit aux PGs de la série 2 par l'enzyme COX (cyclooxygénase) et conduit à TXA₂ et LTB₄ par l'enzyme 5-LOX (5-lipoxygénase). L'EPA peut être à l'origine des PGs de la série 3 par COX, et des TXA₃ et LTB₅ par 5-LOX.

Les eicosanoïdes (PGs, TXs, et LTs) dérivés de l'ARA présentent une forte activité biologique et jouent un rôle pro-inflammatoire, alors que les eicosanoïdes dérivés de l'EPA présentent une activité biologique plus faible mais ont un rôle anti-inflammatoire. La biosynthèse des eicosanoïdes peut être modulée par les acides gras alimentaires. L'EPA joue un rôle d'inhibiteur compétitif vis-à-vis des eicosanoïdes dérivés de l'ARA car les deux AGPI sont formés par la même enzyme pour former des eicosanoïdes. Cependant l'EPA est un moins bon substrat pour COX par rapport à l'ARA. L'augmentation de l'apport en l'EPA et en DHA peut favoriser l'accumulation de ces AGPI dans les phospholipides cellulaires et diminuer les eicosanoïdes pro-inflammatoires dérivés de l'ARA (Calder 2002). Du fait de la compétition vis-à-vis des désaturases et élongases entre ALA et LA pour leurs conversions en AGPI à chaîne plus longue, leurs apports dans l'alimentation ont aussi une influence sur la synthèse des eicosanoïdes. Les AGPI n-3 sont impliqués dans la synthèse des eicosanoïdes non au niveau des substrats mais aussi au niveau de l'expression des gènes (Curtis et al. 2000).

Plus récemment, les Résolvines de la série E ont été identifiées (Serhan et al. 2000). Elles dérivent de l'EPA via l'activité de COX2. Elles présentent des activités anti-inflammatoires très puissantes (Serhan and Savill 2005).

Les docosanoïdes comprennent les résolvines et les docosatriènes. Les docosatriènes contiennent des structures de triène conjugué générés spécifiquement à partir du DHA (Serhan 2005). Les protectines comprennent les docosatriènes et les résolvines de la série D, qui sont de puissants anti-inflammatoires et neuroprotecteurs (Bazan 2006). La Neuroprotectine D1 (NPD1) est synthétisée à partir du DHA (Figure 12). Cette synthèse est induite en réponse à des signaux « d'alarme » tel qu'un stress oxydatif et/ou l'activation de la neurotrophine, déclenchant la signal de maintien de l'homéostasie et de l'intégrité cellulaire (Bazan 2007). Sa synthèse a été démontrée, entre autres, dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien où elle s'oppose et régule à la baisse des gènes pro-inflammatoires (Mukherjee et al. 2004). Elle interfère avec l'activation de la cascade inflammatoire, empêche la signalisation pro-apoptotique et prépare la réparation tissulaire. Le NPD1 présente donc de puissantes activités anti-inflammatoires et neuroprotectrices.

Figure 12 : Schéma du transport du DHA dans le tissu et de la formation de NPD1(Niemoller and Bazan 2010).



3.3. Acides gras et le développement infantile : cas des AGPI

3.3.1. AGPI et le développement du cerveau et du système visuel

✓ Rôle d'AGPI sur le développement du cerveau

Les 5 premières années de la vie correspondent à une période exceptionnellement importante pour le développement du cerveau et de la fonction cérébrale. Le poids du cerveau humain est d'environ 400g à la naissance, mais il augmente jusqu'à 1100g à l'âge de 2 ans. Dans la deuxième année de la vie, la croissance du cerveau et la réorganisation structurelle neurologique se poursuivent encore de façon notable (Innis et al. 2004), puis cette phase de développement se poursuit tout en s'atténuant pour se stabiliser à la fin de l'enfance (Chugani 1998).

Le cerveau et la rétine sont les organes les plus riches en DHA (Alessandri et al. 2004). Le DHA représente environ 25% des acides gras totaux dans certaines classes de phospholipides dans le cortex cérébral humain. Le DHA s'accumule dans les phospholipides du cerveau humain principalement au cours de la période foetale correspondant à une phase de neurogenèse active (commence à partir sixième mois de grossesse) et se poursuit après la naissance pendant la phase de synaptogénèse intense. La substance grise est la zone du cerveau où le DHA s'accumule en grande quantité jusqu'à l'âge 5 ans (Innis 2004). C'est donc durant cette période que la qualité et la quantité optimale des apports en AGPI oméga-3 est très importante pour le développement des fonctions cérébrales, notamment au niveau de la maturation neuronale, de la myélinisation, de la croissance neuritique et de la synaptogénèse (Guesnet et al. 2005). De nombreuses études ont examiné l'effet d'apports élevés ou au contraire de carence en DHA sur le développement du cerveau chez les enfants ou dans des modèles animaux. L'importance fonctionnelle des apports nutritionnels en DHA pour le développement du système nerveux central de l'enfant a été notamment évaluée au niveau des capacités visuelles, mentales et des fonctions motrices chez des enfants prématurés. Dans ces protocoles nutritionnels, les formules infantiles supplémentées en DHA (souvent accompagné d'ARA) montraient un bénéfice net sur ces fonctions comparativement aux formules non supplémentées (Heird and Lapillonne 2005; Fewtrell 2006). Des résultats comparables étaient observés chez des enfants allaités, chez qui la concentration

érythrocytaire en DHA à l'âge de 2 mois était prédictive des performances visuelles et cognitives à long terme (14 et 18 mois) (Innis et al. 2001).

✓ *Rôle des AGPI sur le développement du système visuel*

Le système visuel de nourrisson n'est pas totalement mature à la naissance, mais au cours de première année il se développe très rapidement (SanGiovanni et al. 2000; Uauy et al. 2003). La maturation de système visuel se continue progressivement vers 5 ans, atteignant à cet âge la capacité visuelle de l'adulte. De ce fait, les apports nutritionnels en AGPI sont critiques pendant cette période et notamment pendant la première année. Le DHA est l'acide gras qui s'accumule le plus dans les structures rétiniennes, comprenant environ 50% des acides gras totaux des segments externes des cellules côniques et des cellules à bâton (Lauritzen et al. 2001; Stillwell and Wassall 2003). Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la concentration de DHA du lait maternel ou de l'enfant et l'acuité visuelle (Gibson et al. 1997; Lauritzen et al. 2004; Innis and Friesen 2008). Cependant, les études conduites avec des formules infantiles supplémentées en DHA sont plus nuancées. Certaines études ont trouvé des effets bénéfiques, alors que d'autres présentaient des effets non significatifs (revues de Simmer 2004 et 2008) (Simmer and Patole 2004; Simmer et al. 2008). Les différences de résultats peuvent être liées aux différentes périodes d'observation et aux différentes quantités de supplémentation en DHA ajoutées dans les laits infantiles.

✓ *Effets des AGPI sur le développement du cerveau et du système visuel au niveau moléculaire*

Les proportions en DHA et ARA représentent environ 8% du poids sec du cerveau. Les effets fonctionnels du DHA dans le système nerveux central peuvent se classer en 3 catégories (revue par Guesnet 2005): 1/ Un effet structural en modulant l'activité de nombreuses enzymes, transporteurs, récepteurs et canaux membranaires impliqués dans la signalisation inter- ou intracellulaire (exemple de la voie de transduction photonique dans les cellules photoréceptrices de la rétine (Niu et al. 2004); en intervenant au niveau des radeaux membranaire ou « rafts» (en définissant des zones plus fluides dans la membrane et en excluant le cholestérol) (Stillwell and Wassall 2003; Ma et al. 2004); et en modulant la synthèse de phospholipides de membranes par certains éléments des voies de la signalisation

comme le protéine kinase C (Kim et al. 2004); 2/ Un effet indirect au niveau synaptique *via* l'activité d'eicosanoïdes comme la prostaglandine E2 (PGE2) (Bazan 2003), des éicosanoïdes et des docosanoïdes dérivés des AGPI n-3 présentant des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires opposés aux effets des produits d'eicosanoïdes dérivés de l'ARA (Simopoulos 2002); 3/ Un effet de régulation de l'expression de gène impliqué dans le métabolisme cérébral d'acides gras ou dans la neurotransmission (Alessandri 2004). De ce fait, le DHA est absolument nécessaire pour la fonction neuronale. (Guesnet 2005)

3.3.2. Autres effets des AGPI

Forsyth et al. (2003) ont montré que le lait infantile supplémenté à la fois avec du DHA et de l'ARA est associé à une pression artérielle plus basse à l'âge de 6 ans. La même association a été observée par Niinikoski et al. (2007) entre l'alimentation dans l'enfance et le profil lipidique sanguin à l'âge 14 ans. Puisque la pression artérielle chez le jeune est prédictive de celle de l'adulte, des apports en acides gras polyinsaturés peuvent avoir un effet durable sur la tension artérielle et le risque cardiovasculaire (Engler et al. 2004; Hayman et al. 2007). Le risque de développer des maladies cardiovasculaires chez l'adulte peut être lié aux déséquilibres alimentaires subis pendant l'enfance. A cet égard, les apports adéquats en DHA et EPA au cours de l'enfance semblent jouer un rôle important pour la prévention des maladies cardiovasculaires.

Des apports nutritionnels en AGI peuvent ainsi également moduler la réponse immunitaire (Denburg et al. 2005; Damsgaard et al. 2007; Field et al. 2008), à la fois au niveau de la différenciation de certains types de cellules que de leurs fonctions. Das (2006) a suggéré qu'une supplémentation en AGPI-LC pendant la période périnatale protège contre le développement de l'eczéma, de l'atopie, de l'asthme bronchique, et d'autres conditions inflammatoires. Les AGPI-LC peuvent déplacer l'équilibre de la synthèse de cytokines vers la production de cytokines anti-inflammatoires en modulant les cellules Th1 et Th2. En outre, les AGPI-LC n-3 sont les précurseurs de médiateurs anti-inflammatoires, tels que les résolvines, PGE1, PGI2, lesquels inhibent le processus inflammatoire et améliorent les processus de réparation tissulaire après lésion. Ces actions bénéfiques peuvent expliquer l'effet protecteur de l'allaitement maternel sur les allergies pendant l'enfance et sur certaines conditions inflammatoires chez l'adulte.

4. Sources et recommandations en AGPI

4.1. Sources alimentaires et recommandation en AGPI pour l'adult

Les AGPI dans l'alimentation et leurs sources alimentaires sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : sources alimentaires en AGPI

Nomenclature physiologique	Nom usuel	Source alimentaire typique
C18:2 n-6	Acide linoléique (LA)	la plupart des huiles végétales, le jaune d'œufs
C18:3 n-3	Acide α -linoléique (ALA)	l'huile de lin, de périlla, de colza, de noix et de soja
C18:3 n-6	Acide γ -linoléique (GLA)	l'huile d'onagre, de bourache, et de pépin de cassis
C18:4 n-3	Acide stéaridonique (SA)	poisson, l'huile de soja modifié génétiquement, de graine de cassis, de chanvre
C20:4 n-6	Acide arachidonique (ARA)	graisses animales, foie, œufs et poisson
C20:5 n-3	Acide éicosapentaénoïque (EPA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)
C22:5 n-6	Acide docosapentaénoïque (n-6 DPA)	très peu présent dans les tissus animaux
C22:5 n-3	Acide docosapentaénoïque (n-3 DPA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)
C22:6 n-3	Acide docosahexaénoïque (DHA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)

Les Apports Nutritionnels Conseillés (ANC, édition 2001) préconisent une valeur de 5 pour ce rapport n-6/n-3, soit un apport en acide gras LA s'élevant à 4% de l'apport énergétique total (AET) et un apport en acide gras ALA égal à 0,8% de l'AET. Alors que depuis 50 ans, la fréquence des maladies métaboliques augmente dans le monde occidental en même temps que la consommation d'acides gras de la série n-6, celle des acides gras de la série n-3 n'a pas été modifiée, ce qui induit une augmentation progressive du rapport n-6/n-3 dans l'alimentation. Or pour la population française, l'apport en acide gras ALA représente seulement 0,3 % à 0,4 % de l'AET. Elle est insuffisante et devrait être au minimum doublée. Les précurseurs des AGPI n-6 se trouvent principalement dans les huiles végétales mais leurs proportions sont très variables (12,9% dans l'huile d'olive et 67,3% dans l'huile de tournesol). Donc un choix dans ces huiles peut permettre de réduire la consommation de LA dans l'alimentation et d'augmenter le ratio n-6/n-3. L'apport en LA provient à seulement 40% de la consommation de matières grasses visibles (et notamment les huiles végétales). Les précurseurs des n-6 et n-3 sont aussi présents, mais dans des quantités plus faibles, dans les

beurres, les produits laitiers et fromages, les légumes, les fruits secs, les œufs, les viandes et les poissons. Pour la famille des n-6, les sources principales sont les viandes, la volaille et les œufs, et alors la famille des n-3 sont plutôt dans les poissons et les fruits de mer (Astorg et al. 2004). Bien que les quantités d'AGPI dans les matières grasses non-visibles soient faibles, ces dernières sont aussi une source importante d'apports.

4.2. Recommandations en AGPI

✓ Recommandations en AGPI pour l'enfant de l'âge 0-12 mois

L'allaitement maternel est préconisé au cours de premiers 6 mois s'agissant des nourrissons nés à terme et en bonne santé [WHO, 2006]. Pour les nourrissons qui ne sont pas allaités, le lait maternel est utilisé comme modèle pour définir des recommandations de l'apport en matières grasses et acides gras au cours des premières années de la vie. Les lipides représentent environ 50% d'énergie dans le lait maternel mature. Le lait maternel est source d'AGS (acide palmitique) et d'AGMI (acide oléique), ainsi que de cholestérol (100-150mg/jour) (Jensen 1996).

Parmi les précurseurs des AGPI, le LA représente actuellement, dans les pays occidentaux, en moyenne 12-13% des acides gras totaux (AGT) des lipides du lait de femme. Cependant la teneur en LA du lait humain s'est notamment accrue au cours de ces dix dernières années. Les valeurs individuelles de la teneur en cet acide gras sont très influencées par les habitudes alimentaires, variant de 7% à 22% d'AGT. En pratique, la Société européenne de pédiatrie, gastroentérologie, hépatologie et nutrition (ESPGHAN) recommande que la teneur minimale en LA soit de 9% et ne dépasse pas 22% des AGT dans les lipides des laits de remplacement. L'ALA représente dans les pays occidentaux, entre 1% et 1,5% d'AGT des lipides du lait de femme, dont 0,6% seulement en France (Guesnet et al. 1993). L'ESPGHAN recommande une teneur en ALA dans les laits de remplacement pour nouveau-né comprise entre 1% et 3%. Si l'on compare l'apport minimal conseillé en LA (9% d'AGT) et en ALA (1% d'AGT) et l'apport maximal conseillé en LA (22% d'AGT) et en ALA (3% d'AGT), on peut obtenir les rapports LA/ALA sont de 9 et de 7,3. Toutefois, l'ESPGHAN conseille une valeur du rapport LA/ALA comprise entre 5 et 15.

Parmi les AGPI-LC, l'ARA dans le lait maternel est présent en proportion relativement constante, entre 0,3-0,7% d'acides gras totaux (p/p) (Marangoni et al. 2002; Smit

et al. 2002; Yuhas et al. 2006). A l'inverse, le DHA du lait maternel est plus variable entre 0,2-1,0% d'acides gras totaux (p/p) (Yuhas 2006).

✓ **Recommandation en AGPI pour l'enfant de l'âge 2-18 ans**

Pour l'enfant, le pré-adolescent et l'adolescent, d'âge compris entre 2-18 ans, où le statut nutritionnel pendant cette période a une influence à long terme sur la santé adulte, l'apport optimal d'acides gras est également très important. L'apport d'AGPI n-3 pendant cette période continue à présenter des bénéfices potentiels sur la fonction du système nerveux central (Beblo et al. 2007), du système immunitaire (Calder 2006), et dans la prévention de l'asthme (Broughton et al. 1997; Calder 2006) et la survenue des maladies cardiovasculaires (Niinikoski et al. 2007). Ainsi la recommandation concernant les apports en acides gras s'applique généralement aux AGPI n-3 pendant la période de l'enfance et l'adolescence (Meyer et al. 2003). Cependant des données fiables et comparables sur l'apport en AGPI n-3 et sur les marqueurs biochimiques dans des populations différentes d'enfants sont rares. En conséquence, les données disponibles récentes ne peuvent pas permettre d'établir pour le moment une recommandation de l'apport en AGPI n-3 quantitatif et âge-spécifique. Des travaux sont donc nécessaires à cet égard pour mieux comprendre les besoins de telles populations.

4.3. Recommandation pour les laits infantiles

Les compositions des formules infantiles sont en constante évolution, au gré des avancées des connaissances sur le bénéfice santé de certains constituants du lait maternel. A cet égard les laits infantiles sont modifiés pour se rapprocher le plus possible du lait maternel, comprenant l'ajout d'AGPI, de nucléotides et de sélénium. Dans le lait humain, le DHA varie entre 0,1% (Les Etats Unis) à 1% (Japon), alors que la proportion de l'ARA est plus stable dans différentes populations, ne variant que de 0,1-0,2%. Les enfants nés à terme ou prématurés peuvent synthétiser le DHA et l'ARA à partir leurs précurseurs C18 AGPI. Toutefois, il convient de respecter un rapport optimal (5 à 15, Tableau II) entre ces deux types d'acides gras parentaux pour assurer une bioconversion satisfaisante (Klein 2002). Du fait de leurs fonctions importantes dans le développement, un mélange d'huiles végétales (maïs, palme, colza, soja, olive ou tournesol) est largement utilisé dans les laits infantiles pour atteindre les recommandations (Uauy et al. 2000). L'huile de coprah est également utilisé

dans la confection des laits infantiles pour apporter les acides gras à chaîne moyenne (Ailhaud et al. 2006). Le tableau 2 présente des recommandations lipidiques de formules infantiles récentes.

Tableau 2 : Recommandations en lipides pour les formules infantiles (pour des enfants nés à terme) (<http://www.issfal.org.uk>)

		AGPI	AGPI à longue chaîne	Lipides trans	Autres lipides	Autres
Européen 2006	4,4-6,0 g/100kcal	LA: 70-285 mg/100kcal ALA: \geq 50 mg/100kcal LA/ALA ratio: 5-15	n-3 \leq 1% de lipides dont EPA<DHA, DHA<n-6 n-6 \leq 2% de lipides, dont ARA \leq 1%	\leq 3% de lipides totaux	acide érucique \leq 1% de lipides totaux	acide laurique +acide myristique <20% de lipides totaux
ESPGHAN coordinated International Expert Group 2005	4,4-6,0 g/100kcal (environ 40-54% d'énergie totale)	LA: 300-1200 mg/100kcal ALA: 50-240 mg/100kcal LA/ALA ratio: 5-15	DHA \geq 0,5% d'acides gras totaux ARA \geq DHA EPA \leq DHA	\leq 3% de lipides totaux	acide érucique \leq 1% de lipides totaux	acide laurique +acide myristique <20% de lipides totaux
Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) Standard 2.9.1 last update Dec 2007	Aucun déclaré	LA: 9-26% d'acides gras totaux ALA: 1,1-4% d'acides gras totaux LA/ALA ratio: 5-15	AGPI à longue chaîne ajouté optionnellement n-6 (<20C)/n-3(<20C) ratio \geq 1 EPA < DHA	\leq 4% de lipides totaux	acide érucique \leq 1% de lipides totaux	MCT est interdit sauf comme une partie naturelle des graisses alimentaires ou une partie de vitamine liposoluble ou dans les formules spécialisées
USA 2002	3,6-6,0 g/100kcal (environ 30-54% d'énergie totale)	LA \geq 300mg/100kcal, soit 2,7% d'énergie totale	Aucun déclaré	Aucun déclaré	Aucun déclaré	Aucun déclaré
World Association of Perinatal Medicine, Early Nutrition Academy, and Child Health Foundation 2008	AGPI à longue chaîne: 1/ Les données disponibles soulignent fortement les bénéfices de l'ajout de DHA et ARA aux formules infantiles, 2/ Le DHA devrait présenter au moins 0,2% des acides gras et ne pas dépasser 0,5%. 3/ La proportion en ARA ajouté devrait être supérieur ou égal à la proportion en DHA. 4/ La proportion en EPA ajouté ne doit pas dépasser la proportion en DHA. 5/ Il vaut mieux continuer à apporter les AGPI à longue chaîne préformés de l'âge de 6 à 12 mois de la vie, mais une quantité optimale ne peut être spécifiée au cours cette période.					

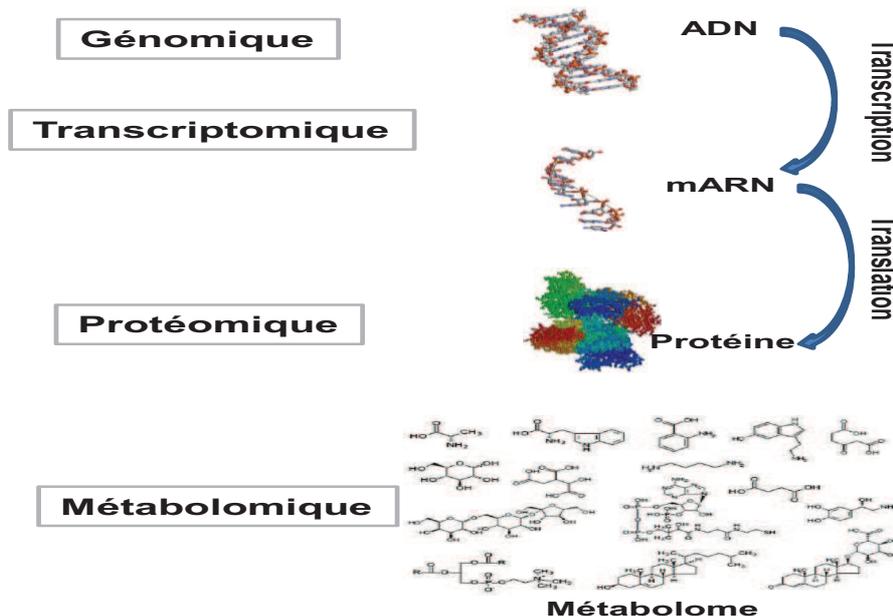
II La lipidomique dans le cerveau

1. Généralité de la lipidomique

1.1. Les différentes approches de « omiques »

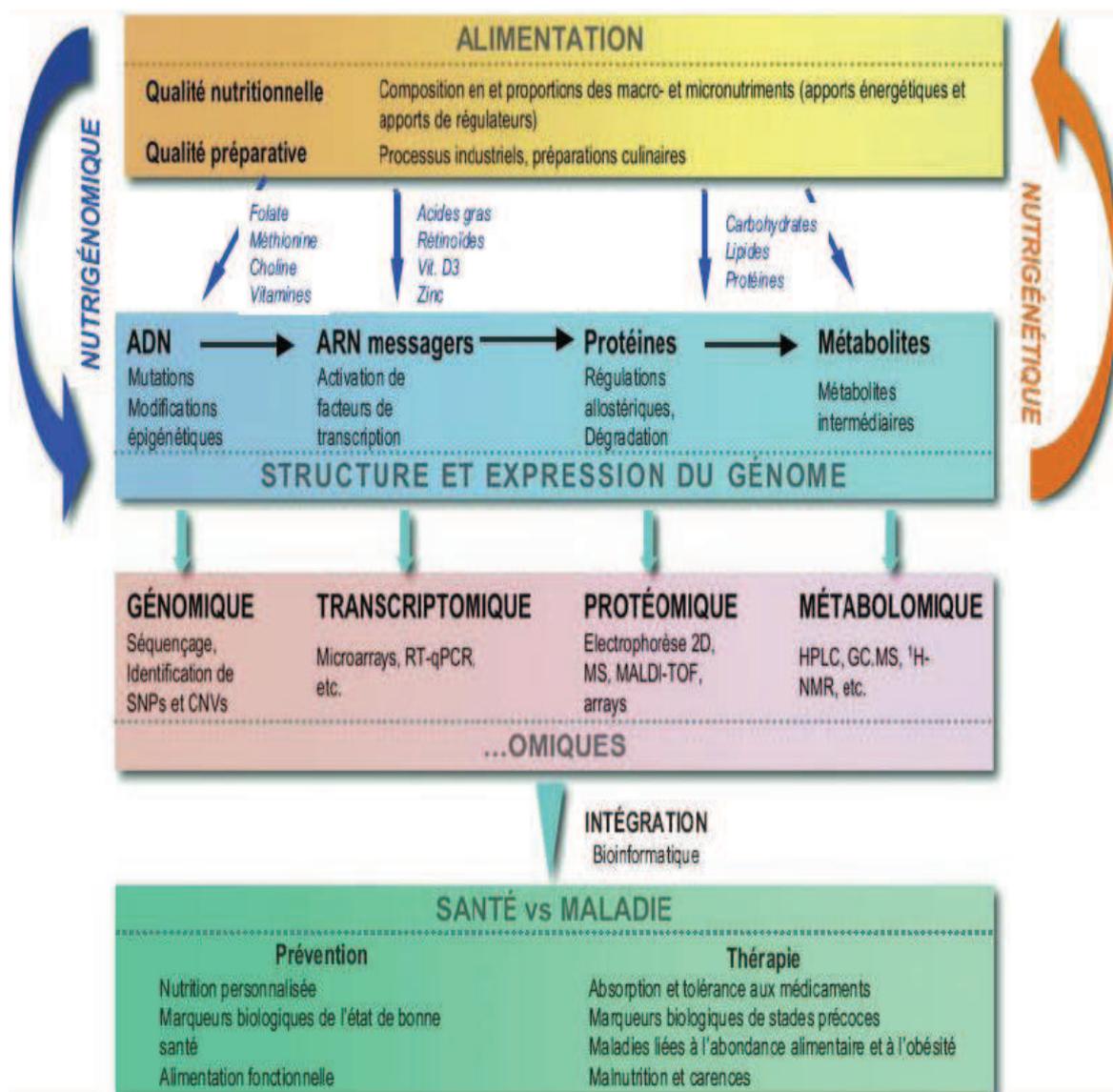
Les technologies « omiques » telle que la génomique et le séquençage de l'ADN ont connu un essor important au moment du développement du projet Génome Humain dans les années 90. C'est pourquoi on les trouve fréquemment associées à la terminologie des sciences post-génomiques. D'autres facteurs extérieurs ont également contribué au développement des approches de biologie des systèmes « omiques », comme l'effet conjugué de l'amélioration sensible des plate-formes analytiques (RMN et spectrométrie de masse), du développement de nouveaux algorithmes statistiques largement diffusés dans la communauté scientifique (logiciels de statistiques multivariés adaptés, conviviaux ou disponibles en « open source » pour la communauté) et d'un niveau de puissance suffisant des ordinateurs. Les processus biologiques fondamentaux peuvent être étudiés par l'application de technologies « omiques » : génomiques, transcriptomiques, protéomiques, métabolomiques et d'autres (Figure 13).

Figure 13 : Représentation schématique des technologies-omiques, commence à partir des gènes jusqu'aux métabolites (Roux et al.)



Les approches « omiques » appliquées à la nutrition ont pour but l'étude de l'influence de nutriments sur le génome, le transcriptome, le protéome ou le métabolome (Muller and Kersten 2003). On parle alors de nutriginomique (Figure 14). En effet, la réponse aux nutriments se caractérise par une adaptation physiologique qui met en œuvre initialement des modulations d'expression de gènes, de protéines jusqu'à la production de métabolites. Ainsi, l'étude du profil génique (mais aussi protéique ou métabolique) après un régime alimentaire donné représente une signature spécifique de la réponse envers ce régime.

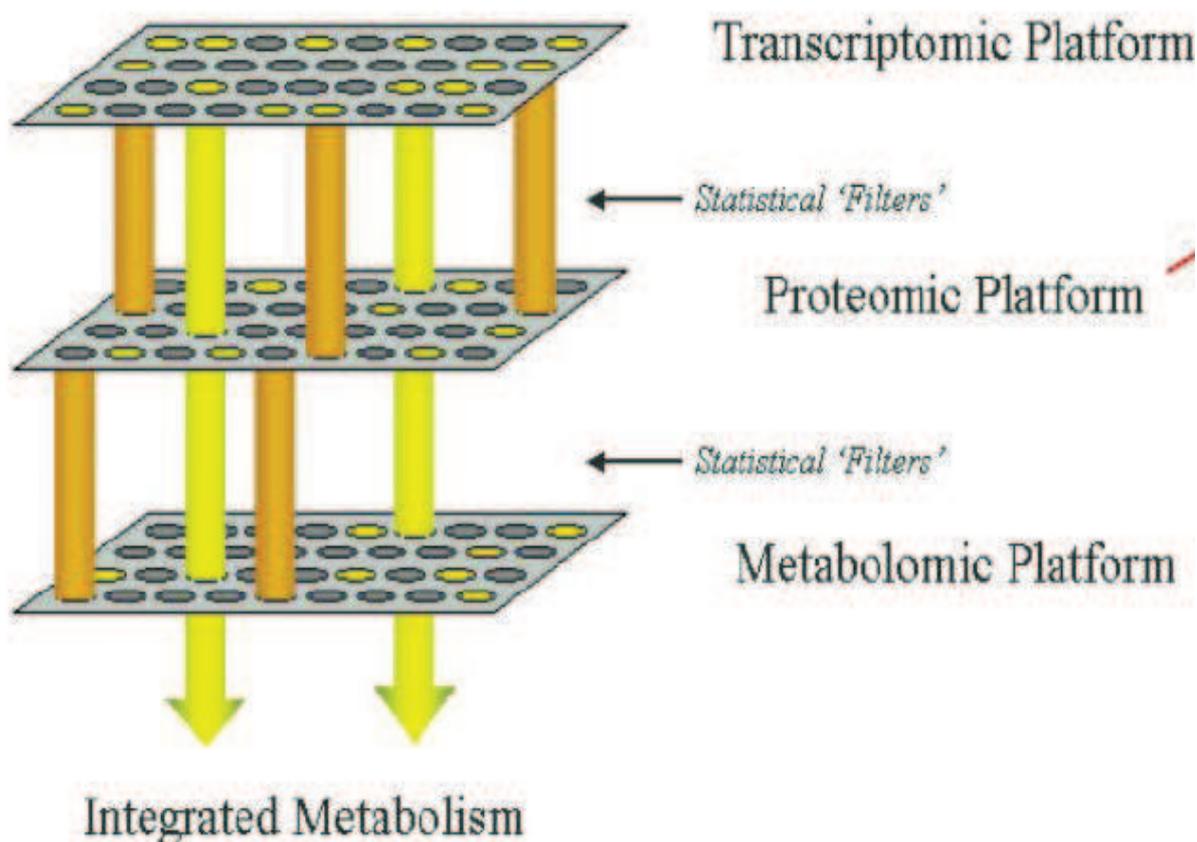
Figure 14 : La nutriginomique se sert d'outils technologiques de pointe dérivés de la génomique pour identifier et caractériser les « signatures alimentaires » (Wahli and Constantin 2009)



1.2. La métabolomique

Parmi ces approches intégratives de la biologie des systèmes, la métabolomique a une place de choix, car elle est au carrefour du déterminisme des phénotypes tout en intégrant l'ensemble des modifications qui interviennent aux niveaux inférieurs de l'organisation du vivant, du génome au protéome (Mutch et al. 2005; Ryan and Robards 2006) (Figure 15).

Figure 15 : La place de la métabolomique dans l'intégration des sciences en « omique » (Mutch 2005)



La métabolomique consiste en l'analyse la plus exhaustive possible de l'ensemble des métabolites d'une cellule, d'un tissu, d'un biofluide, et de son exploitation statistique et biologique. La métabolomique a pour objectif de mieux comprendre les processus métaboliques dans une condition donnée. L'interaction avec l'environnement ou l'apparition d'une pathologie perturbent l'homéostasie à différents niveaux de l'organisme, y compris le

métabolome. Analyser des profils métaboliques entre l'état d'équilibre homéostatique et la condition perturbée permet de mettre en évidence des biomarqueurs ou des signatures de la condition donnée (Bennett and Waters 2000).

Contrairement aux protéines, en raison de la grande diversité physico-chimique des métabolites de l'organisme une même plate-forme analytique ne peut mesurer l'ensemble du métabolome. Au sein de la métabolique, les métabolomes (définis par Olive S. en 1998) sont un ensemble de petites molécules, les métabolites, qui sont des composés impliqués dans les processus métaboliques. Les métabolites sont soit les produits issus de processus métaboliques endogènes, soit nécessaires à leurs bons déroulements. Il peut également s'agir de métabolites issus de l'alimentation et que l'on retrouve en l'état ou transformés de façon endogène (Manach et al. 2009). Il peut alors être avantageux de fractionner « les métabolomes » en fonction de classes physico-chimiques particulières comme les sucres, les acides organiques, les lipides, les acides aminés, les conjugués, les peptides, les vitamines etc. afin de pouvoir les analyser plus en détail.

La métabolique repose sur l'analyse complexe des métabolites à partir de fluides biologiques ou d'extraits tissulaires ou cellulaires, à l'aide de différentes méthodologies analytiques telle que la résonance magnétique nucléaire (RMN), ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS), suivies de procédures d'analyses statistiques multivariées. Nicholson a souligné le rôle de deux grandes disciplines scientifiques utilisées dans la métabolomique : la chimie analytique et la biostatistique (Lindon et al. 2003).

1.3. La lipidomique

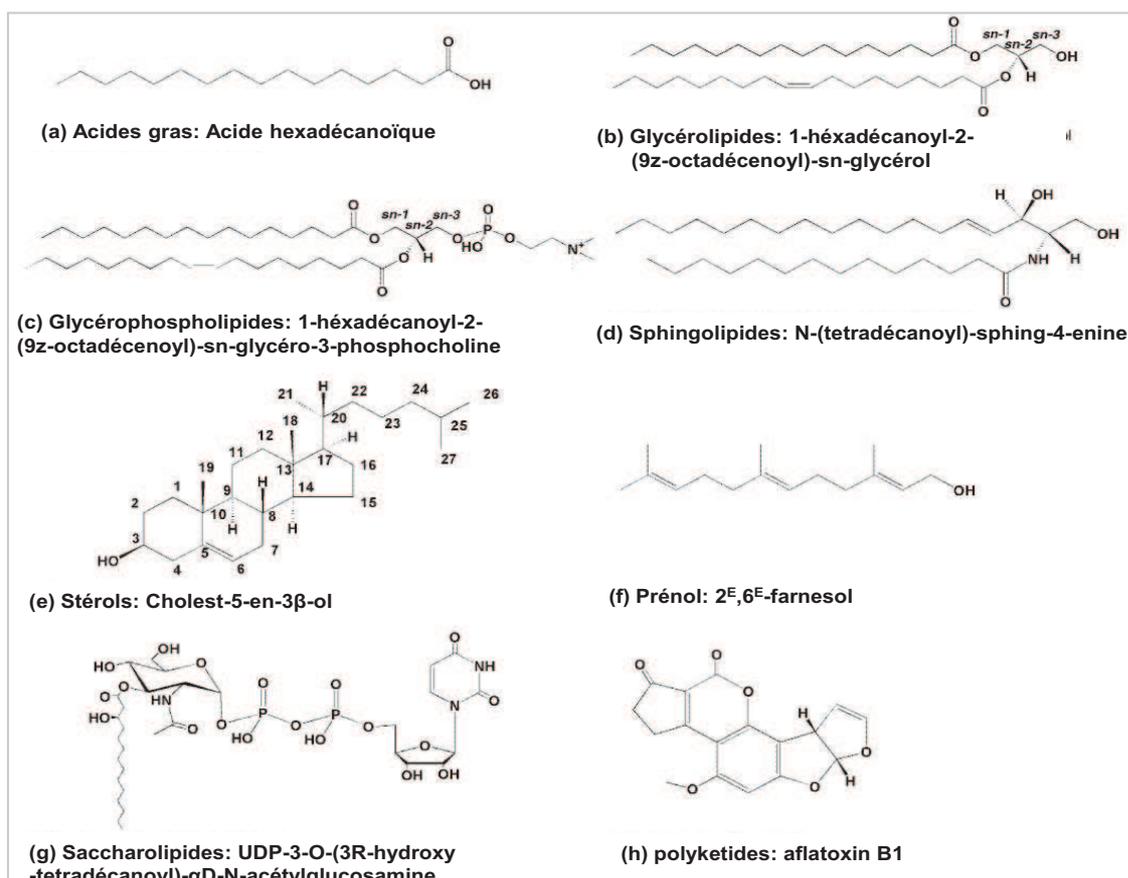
1.3.1. Définition et classification de lipides

Les lipides peuvent être classés selon leurs caractères chimiques (soit la structure de leur squelette carboné) en 8 classes, comme les acides gras, les glycérides (ou acylglycérols), les phospholipides (ou phosphoacylglycérol), les sphingolipides, les stérols, les pré-nols, les polykétides, est les saccharolipides (ou glycolipides) (Tableau 3) (Fahy et al. 2005). Un exemple de structure de chaque catégorie lipidique est montré dans figure 16.

Tableau 3 : Classification des lipides et les exemples typiques (Fahy 2005)

Catégorie	Exemple
Acides gras	Acide oléique
Glycérolipides	Triacylglycérol
Glycérophospholipides	Phosphatidylcholine
Sphingolipides	Sphingosine
Stérols	Cholestérol
Prénols	Farnesol
Saccharolipides	UDP-3-O-(3-hydroxy-tétradécanoyl)-N-acétylglucosamine
Polykétides	Aflatoxine

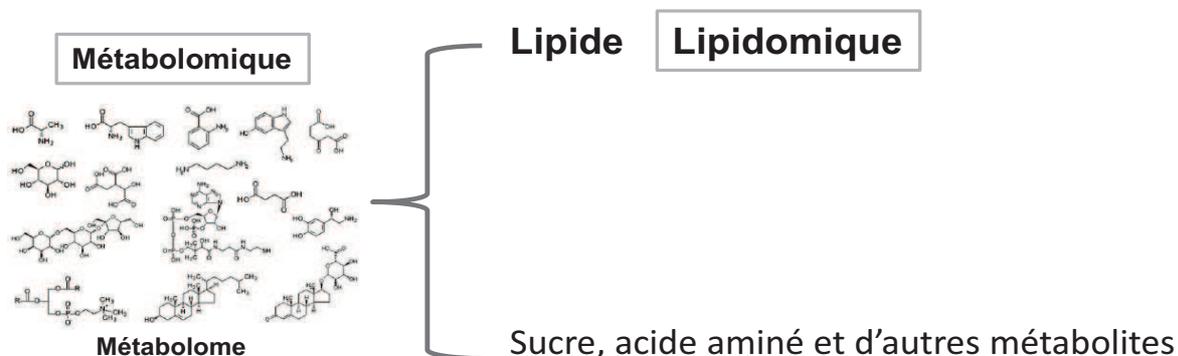
Figure 16 : Structures de chaque catégorie lipidique (Fahy 2005)



1.3.2. Une nouvelle approche ciblée : la lipidomique

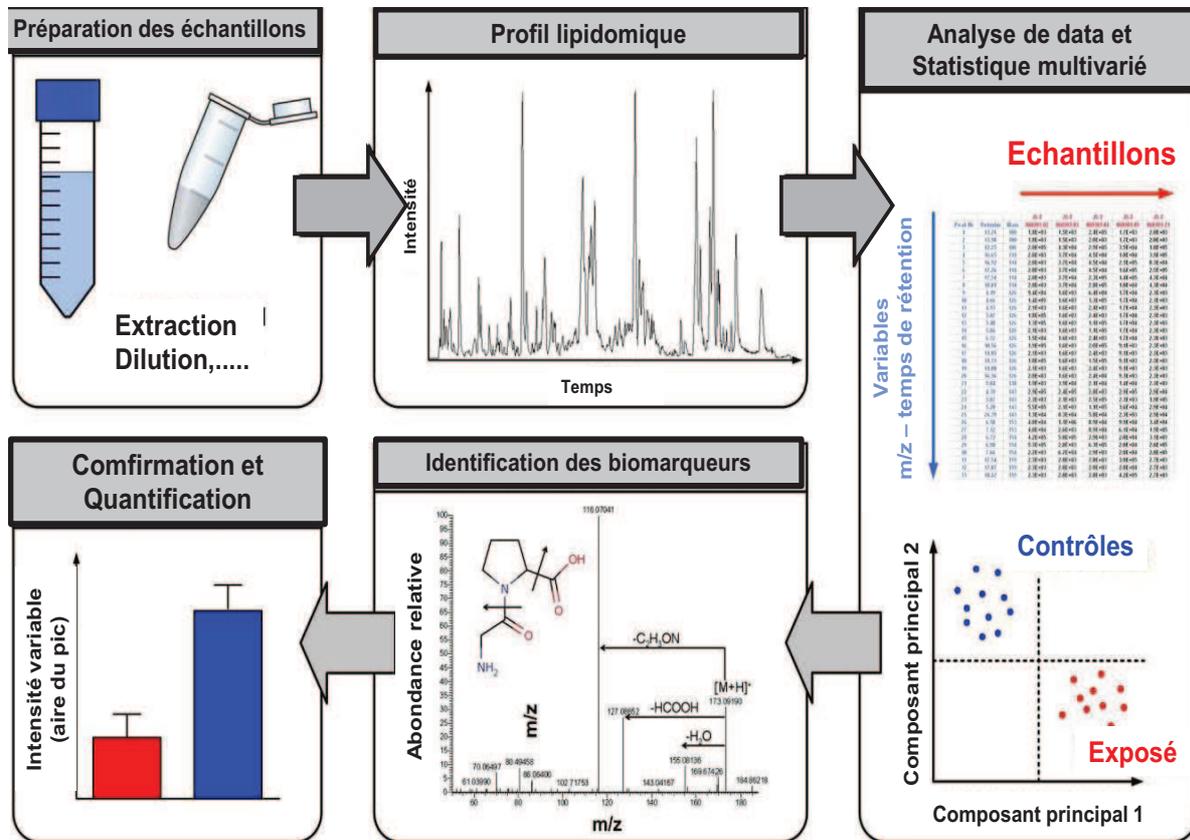
L'ensemble des lipides constitue le lipidome (classes, sous-classes et différentes espèces moléculaires des lipides), qui est aussi une des composantes du métabolome comme décrit ci-dessous (Figure 17). La caractérisation d'un ensemble de molécules lipidiques (lipidome) dans les échantillons biologiques correspond à la lipidomique. La recherche sur les lipides tire un bénéfice considérable de l'émergence de la lipidomique ces dernières années.

Figure 17 : Représentation schématique de la lipidomique et de la métabolomique



La lipidomique a été définie par le Groupe d'Etudes et de Recherches sur les Lipides (GERLI) de la Société française de Biochimie et Biologie comme la caractérisation complète des molécules lipidiques et de leur rôles biologiques propres ou leur interactions avec les protéines ou les régulations des gènes dans les processus métaboliques (Lagarde et al. 2003). Les approches de la lipidomique reposent sur l'acquisition des données obtenues par la combinaison de techniques classiques d'extraction des lipides avec des techniques plus sophistiquées de chimie analytique et de traitements bioinformatiques (Figure 18). Elles permettent de quantifier des composés précis du lipidome d'un organisme, définir les rôles cruciaux des lipides dans les cellules par l'analyse des interactions lipides-lipides et lipides-protéines; elles permettent également de mesurer des altérations du lipidome après perturbation cellulaire. Grâce à ces analyses, on peut mesurer des signatures moléculaires de certaines conditions données (comme l'alimentation) ou de maladies, notamment les maladies liées à la perturbation du métabolisme lipidique (comme le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires).

Figure 18 : Schématisation de la stratégie analytique la plus fréquemment utilisée pour une approche ciblée de lipidomique (Roux 2010)



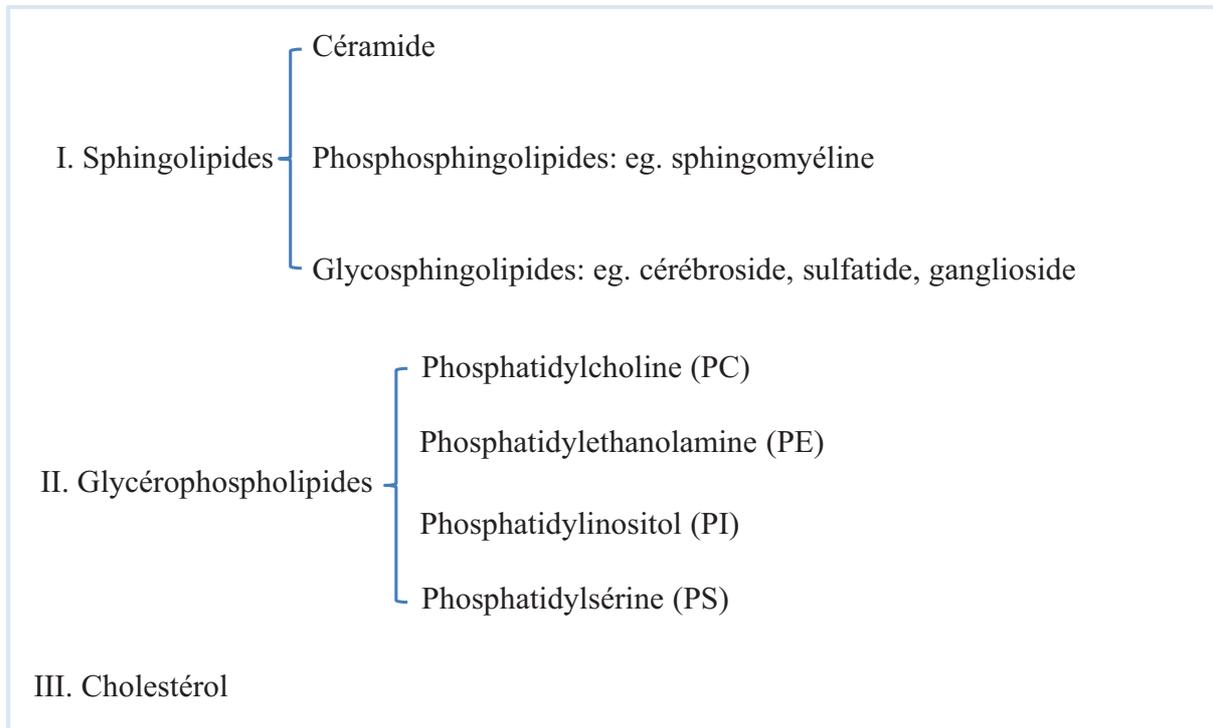
2. Lipidomique et cerveau

2. 1. Des lipides cérébraux

Le cerveau est l'organe le plus riche en lipides après le tissu adipeux (50% de poids sec du cerveau).

Les lipides cérébraux comprennent principalement 3 catégories majeures : 1/ les sphingolipides; 2/ les glycérophospholipides ; 3/ le cholestérol. Les 3 principales classes de lipides cérébraux et leurs sous-classes sont présentées dans la figure 19 ci-dessous.

Figure 19 : Schéma de classification des lipides cérébraux principaux



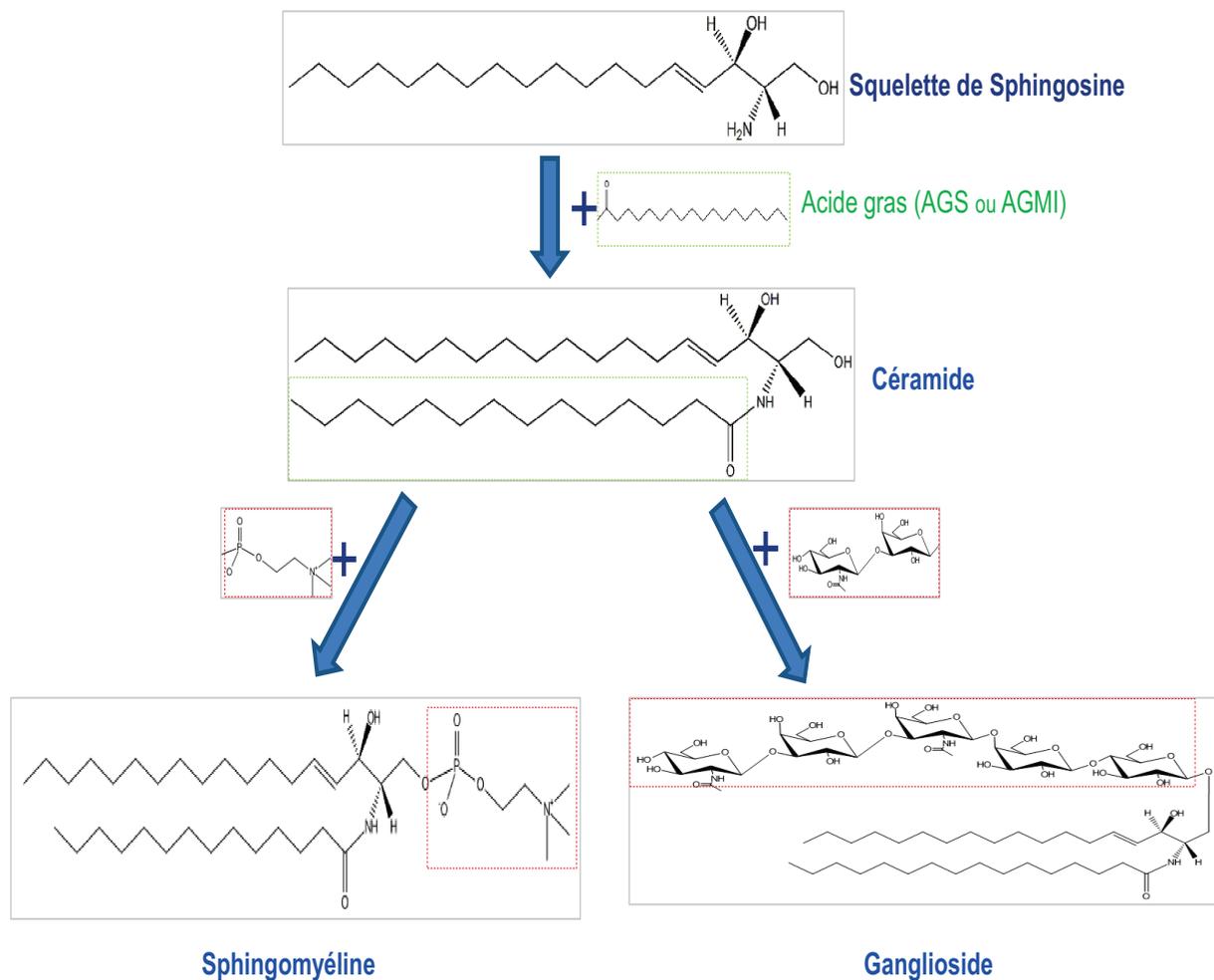
2.1.1. Sphingolipides du cerveau

Les sphingolipides sont une famille de composés complexes qui partagent une structure commune (Figure 20), un squelette de base sphingoïde qui est synthétisée *de novo* à partir de la sérine et d'un acyl-coA (CoA) à longue chaîne. La base majeure des sphingoïdes chez les mammifères est la sphingosine. La sphingosine est liée à un acide gras par sa fonction amine formant un céramide. Les acides gras des céramides sont généralement des AGS et AGMI à chaîne de 14-26 atomes de carbone. Les céramides sont précurseur de sphingolipides plus complexes (phosphosphingolipides et glycosphingolipides).

Les phosphosphingolipides majeurs sont des sphingomyélines. Les sphingomyélines sont formés par l'assemblage de la céramide lié à une choline par une liaison phosphodiester. Ils sont les principaux constituants de la gaine de myéline.

Les glycosphingolipides sont une famille diverse de molécules composés d'un ou plusieurs résidus de sucre liés par une liaison glycosidique à la base de glycoïde. Les cérébrosides, les sulfatides et les gangliosides sont inclus dans les glycosphingolipides. Ils sont des composants abondants dans la myéline.

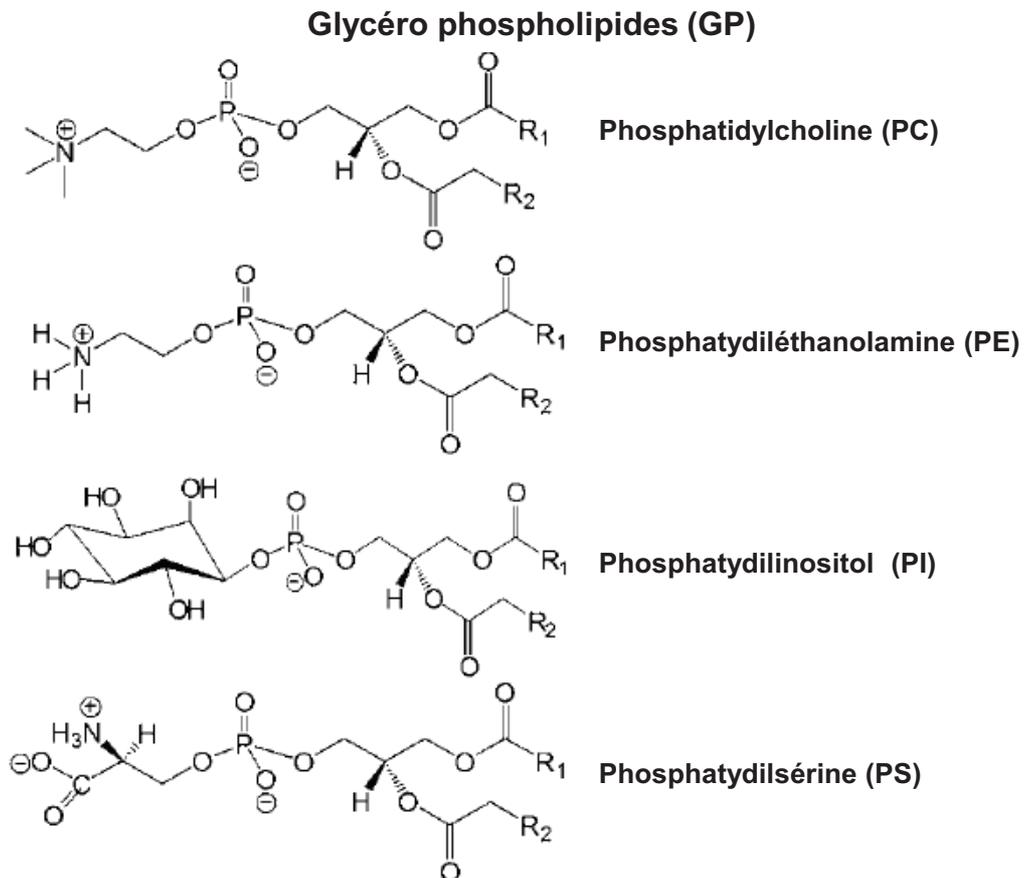
Figure 20 : Structures de sphingolipides



2.1.2. Glycérophospholipides (PL) du cerveau

Les classes de glycérophospholipides (PL) (Figure 21) présentes dans le cerveau humain sont la phosphatidylcholine (PC, 42-44% des glycérophospholipides totaux (PLT)), la phosphatidyléthanolamine (PE, 36-40% des PLT), la phosphatidylinositol (PI, 2-3% des PLT) et la phosphatidylsérine (PS, 11-13% des PLT) (Chavko et al. 1993).

Figure 21 : Structures de glycérophospholipides (Woods and Jackson 2006)



3. La lipidomique cérébrale

L'approche de lipidomique reçoit un intérêt croissant en raison des rôles cruciaux des lipides dans de nombreuses fonctions physiologiques et le développement de certaines pathologies (voir en première partie de cette introduction) (Wenk 2005). Notamment, des études récentes ont montré l'impact de certains neuroleptiques sur les profils lipidomiques de cerveaux de souris, affectant particulièrement certaines espèces de phosphatidylcholines et de sphingomyélines, ce qui pourrait expliquer certaines altérations psychiatriques et comportementales (Isaac et al. 2006). De façon analogue, Schwarz et al. (2008) ont trouvé des perturbations du profil en céramides et en acides gras libres dans certaines zones du cerveau de patients atteints de schizophrénie. Cette étude fait ainsi le lien entre une altération des lipides de structure dans le cerveau et une altération fonctionnelle.

Par ailleurs, l'application d'outils statistiques de chimiométrie aux analyses classiques de profils d'acides gras peuvent permettre d'extraire des signatures plus simples à expliquer et à interpréter que la lecture de tableaux de données ne le permet (Watkins et al. 2002; Yi et al. 2006). Ces approches peuvent ainsi donner un relief nouveau aux données produites, en permettant de mettre en évidence des interactions entre divers acides gras, en les combinant en signatures caractéristiques, et en les associant à des observations cliniques.

Objectifs de l'étude

Les objectifs que nous nous sommes fixés pour cette étude sont :

- De comparer l'importance d'une matrice lipidique à base de matière grasse végétale (palme) ou de matière grasse laitière pour améliorer le statut en DHA du cerveau de rats au-sevrage nés de mères déficientes en ALA, après 6 semaines de régimes en post-sevrage ;
- D'examiner si au-delà du statut en DHA, la nature des régimes utilisés pouvaient retentir sur la composition des lipides complexes constitutifs des structures cérébrales
- De mettre en œuvre et de développer une méthodologie originale de lipidomique adaptée à ce type d'études nutritionnelles.

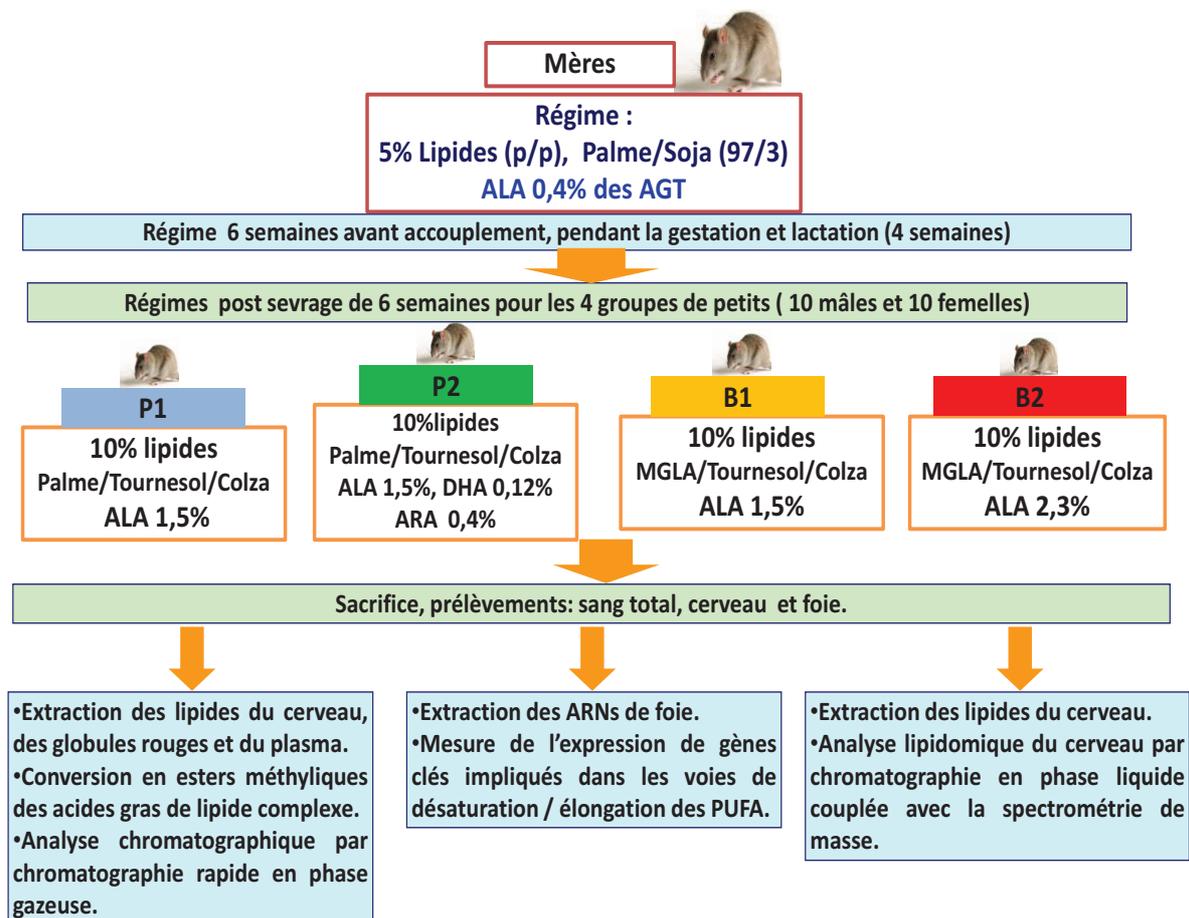
**M M
A E
T T
E H
R O
I D
E E
L S**

Matériel et méthodes

1. Animaux et régimes

1.1 Animaux et protocole nutritionnel

Figure 22 : Schéma des protocoles expérimentaux



L'étude nutritionnelle sur le modèle Rat a été programmée et réalisée à l'UMR 1197 dans le Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire de La Prise Alimentaire (NMPA), à l'Université Paris Sud (Orsay) sous la direction du Dr Bernadette Delplanque.

Le protocole a été mené dans les conditions classiques d'hébergement de l'animalerie de l'IBAIC : conditions standards et contrôlées d'alternance jour/nuit (8:00 AM-8:00 PM), de

température ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et d'hygrométrie (55-60%). Les animaux proviennent des laboratoires Janvier (France) ou ils recevaient un régime classique (A04C) de type croquettes.

Le protocole expérimental a été réalisé en utilisant des régimes semi-synthétiques (Figure 22) et de l'eau *ad libitum*.

Le protocole et les compositions en lipides des régimes utilisés sont donnés dans le tableau 4 et le tableau 5.

La composition des régimes semi-synthétiques est standardisée, fabriquée par Safe (F-89290 Augy).

- Le régime à 10% de lipides se compose d'amidon de maïs (41%), sucrose (20%), caséine (22%), cellulose (2%), minéraux '205B SAFE' (4%), vitamines '200 SAFE' %, et de méthionine (DL) (0,16%).
- Dans le régime à 5% de lipides, seules les quantités d'amidon de maïs (44 %) et le sucrose (22%) sont modifiées.

Des femelles Wistar normales, âgées de 6 semaines (Janvier, France) reçoivent un régime à 5% de lipides, pauvre en ALA (0,4%) sur une base saturée (palme/soja 97/3) pendant six semaines avant l'accouplement. Ce régime est poursuivi pendant la gestation et la lactation afin d'obtenir des petits carencés en n-3 au sevrage. L'accouplement est programmé pour une période de 7 jours (1 mâle et une femelle par cage).

Les rats nouveau-nés sont allaités pendant 4 semaines puis séparés en 4 groupes de 20 animaux (10 mâles et 10 femelles respectivement) (2/cage). Les ratons sont déficients en n-3, car issus de mères nourries avec des régimes déficients en ALA, et les études de restauration de leur statut en n-3 sont expérimentées avec des régimes dont les lipides diffèrent de ceux de la mère à la fois d'un point de vue quantitatif : 10% de lipides au lieu de 5%, et qualitatif. Le choix de mettre les jeunes rats à un régime à 10% de lipides correspond aux besoins en période de croissance du jeune rat.

Un premier groupe de ratons (P1) est nourri avec un régime dont les lipides (10%) sont un mélange d'huiles de palme, de tournesol et de colza afin d'obtenir les quantités requises en ALA soit 1,5% des acides gras totaux. Le régime du groupe P2 diffère du premier groupe P1 uniquement par une supplémentation en acide docosahexaénoïque (DHA) et en acide arachidonique (ARA), représentant 0,12% et 0,4% des acides gras, respectivement. Les régimes des groupes B1 sont fabriqués à base de matière grasse laitière anhydre (MGLA) mélangée avec des huiles de tournesol et colza afin d'obtenir une composition similaire en

ALA à P1 et P2. Le groupe B2 reprend les mêmes composés de base que B1, mais avec une augmentation sélective de colza, afin d'atteindre 2,3% d'ALA. B2 et B1 diffèrent par leur quantité d'ALA (2,3% au lieu de 1,5% des AG totaux) et par un rapport LA/ALA qui se trouve réduit de moitié : 5 vs 10.

La qualité des lipides utilisés en termes de mélanges d'huiles et donc de quantités et qualités d'acides gras (figure 22, Tab4-5), a été basée sur la composition des formules infantiles classiques, soit du palme/colza/ tournesol et des quantités de LA, d'ALA pour un ratio n6/n3 correspondant aux lipides du régime P1 avec complément en DHA et ARA pour le régime P2. L'objectif de l'étude étant le remplacement du palme par de la MGLA a conduit à l'établissement d'un régime B1, similaire à P1 en termes de compositions d'acides gras. Quant au régime B2, à base de MGLA, l'objectif était de se rapprocher des nouvelles recommandations, apportant plus d'ALA avec un ratio n6/n3 amélioré (5 versus 10), tout en restant dans la limite 5-15 proposée pour les laits infantiles.

Au terme des 6 semaines de régime, les animaux anesthésiés sont sacrifiés par décapitation. Les cerveaux et les foies sont prélevés ainsi que le sang total qui est centrifugé afin de séparer le plasma des globules rouges (qui sont lavés deux fois en sérum physiologique). Les tissus sont immédiatement préservés dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

Mon travail dans ce projet a consisté à récupérer et à traiter les échantillons de cerveau, de plasma, de foie, et de globules rouges afin d'extraire les lipides, et de les traiter pour des analyses d'acides gras en chromatographie en phase gazeuse, pour des études de lipidomique du cerveau, et pour mesurer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras à longue chaîne (voie de biosynthèse par désaturation/élongation) à partir du foie.

1.2 Composition des régimes acides gras alimentaires

La composition du régime alimentaire et la teneur en n-3 acides gras alimentaires est présentée dans les tableaux suivants (Tableau 4 et Tableau 5):

Tableau 4 : La composition du régime alimentaire (%AGT)

Composition en acides gras des régimes (% acides gras totaux)					
	Mères	Petits post-sevrage			
	5% lipides	10% lipides			
	Pauvre en ALA	P1	P2	B1	B2
	Palm/soja (97/3)	Palme/ Tournesol/Colza	Palme/ Tournesol/Colza	MGLA/ Tournesol/Colza	MGLA/ Tournesol/Colza
			DHA / ARA		
C4:0				1,94	1,80
C6:0				1,33	1,24
C8:0				0,83	0,77
C10:0	0,01	0,01	0,01	1,84	1,72
C10:1				0,19	0,17
C12:0	0,14	0,11	0,11	2,15	2,00
C12:1				0,05	0,05
C14:0	1,04	0,82	0,82	7,48	6,96
C16:0	45,37	36,15	36,15	19,85	18,74
C18:0	4,53	4,12	4,12	9,64	9,02
C18:1	35,80	38,44	38,44	26,62	29,42
C18:2n-6	10,75	15,98	15,98	13,88	13,29
C18:3n-3	0,41	1,56	1,56	1,53	2,33
ARA			0,40		
DHA			0,12		
LA/ALA	25,93	10,27	10,27	9,09	5,71
AGS	51,52	41,68	41,68	40,99	38,53
AG Courte Chaîne	0	0	0	6,13	5,70

Tableau 5 : La composition du régime alimentaire (g pour 100g d'aliment)

Composition en acides gras des régimes (g pour 100g d'aliment)					
	Mères	Petits post-sevrage			
	5% lipides	10% lipides			
	Pauvre en ALA	P1	P2	B1	B2
	Palm/soja (97/3)	Palme/ Tournesol/Colza	Palme/ Tournesol/Colza	MGLA/ Tournesol/Colza	MGLA/ Tournesol/Colza
			DHA / ARA		
C4:0				0,19	0,18
C6:0				0,13	0,12
C8:0				0,08	0,08
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,18	0,17
C10:1				0,02	0,02
C12:0	0,01	0,01	0,01	0,21	0,20
C12:1				0,01	0,00
C14:0	0,05	0,08	0,08	0,75	0,70
C16:0	2,27	3,62	3,62	1,98	1,87
C18:0	0,23	0,41	0,41	0,96	0,90
C18:1	1,79	3,84	3,84	2,66	2,94
C18:2n-6	0,54	1,60	1,60	1,39	1,33
C18:3n-3	0,02	0,16	0,16	0,15	0,23
ARA			0,04		
DHA			0,01		
LA/ALA	25,93	10,27	10,27	9,09	5,71
AGS	2,10	4,20	4,20	4,10	3,60
AG Courte Chaîne	0	0	0	6,13	5,70

2. Analyses des profils en acides gras des différents tissus

2.1 Protocoles

2.1.1 Analyse du profil en acides gras du cerveau

Extraction des lipides cérébraux

Chaque demi-cerveau est pesé et lyophilisé (lyophilisateur Bioblock, Christ Alpha 1-4, Bioblock Scientific, Strasbourg, France). Il est réduit en poudre à l'aide d'un potter motorisé pour obtenir un homogénat. Un poids sec correspondant à 65 mg de tissu frais est réhydraté et extrait par 1,5 ml du mélange hexane/iso-propanol (3/2, v/v) (Carlo Erba Réactifs – SDS, France) selon un protocole inspiré de Schwarz et al. (2008). Après centrifugation (9500 g, 10 minutes, à 4 °C) (Beckman Avanti™ J-25, Fullerton, Calif., USA), la phase supérieure (hexane) est récupérée et évaporée à sec sous flux d'azote. Les extraits de lipides secs sont conservés sous atmosphère d'azote à -80°C avant méthylation.

Transméthylation des lipides cérébraux

Le résidu sec est repris par 1,9 ml de solution stock contenant un mélange méthanol/chlorure d'acétyle (18 /1, v/v) selon Lepage et Roy (1986) (Chlorure d'acétyle : Sigma-Aldrich Chemical Co., USA ; Méthanol : Carlo Erba Réactifs – SDS, France) (Lepage and Roy 1986). Pour chaque échantillon, une solution stock (1,8 ml de méthanol et 100µl de chlorure d'acétyle) est préparée extemporanément et ajoutée au résidu sec. Les tubes sont bouchés, mis au bain-marie à 100°C pendant 60 min, puis refroidis à température ambiante. Un ml d'hexane et 1 ml d'eau distillée sont alors ajoutés et les tubes sont agités au vortex pendant 30 sec. Après centrifugation (300 g, 3 minutes, à 10°C), la phase supérieure (hexane) est récupérée. Une deuxième extraction est réalisée et les deux phases supérieures sont réunies. Deux cents µl de méthanol sont ajoutés et l'ensemble est évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu sec est repris par 200 µl d'hexane en rinçant les parois du tube et peut être conservé plusieurs mois à -80°C avant l'analyse chromatographique.

Analyse chromatographique

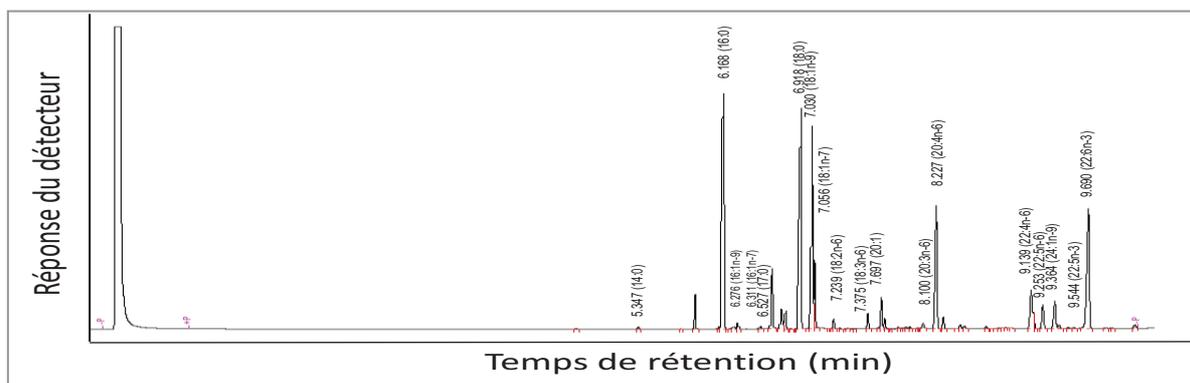
Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés en chromatographie ultra-rapide en phase gazeuse (CPG) (Perkin Elmer, Clarus 600 CPG, Waltham, USA) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID_s) (Perkin Elmer, CFH200-220, Waltham, USA).

Les analyses ont été effectuées sur 1µl d'échantillon, injecté en mode séparateur de flux à 10ml/min. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène, l'analyse est réalisée à la pression constante de 207 KPa. La séparation est réalisée dans une colonne capillaire BPx70 (SGE International Pty. Ltd. Australia) de 10m de long, 0,1mm de diamètre interne et 0,2µm d'épaisseur de film. Le septum et l'insert de l'injecteur sont changés toutes les 200 injections.

La température initiale de l'injecteur est de 50°C et elle est ensuite programmée pour augmenter rapidement à 999°C/min jusqu'à 250 °C. Cette température de 250 °C reste constante pendant 6,5 minutes puis diminue à la vitesse de 999 °C/min jusqu'à 50 °C. La température du détecteur est de 280 °C. La température initiale du four de 60 °C est maintenue pendant 0,5 minute, puis elle est augmentée jusqu'à 200 °C à la vitesse 20 °C /min, puis cette température augmente de 7 °C/min jusqu'à 225 °C et reste constante pendant 1 minute, et augmente jusqu'à 250 °C à la vitesse 160°C/min. Le four est alors maintenu 1 minute à 250 °C. La durée d'un cycle complet d'analyse d'un échantillon est d'environ 13 minutes. Un exemple chromatographique de profil d'acides gras cérébraux est montré dans figure 23.

Les acides gras sont identifiés par leur temps de rétention comparé à celui de standards appropriés : PUFA No. 2 (source animale, Ref. : 47015-U SUPELCO – SIMGA, USA), dilué à 10mg /ml dans l'hexane; PUFA No. 3 (huile de flétan, Ref.: 47085-U, SUPELCO – SIMGA, USA) dilué à 10mg/ml dans l'hexane ; GLC68F, GLC674, Nu-Check-Prep, Minnesota, USA).

Figure 23 : Un exemple de chromatogramme du profil d'acides gras cérébraux



2.1.2 Analyse du profil en acides gras des globules rouges

Extraction des lipides érythrocytaires

Les globules rouges sont obtenus par centrifugation du sang entier à 3500t/mn pendant 30mn à +4° et lavés 2 fois en sérum physiologiques; les culots correspondants à 1 mL de sang total sont extraits par 1,5 ml du mélange hexane/iso-propanol (3/2, v/v) selon un protocole inspiré de Schwarz et al. (2008). Après centrifugation (9500 g, 10 minutes, à 4 °C), la phase supérieure (hexane) est récupérée et évaporée à sec sous flux d'azote. Le résidu sec est conservé sous atmosphère d'azote à -80°C avant méthylation.

conversion en ester méthyliques des lipides érythrocytaires

La procédure de trans-méthylation des lipides érythrocytaires est identique à celle des lipides cérébraux (se référer à la partie Méthylation des lipides cérébraux, pages précédentes 59). Les acides gras méthylés sont repris dans 75 µl d'hexane en rinçant les parois du tube et peuvent être conservés plusieurs mois à -80°C avant l'analyse chromatographique (Masood et al., 2005).

Analyse chromatographique

La procédure d'analyse chromatographique des lipides érythrocytaires est identique à celle des lipides cérébraux (se référer à la partie Analyse chromatographique, pages précédentes 59).

2.1.3 Analyse du profil en acides gras du plasma

Transméthylation des lipides plasmatiques

1,9 ml du mélange méthanol/ chlorure d'acétyle (18 /1, v/v) de la solution stock est préparé extemporanément pour chaque échantillon selon la méthode décrite par Lepage et Roy (1986). Deux cent cinquante µL de plasma sont repris dans cette solution. Les tubes sont bouchés, mis au bain-marie à 100°C pendant 60 min, puis refroidis à température ambiante. Sept cent cinquante ml d'hexane sont alors ajoutés et les tubes sont vortexés 30 sec. Après centrifugation (300 g, 3 min, à 10°C), la phase supérieure (hexane) est récupérée. Une deuxième extraction est réalisée et les deux phases supérieures sont réunies. 200 µl de

méthanol sont ajoutés et l'ensemble est évaporé à sec sous flux d'azote. Après évaporation, les esters méthyliques d'acides gras sont repris dans 100 µl d'hexane en rinçant les parois du tube et peuvent être conservés plusieurs mois à -80°C.

Analyse chromatographique

La procédure de l'analyse chromatographique des lipides érythrocytaires est identique à celle des lipides cérébraux (se référer à la partie Analyse chromatographique, pages précédentes 59).

2.2. Analyse de l'expression des gènes dans la voie de biosynthèse des AGPI par désaturation/élongation

Extraction des ARN

L'ARN total a été extrait à partir d'échantillons de tissu en utilisant le Trizol[®] réactif (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA) d'après la méthode de Brody et al. (Brody et al. 2007).

En bref, des échantillons de tissu sont pesés (50-100mg) et sont placés dans un tube contenant 1 ml de Trizol[®] (Invitrogen). Le tissu a été homogénéisé avec le réactif. Après une agitation vigoureuse, 200 µl chloroforme sont rajoutés dans l'échantillon et les tubes sont maintenus à température ambiante pendant 3 minutes. Ils sont ensuite vigoureusement agités et centrifugés (12 000g, 15 minutes à 4°C).

Le traitement par le chloroforme permet d'obtenir deux phases. La phase supérieure aqueuse contenant les ARN totaux est récupérée. Les ARN sont alors traités par 500 µl d'isopropanol et centrifugés (12 000g, 10 minutes à 4 °C). Les échantillons reposent à température ambiante pendant 10 minutes. Le culot d'ARN est récupéré et lavé avec 1 ml d'éthanol à 75%. Après une dernière centrifugation (7500 g, 10 minutes à 4 °C), le surnageant est éliminé, et le culot d'ARN est évaporé à température ambiante pendant 30 minutes, puis re-suspendu dans 20 à 40 µl de l'eau DEPC (sans DNAase et RNAase). Un chauffage de 10 minutes à 65 °C, suivi de 5 minutes sur lit de glace est nécessaire avant lecture de la densité optimisée (DO). La qualité et la concentration de l'ARN total sont mesurées par spectrophotométrie.

Les ARN sont conservés à -20°C jusqu'à l'étape de RT-PCR.

RT-PCR

L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, soit une PCR après transcription inverse (RT) d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc).

En bref, la transcription reverse a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux préalablement dénaturés (65°C pendant 10 minutes). Un µg d'ARN totaux est ajoutée de l'eau DEPC pour obtenir un volume 10 µl. La transcription inverse est ensuite réalisée dans un volume final de 20 µl comprenant 1 µl de l'enzyme (SuperScript™ II reverse transcriptase, 200 U/µl, Invitrogène), 4 µl de tampon de l'enzyme, 2 µl de dNTP (2'désoxyribonucléoside 5'triphosphate, 5mM, Invitrogène), 2 µl de DTT (dithiothréol 0,1M, Invitrogène).

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à 37 °C pendant 1 heure. Les ADNc obtenus ont été ensuite dilués (1/5) en vue de leur utilisation en PCR quantitative en temps réel.

Expression des gènes par qPCR

Pour notre étude, nous avons sélectionné 4 gènes d'intérêt que nous avons testés et validés avec des amorces spécifiques, spécialement élaboré in silico pour notre étude, à l'aide des outils informatiques disponible sur le site ROCHE (<http://www.roche.com/products/product-list.htm?type=researchers&id=2>).

Les gènes étudiés étaient les suivants :

Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces des gènes étudiés

Enzyme	Gène	Référence	Séquence nucléotidiques des amorces
Δ5 désaturase	FADS1	NM_053445.2	F/5'-GAACTCTCTGATTGGAGAGCTA
			R/5'-CCGGAATTCATCAGTGAGC
Δ6 désaturase	FADS2	NM_031344.2	F/5'-AATTTCCAGATTGAGCACCAC
			R/5'-AGTGGGGCAATCTTGTGC
Δ9 désaturase	SCD1	NM_139192.2	F/5'-GAAGCGAGCAACCGACAG
			R/5'-GGTGGTCGTGTAGGAACTGG
élongase 2	ELOVL2	NM_001109118.1	F/5'-AACCTCGGAATCACACTTCTTT R/5'- TCCCAGCTGGAGAGAACG

La PCR (RT-PCR) en temps réel a été effectuée sur tous les échantillons d'ADNc pour ELOVL2, SCD1, FADS1 and FADS2. Le gène 18S a été utilisé comme contrôle interne pour normaliser l'expression d'ELOVL2, SCD1, FADS1 and FADS2. Une série de dilution de RT-PCR produit du gène ciblé a été utilisé pour générer une courbe standard afin de quantifier l'expression de chaque gène. Le stratagene Mx 3005P système (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) et le SYBR Green Master mix kit (Eurogentec, Philadelphia, PA, USA) ont été utilisés pour une analyse quantitative. Les analyses ont été réalisées en double et les valeurs obtenues ont été exprimées relativement aux taux d'expression respectif de l'ARN 18S et par rapport à un rat contrôle, selon la méthode $\Delta\Delta$ (Ct) (Livak and Schmittgen 2001).

2.3. Analyse lipidomique du cerveau

2.3.1 Protocoles d'analyses

Extraction des lipides cérébraux

La procédure d'extraction des lipides cérébraux selon la méthode inspirée de Schwarz, et al. (2008) est identique à celle de l'analyse du profil d'acides gras cérébraux (se référer à la partie **2.2.1 Analyse le profil des acides gras cérébraux**, page 59).

Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

- *Table d'échantillonnage*

L'ordre de passage des échantillons est strictement aléatoire ; un échantillon contrôle qualité (QC) constitué par le mélange d'une vingtaine d'autres échantillons est réalisé et injectés régulièrement dans la séquence d'analyse, afin de déterminer lors du traitement statistique de la stabilité des conditions d'analyse au cours de la série. Un « blanc » d'injection, également injecté avec une fréquence donnée, permettra d'éliminer le bruit de fond détecté lors de la phase de retraitement.

- *Conditions HPLC*

La colonne utilisée est NUCLEODUR[®] C18 Isis (Macherey Nagel, Allemagne) dont les caractéristiques sont : phase C18, diamètre interne 2 mm, longueur 100 mm, et diamètre des particules 1,8 µm.

Les séparations ont été réalisées sur une HPLC Agilent 1200 RRLLC (Agilent Technologies, Les Ulis, France) pour les échantillons injectés sur la colonne NUCLEODUR[®] C18 Isis.

Les gradients d'élution choisis sont décrits dans le Tableau 7 correspondant aux analyses effectuées à l'aide de colonne NUCLEODUR[®] C18 Isis.

Tableau 7 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses sur le système Agilent RRLLC 1200 à l'aide de la colonne NUCLEODUR[®] C18 Isis

Temps (min)	Débit mLmin ⁻¹	H ₂ O		Acétonitrile:iso-propanol(5/2, v/v)	
		0,1% Acide formique		0,1% Acide formique	
0	0,4	65		35	
6		0		100	
13		0		100	
14		65		35	
18		65		35	

- *Conditions Spectrométriques*

Un spectromètre de masse a été utilisé en mode positif (ESI+). Le travail a été toutefois principalement basé sur une spectrométrie de masse hybride composée d'un quadripôle et d'un temps de vol (Q-TOF, Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

- *Paramètre MS*

Les études lipidomiques ont été réalisées en mode balayage Full Scan de m/z 50 à 1500 pour les analyses des échantillons cérébraux. Le spectromètre de masse utilisé est le micro Q-TOF-II commercialisé par la société Bruker Daltonics (Wissembourg, France). Le mode d'ionisation ESI+ a été testé.

Les paramètres utilisés sont répertoriés dans le tableau 8. Les données brutes ont été converties en données plus universelles (.mzXML) via le logiciel CompassXport pour l'étape de retraitement des données.

Tableau 8 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre hybride, Q-TOF en mode d'ionisation ESI+

Tension du capillaire	4,5 kV
Température du capillaire en verre	200 °C
Tension de cône	40V
Débit du gaz nébuliseur	34,8psi
Débit du gaz rideau	10 L·min⁻¹

2.3.2 Analyse des données

Traitement des données en CompassXport

Les données sont d'abord traitées par le logiciel libre CompassXport qui permet de transférer et récupérer des données analysées par spectrométrie de masse, celui-ci permet entre autre de visualiser les données sous forme de chromatogramme (en format mzXML).

Traitement des données en script XCMS et Caméra du R

Les profils métabolomiques sont extraits et alignés par le logiciel XCMS fonctionnant sous l'environnement R. Ce logiciel permet :

- L'extraction de pics ; le logiciel permet le fractionnement du spectre de masse en différentes sections (par défaut 0.1m/z). Dans chacune des sections, l'extraction des pics sera effectuée si celui-ci est présent dans plusieurs balayages (scans) successifs.
- La comparaison des pics extraits entre les différents échantillons et création des groupes ; cette étape correspond à la phase d'alignement des pics à travers les échantillons. Un groupe est un ion qui est considéré comme identique dans un ensemble d'échantillons.

- La correction des temps de rétention ; cette fonction a pour but de palier aux irrégularités de la séparation chromatographique d'une analyse à l'autre. Dans l'ensemble des ions alignés, un certain nombre d'ions bien représentés dans la majorité des échantillons seront utilisés comme référence pour corriger la valeur du temps de rétention de l'ensemble des ions.
- Recherche de données manquantes ; si un ion n'est pas extrait dans un échantillon, le logiciel recherche dans le chromatogramme la valeur d'intensité à l'endroit supposé du pic.

Traitement des données en Excel

Une fois les données traitées par XCMS, elles sont ensuite transférées dans « Excel ». Des filtrations sont effectuées afin de pouvoir supprimer les données non nécessaires ou artéfactuelles. Les données sont filtrées à l'aide d'un blanc expérimental. Il s'agit d'un échantillon ne contenant que les solutions de dilutions. Il est injecté entre chaque série de 10 échantillons pendant l'analyse expérimentale. On soustrait les pics du bruit de fond des blancs aux échantillons expérimentaux.

Identification structurale des ions d'intérêt

Après l'identification des ions d'intérêt par le traitement statistique, nous avons recherché la nature des molécules lipidiques qu'ils représentaient. Nous avons pour cela utilisé l'application en ligne MZedDB, « Tools for annotation of High resolution MS metabolomics data. (<http://maltese.dbs.aber.ac.uk:8888/hrmet/search/addsearch0.php>);

Figure 24 : L'interface MZedDB pour l'annotation des adduits issus de l'analyse en haute résolution issue de la spectrométrie de masse

The screenshot shows the MZedDB web interface. On the left is a sidebar with navigation options: Home, Metabolite search, Putative Ionisation Product, Adduct Manipulation, MF generator, R<->MZedDB, News, and Comments. The main area is titled 'MZedDB Tools for the annotation of High Resolution MS metabolomics data'. It features a search form with the following fields: 'Molecular Formula' (empty), 'Accurate mass' (387.7919), 'u - Accuracy' (1), 'ppm', 'Nominal mass' (empty), 'u - Cut-off' (0.7), 'u', and 'Mass range' (empty, 'u'). Below these are 'Adducts selection' options: 'Default selection: positive mode' (checked), '- negative mode' (unchecked), and 'Select all current: positive mode' (unchecked), '- negative mode' (unchecked). A 'Customise selection:' section contains a dropdown menu with a list of adduct types: [M+ACN+Na]1+, [M+IsoProp+H]1+, [M+2Na-H]1+, [M+ACN+H]1+, [M+K]1+, [M+H+CH3OH]1+, [M+Na]1+, [M+NH4]1+, [M+H]1+, [M+1]1+, [M+H-NH3]1+, [M+H2O]1+, [M+H-FA]1+, M, and [3M-H]1-. To the right of this menu is a list of databases: all, aracyc, dico, hmdb, kegg, imdb, mammal, metacyc, plant, and ricecyc. At the bottom, there are 'Search limits' (Apply adducts formation rules checked, Only include C,H,N,O,P,S checked) and 'Output and formatting' (No formatting checked, Extended output unchecked) options, followed by a 'Submit' button. The footer reads '© 2008 Aberystwyth University (Contact: John Draper)'.

Cette interface permet de calculer les types d'adduits auxquels correspondent la masse relative (m/z) soumise, et de proposer des structures moléculaires et des noms de composés possibles enregistrés dans des banques de données du Web. A ce stade, il ne s'agit que de propositions, ces structures devant être confirmées par des analyses subséquentes (fragmentation MS/MS).

3. Analyse statistiques

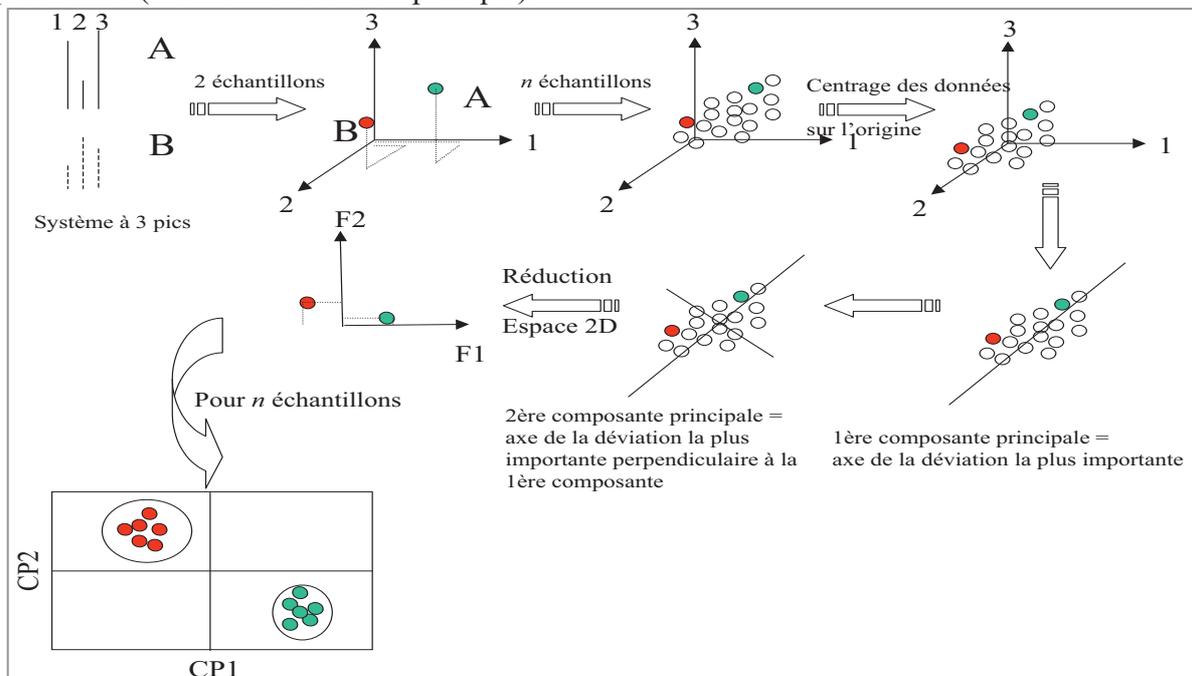
Le traitement des données a été réalisé selon un mode multivarié, à l'aide du logiciel Simca-P+ version 12.0 (Umetrics, Umeå, Suède), et univarié à l'aide du logiciel Statview version 5.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA).

Pour le mode univarié, nous avons appliqué lorsque c'était nécessaire des analyses de variances à deux voies, en particulier pour étudier l'effet sexe, l'effet régime et leur interaction pour moduler les profils en acides gras. Des analyses de régression linéaires et polynomiales ont été réalisées lorsque c'était nécessaire.

Le type de statistiques multivariées utilisé ici est à base d'analyse en composantes principale et ses déclinaisons en analyses de type « PLS » (Partial least square) permettant d'associer des variables explicatives X à des variables à prédire Y. Dans notre cas, il s'agira pour cette dernière principalement d'une variable d'appartenance à un groupe. Le modèle PLS dans ce cas est un modèle d'analyse discriminante utilisé pour la classification.

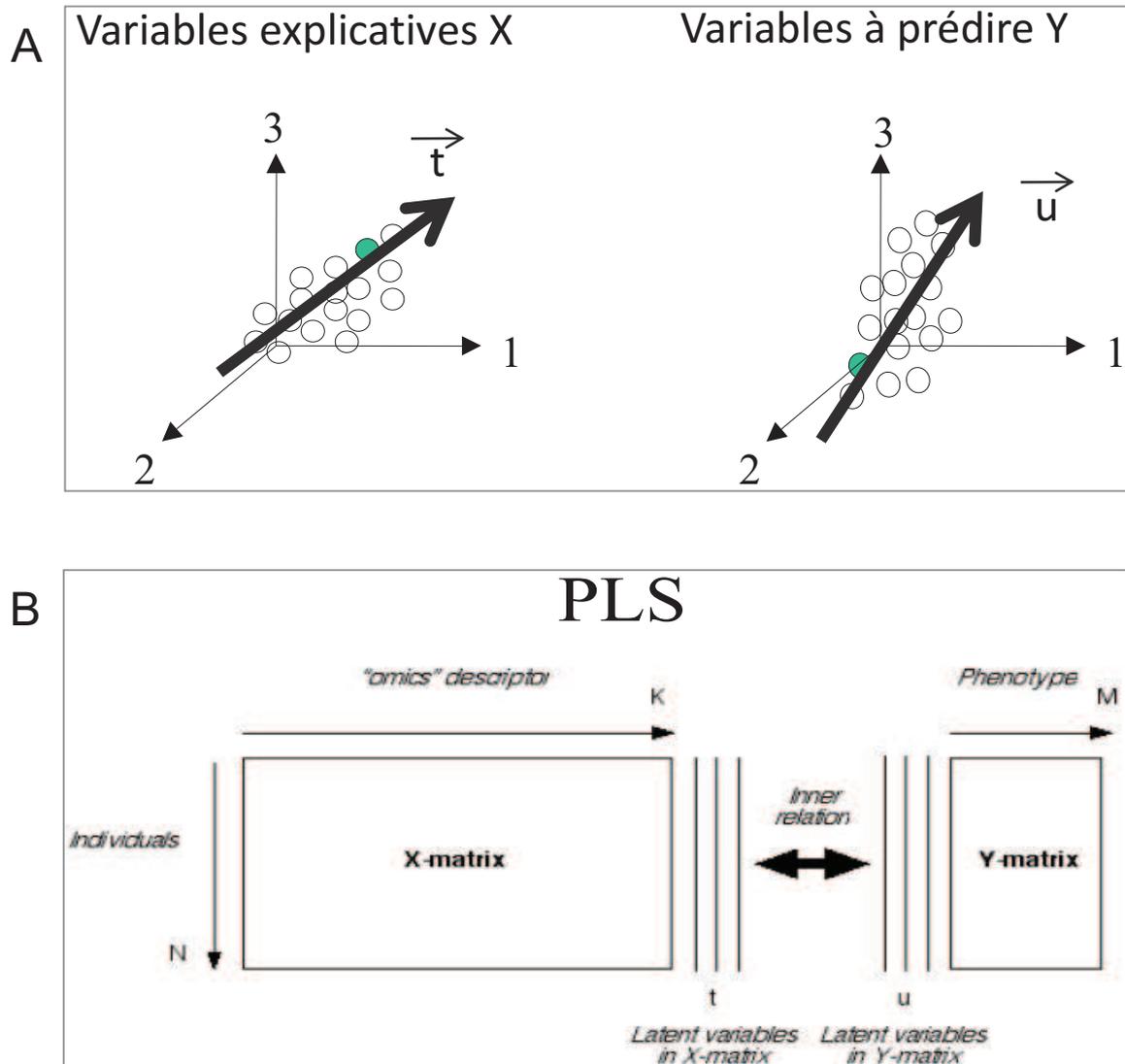
L'analyse en composantes principales (ACP) permet d'étudier l'ensemble du modèle et la façon dont s'organisent les données en grandes tendances (ou composantes principales) (Figure 25).

Figure 25 : Principes de l'analyse en composantes principales. Chaque pic défini une variable et une dimension dans l'espace. Pour simplifier, l'exemple illustre l'utilisation de 3 pics chromatographiques définissant un espace à 3 dimensions qui est réduit à un espace à 2 dimensions. Le principe est le même pour n pics que l'on souhaite représenter dans un espace plus réduit (2 à 4 dimensions en pratique).



L'analyse PLS consiste à examiner la relation entre deux séries de données, une série X de données prédictives et une série Y de données à prédire. La méthode permet de mesurer la covariance entre les composantes issues de X à celle issues des Y (Figure 26), et rétrospectivement à déterminer quelles sont les variables individuelles X et Y qui « pèsent » le plus dans cette relation. Ces dernières variables pourront alors être retenues comme des bioindicateurs importants dans le cadre d'analyses de données biologiques.

Figure 26 : Principe de l'analyse PLS. A- Analyse PLS, examinant la co-variance entre les composantes principales X (vecteur t) et les composantes principales des variables Y (vecteur u) ; l'algorithme examine le degré de corrélation entre t et u ($t // u$). B- représentation visuelle de PLS sous forme de matrices de données telle que celles utilisées communément sous excel.



Avant toute analyse statistique multivariée, les données sont normalisées afin d'éviter une dispersion trop grande qui rend instable les modèles statistiques ; la normalisation pratiquée était la variance unitaire ou le pareto. La normalisation unitaire (UV) permet de centrer chaque variable autour de la moyenne, pondéré par son écart-type ($1/\sigma$). Toutes les variables ont le même poids, quelque soit leur intensité ; c'est le mode de normalisation que nous avons utilisé pour l'analyse des profils d'acides gras. La normalisation pareto est identique à l'UV mais la pondération est calculée en divisant par la racine carrée de l'écart-

type ($1/\sqrt{\sigma}$). Ce traitement est plus adaptée lorsqu'il existe de fortes disparités dans les intensités et lorsqu'il existe beaucoup de bruit de fond (ex : lipidomique).

En pratique, dans un premier temps les données sont analysées avec un modèle en composante principale (ACP) afin de visualiser la répartition des échantillons dans une carte à 2 ou 3 dimensions et afin de déterminer si à ce stade on peut identifier des facteurs majeurs de variation (effet sexe et/ou régime dans notre cas). Dans un second temps, des analyses supervisées PLS ont été appliquées, en utilisant une correction supplémentaire afin de filtrer la variance qui n'est pas liée à l'effet spécifiquement étudié. Ce filtre opère en dissociant la variance liée à l'effet étudié de la variance qui n'y est pas liée, et est ainsi particulièrement efficace pour se débarrasser des influences qui interfèrent dans la lecture des résultats. Nous avons utilisé pour cela soit le filtre « OSC » (orthogonal signal correction) ou le filtre incorporé dans l'algorithme OPLS (orthogonal PLS). Utilisée avec l'analyse discriminante PLS, cette opération permet de maximiser les différences inter-groupes et de minimiser les différences intra-groupes. Toutefois, le danger de ce dernier type d'analyse est de générer des résultats trop optimistes et de surestimer les différences mesurées (overfitting). La pertinence des modèles statistiques a donc été évaluée selon deux types de critères.

Indicateurs R2 et Q2

Ces indicateurs étudient la répartition des groupes au travers des coefficients $R^2(X)(cum)$ et $Q^2(cum)$ pour l'ACP, $R^2(Y)(cum)$ et $Q^2(cum)$ pour les modèles à base de PLS, dont les valeurs se situent dans l'intervalle [0-1]. Les coefficients R^2 indiquent la proportion de la variance des données qui peut être expliquée par le modèle utilisé. Un faible coefficient R^2 indique qu'il existe un bruit important ou des informations non pertinentes dans les données. Les coefficients Q^2 indiquent la proportion de la variance des données qui peut être prédite par le modèle utilisé. Pour un modèle non supervisé de type ACP (on ne donne pas d'attribut d'appartenance aux données), le but est de restituer un maximum de variance, c'est-à-dire restituer au mieux l'information contenue dans le tableau initial du jeu de données. Pour un modèle supervisé de type OPLS (on donne un attribut d'appartenance aux données), le but est d'expliquer dans le cas de la présente étude l'appartenance des individus à un groupe nutritionnel. Nos seuils sont $R^2 \geq 1$ et $Q^2 \geq R^2/2$.

Validation croisée

Dans la mesure où le nombre de variables est souvent largement supérieur au nombre d'individus et de l'emploi de filtres statistiques, il est important de s'assurer que la discrimination des groupes n'est pas le fruit du hasard. Les modèles doivent donc être validés.

Trois tests sont utilisés :

- La validation croisée, qui consiste à scinder les jeux de données en deux groupes. Ainsi 2/3 du jeu de données sert à établir un modèle de base descriptif tandis que l'autre tiers sert de groupe de validation. Ce deuxième groupe ne participe pas au calcul du modèle, mais sert à la validation et à l'estimation de la qualité de prédiction. Les paramètres R^2 et Q^2 permettront de rendre compte de la capacité explicative et de la qualité du modèle.
- Un test de permutation qui consiste à réaffecter aléatoirement les individus dans les groupes afin de vérifier que le modèle n'est pas dû au hasard. Ce test s'applique uniquement aux modèles supervisés qui incluent une variable qualitative Y (ex : variable de groupe).

La CV-ANOVA ou cross-validation ANOVA, basée sur un test F où sa signification est elle-même liée à l'hypothèse nulle que les résidus de deux modèles sont identiques. Elle s'applique uniquement à des modèles supervisés. La CV-ANOVA consiste tout d'abord à effectuer un (ou des) test(s) de permutation pour le(s)quel(s) une (des) valeur(s) de résidus E est (sont) calculé (résidu = part de la variance non expliquée par le modèle). Puis une ANOVA est réalisée entre la valeur E du modèle de base et les valeurs E des modèles permutés. Dans le cas où le modèle de base est robuste, la valeur E du modèle de base doit être significativement différente de celles des modèles permutés. L'hypothèse nulle de départ est donc rejetée et la valeur de probabilité P de la CV-ANOVA est faible. On fixe un seuil α de 0.05.

Analyse statistiques complémentaires

Nous avons utilisé des procédures de classification hiérarchique ascendante pour étudier certains regroupements de variables, soit à l'aide du module présent dans le logiciel SIMCA, soit en utilisant le logiciel permutmatrix

(<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/EN/index.html>) qui permet en plus une représentation en code couleur des données (« heatmap »). Pour ces analyses, nous avons utilisé soit la méthode de Ward de sériation, soit la méthode de McQuitty WGPGMA.

Certains regroupements de variables ont été également modélisés en utilisant des procédures de PLS hiérarchique. Ce mode d'analyse permet à l'aide d'une ACP ou d'une analyse PLS de réduire les valeurs de nombreuses variables appartenant à différents ensembles en autant de scores composites que d'ensembles. On utilise alors ces scores pour réaliser d'autres PLS ou des analyses de statistiques univariés de type ANOVA, dans lesquels les variables ne sont plus les variables initiales mais les scores composites représentant les ensembles de variables. Nous avons utilisé cette procédure pour calculer un nouvel indice d'acides gras prédicteurs des taux de DHA dans le cerveau, et également pour visualiser de façon simple la signature lipidomique des différents régimes dans le cerveau.

Afin d'identifier les variables les plus pertinentes pour l'exploitation biologique, nous avons également mis en œuvre une procédure multimode de sélection de variables qui est détaillée dans le « Material » de l'article présenté dans cette thèse.

**D
I
S
C
U
S
S
I
O
N
S**

**R
E
S
U
L
T
A
T
I
O
N
S**

Résultats et discussions

Ce travail de thèse s'inscrit dans un protocole plus large d'évaluation de l'influence d'une alimentation riche ou pauvre en omega-3 pendant les périodes de gestation / lactation puis en post-sevrage. Les mesures ont porté sur les paramètres lipidomiques et métabolomiques des petits issus de ces différentes conditions appliquées à la mère. Ce protocole comporte 10 conditions de régimes différents pour les petits après sevrage. Ces petits étaient issus de 3 groupes de mères ayant reçu un régime pauvre ou différemment enrichi en oméga3 sous la forme exclusive du précurseur (ALA).

L'objectif premier, rapporté dans cette thèse, était d'évaluer la capacité de restauration de différentes matières grasses de sources différentes, végétales et laitières, comportant des compléments en omega3 chez des rats carencés issus de mères recevant l'un des régimes très appauvri en ALA.

Des échantillons de cerveau, de globules rouges et de plasma ont été prélevés chez chaque individu. L'ensemble des analyses chez tous les individus a déjà été réalisé, à l'exception des analyses métabolomiques qui sont programmées prochainement.

Le reste du travail auquel j'ai participé est en cours d'exploitation.

1. Analyse de profils d'acides gras dans différents tissus

Quatre groupes de 10 rats mâles et quatre groupes de 10 rats femelles, issus de mères déficientes en ALA, ont reçu les régimes suivants : régime P1, à base d'huile de palme et d'un mélange tournesol/colza, apportant 1,5% ALA ; régime P2, identique à P1 mais apportant en plus 0.4% ARA et 0.12% DHA préformés ; régime B1, à base de matière grasse laitière de printemps et d'un mélange colza/tournesol pour accroître l'ALA à 1,5% ; régime B2, à base de MGLA et d'un mélange colza tournesol pour amener l'ALA à 2.3% des acides gras totaux ; le rapport n-6/n-3 était d'environ 10 pour P1, P2 et B1, et de 5.7 pour B2.

Les résultats de ce protocole ont fait l'objet d'un article actuellement en cours de soumission à *The Journal of Nutritional Biochemistry*

1.1. Article "Dairy fat blends enriched in α -linolenic acid are more efficient than n-3 fatty acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brain of neonate rats".

Dairy fat blends enriched in α -linolenic acid are more efficient than n-3 fatty acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brain of neonate rats.

Qin Du^{1,4}, Jean-Charles Martin¹, Genevieve Agnani², Nicole Pages², Pascale Leruyet³, Daniel Gripois², Pierre Carayon⁴, Bernadette Delplanque²

¹ INRA, UMR1260 «Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques», Plateau BioMeT, Marseille, F-13385 France; Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine Timone, Marseille, F-13385 France.

² UMR 8195 CNPS « Centre de Neurosciences Paris-Sud », NMPA « *Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire* », Université Paris-Sud XI, Orsay, F- 91405 France.

³LACTALIS, LRD, Retiers, F-35240 France.

⁴Hopital de La Timone, Service of Biochemistry and Molecular Biology, Marseille, F-13005 France

Running title: Dairy fat improves α -linolenic acid conversion to DHA

Address correspondence to

Jean-Charles Martin, INRA, UMR1260 «Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques», Marseille, F-13385 France; Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine Timone, Marseille, F-13385 France.

Tel: +33 491 294 094, Fax: +33 491 782 101, jean-charles.martin@univmed.fr

Abbreviations: DHA: docosahexaenoic acid, ARA: arachidonic acid, ALA: alpha-linolenic acid, LA: linoleic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid, PUFA: polyunsaturated fatty acids, VLC-PUFA: very long chain polyunsaturated fatty acids, FAME: fatty acid methyl esters, HUFA: unsaturated fatty acids, SCD1: stearyl-coA desaturase 1, ELOVL2: elongase of long-chain fatty acids 2, FADS1: fatty acid desaturase 1, FADS2: fatty acid desaturase 2, CNS: central nervous system, RBC: red blood cell, FA: fatty acid, GC: gas chromatography, FID: flame ionization detector, PCA: principal component analysis, OPLS-DA: partial least-squares discriminant analysis, VIP: variable importance index, OPLS: orthogonal partial least-squares

Abstract

Achieving an appropriate docosahexaenoate (DHA) status in the neonatal brain is an important goal of neonatal nutrition. We evaluated how different dietary fat matrices improved DHA content in the brains of both male and female rats. Forty rats of each gender were born from dams fed over gestation and lactation with a low α -linolenic acid diet (0.4% of fatty acids) and subjected for 6 weeks after weaning to a palm oil blend-based diet (10% by weight) that provided either 1.5% ALA or 1.5% ALA and 0.12% DHA with 0.4% arachidonic acid (ARA) or to an anhydrous dairy fat blend that provided 1.5% or 2.3% ALA. Fatty acids in the plasma, red blood cells (RBC) and whole brain were determined by gas-chromatography. 1.5% ALA dairy fat was superior to both 1.5% ALA palm-oil blends for increasing brain DHA (14.4% increase, $P < 0.05$), and the 2.3% ALA dairy blend exhibited a further increase that could be ascribed to both an ALA increase and n-6/n-3 ratio decrease. Females had significantly higher brain DHA due to a gender-to-diet interaction, with dairy fats smoothing the gender effect. Brain DHA was predicted with better accuracy when using a combination of both plasma and RBC fatty acids (R^2 of 0.6) than any individual fatty acid (R^2 0.47 for RBC n-3 docosapentaenoate at best). In conclusion, dairy fat blends enriched with ALA appear to be an interesting strategy for achieving optimal DHA levels in the brains of post-weaning rats. Human applications are worth considering.

Key words: dairy fat, palm oil, α -linolenic acid, brain, docosahexaenoic acid, rat neonates

Introduction

Docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) and arachidonic acid (AA; 20:4n-6) are highly concentrated in mammalian nervous and visual systems. There is an increased demand for n-3 LC-PUFA, particularly DHA, to support optimal visual and cognitive development in infants during fetal life and newborn nursing [1-9](Jensen 1989; Koletzko et al. 1997; Koletzko et al. 1998; Hoffman 2000; Uauy 2000; Innis 2001; Malcolm et al. 2003; Simmer and Patole 2004; Innis 2005). Linoleic acid (LA; 18:2n-6) and β -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) are the precursors of LCn-6 and n-3, respectively. Although they can be synthesized from their respective precursor fatty acids [10-13], and, although it has been shown that supplementation with ALA or DHA leads to the same LC-PUFA accretion in maternal, fetal and newborn brains [14], synthesis (especially DHA synthesis) could be insufficient to cover growth needs [15-18]. Therefore, it may be necessary to increase the dietary intake of DHA and/or increase the synthetic capacity for metabolizing ALA to DHA in mothers and newborns.

Infant formulas have been gradually replacing mother's milk for more than 50 years and, at least in Europe and the United States, are usually prepared with vegetable oils. The compositions of these formulas are controlled in terms of fat composition for most fatty acids and especially essential FA (CEE rules) [19]. Furthermore, in a recent attempt to mimic the composition of mother's milk as close as possible [20-22], long chains n-3 and n-6 (DHA and ARA) have been added.

In Asia, infant formulas are prepared with dairy fat, which, to some extent, is less different from breast milk for some components that are not present in vegetable fat formulas (i.e., cholesterol and short-chain FA). For example, the short- or medium-chain fatty acids in milk fat are more efficiently absorbed and might be beneficial for health. However, the use of dairy fat for infant formulas is still a matter of debate in various countries.

In an attempt to validate the potential replacement of the palm fraction of the vegetable fats with dairy fat in infant formulas, we used the rat as a nutritional model to compare the effects of blends based on dairy fat instead of palm oil, which provide the same quantities of essential FA, on brain FA. The levels of ALA and LA in these experimental diets followed the recommended and commonly used values in most commercial vegetable infant formulas. For this purpose, sunflower and rapeseed oils were added to maintain the levels of ALA (1.5%) and LA (16%) and the n-6/n-3 ratio within the recommended values [23, 24].

Because human milk contains DHA (0.2-0.4%) and ARA (0.4-0.8%), it has been proposed that formulas that replace breast-feeding should be supplemented with these LC n-3 FA. Therefore, we also compared the previous dairy and palm blends to a classical ALA-

enriched (1.5%) palm blend with DHA and ARA levels similar to those used in infant formulas (0.12% and 0.40% of FA).

Finally, we evaluated the potential of a dairy fat blend enriched in ALA (2.3%) by increasing only the rapeseed oil component, such that the increase of ALA could be associated with a reduction in the n-6/n-3 ratio (5.7 instead of 10), which is now recommended and considered to be beneficial for facilitating an increase in the specific bioconversion to LCn-3 and DHA. Each of these modifications agrees with the recommended EEC rules) [19].

In the present work, we compared the effects of different butter-ALA enriched blends and palm-ALA regular blends (with or without supplementation with LCn-3) on the restoration of the fatty acid profiles of brains from ALA-deficient post-weaning rats. We also determined the potential of rat plasma and RBC FA which are also reasonably accessible in human newborns, to predict brain DHA levels.

Materials and methods

Animals and experimental design. The protocol was conducted following the Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and approved by the local ethics committee. Rats were housed in our animal facility under controlled conditions for light (lights on from 8:00 AM-8:00 PM), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and hygrometry (55-60%). They received a semi-synthetic diet (table) and water ad libitum. The restoration of n-3 FA was studied using different blends of lipids in the first generation of post-weaning rats (males and females) deficient in n-3, born from ALA-poor dams. For this purpose, female Wistar rats (6 weeks of age fed with a chow diet) were fed a 5% fat (w/w) semi-synthetic diet for 6 weeks (before mating and during gestation and lactation) with reduced n-3 fatty acid levels (ALA 0.4% of FA) obtained with a palm/soya (97/3) oil blend. They were mated for a period of 7 days (1 male + 1 female per cage). After weaning for 4 weeks, young pups (females and males, n=10 each) from ALA-poor dams received a 10% fat (w/w) diet for 6 weeks. Two groups received diets including rapeseed and sunflower oils to provide identical ALA (1.5% of FA) and linoleic acid (13% to 16% of FA) levels, respectively, blended with palm oil (P1) or butter (B1) made from summer milk. Group P2 received a palm diet similar to P1 with supplementation of DHA and ARA (0.12% and 0.4% of FA, respectively). Group B2 received a butter diet similar to B1 that included an increased proportion of rapeseed oil to provide higher ALA levels (2.3% of FA). The diet preparations were performed by SAFE (France).

Dietary fatty acid compositions. The compositions of the diets and the n-3 fatty acid contents of the dietary fats are provided in Table 1. The semi-synthetic diets, provided by Safe (F-89290 Augy), contain lipids (10%), casein (22%), corn-starch (41%), sucrose (20%), cellulose (2%), minerals '205B SAFE' (4%), vitamins '200 SAFE' (1%), and methionine (DL) (0.16%).

Tissue collection. Young pups (10 weeks old) were killed by decapitation between 8.00 AM h and 11.00 in a non-fasting state. The blood was collected on heparin (10 IU/ml) cooled on ice, and plasma was separated by 20-min centrifugation (3500 t/mn at 4°C) from red blood cells (RBC) that were rinsed with saline solution (NaCl 0.9%). The brain was promptly removed, placed on an ice-cooled watch glass, rinsed with cold saline solution (NaCl 0.9%) and weighed. Tissues were immediately immersed in liquid nitrogen. The plasma, RBC and brains were stored at -80°C for later analysis.

Lipid extraction and fatty acid derivatization into methyl esters.

Brain lipid extraction. Half of one brain was weighed and lyophilized. The lyophilized half-brain was pulverized using a motorized potter for homogenization. A dry weight corresponding to 65 mg of fresh tissue was rehydrated to 80% and extracted with 1.5 ml of hexane/iso-propanol (3/2, v/v) using a protocol from Schwarz E et al. [25]. After centrifugation (9500 g, 10 min., 4°C), the upper phase (hexane) was recovered and evaporated to dryness under nitrogen. The dry residue was stored under a nitrogen atmosphere at -80°C before fatty acid derivatization.

Red blood cell lipid extraction. Red blood cell lipids were extracted with 1.5 ml of hexane/iso-propanol (3/2, v/v) using a protocol from Schwarz E et al. [25]. After centrifugation (9500 g, 10 min., 4°C), the upper phase (hexane) was recovered and evaporated to dryness under nitrogen. The dry residue was stored under a nitrogen atmosphere at -80°C before derivatization of the component fatty acids into methyl esters.

Derivatization in FAME. Stock solutions of the reagents used in the method of Lepage and Roy [26] were prepared just prior to each experiment. For each brain and red blood cell lipid extraction sample, 1.9 ml of stock solution (1.8 ml of methanol and 100 µl of acetyl chloride) were freshly prepared and added to the dry residue. For plasma, 250 µl of plasma and 1.9 ml of the stock solution were combined in screw-capped glass tubes. The tubes were capped and heated at 100°C for 60 min. The tubes were allowed to cool at room temperature. Hexane (1 ml) was added to the brain and RBC samples (distilled water was added elsewhere), and the tubes were vortexed for 30 s. The upper organic phase was collected with a Pasteur pipette. This extraction procedure was repeated to optimize lipid extraction. The combined

hexane solutions were dried under a stream of nitrogen, and the dry residue was then re-dissolved in 80 μ l (RBC sample), 100 μ l (plasma sample) or 200 μ l (brain sample) of hexane, transferred to GC vials, and capped under nitrogen.

Fatty acid analysis by fast gas chromatography (fast GC). The analysis by fast GC was performed on a 0.5- μ l sample injected in split mode with a hydrogen flow rate of 10 ml/min. The column was a capillary column (BP \times 70, 10 m \times 0.1 mm ID \times 0.2 μ m film thickness) (SGE International Pty. Ltd. Australia). The temperature program was as follows: initial, 60 $^{\circ}$ C with a 0.5-min hold; ramp, 20 $^{\circ}$ C/min to 200 $^{\circ}$ C, 7 $^{\circ}$ C/min to 225 $^{\circ}$ C with a 1-min hold, and then 160 $^{\circ}$ C/min to 250 $^{\circ}$ C with a 1-min hold. The instrumental conditions were as follows: The carrier gas was H₂ at a flow rate of 61.4 cm/s and a constant head pressure of 206.8 kPa; FID was set at 280 $^{\circ}$ C; the air and nitrogen make-up gas flow rates were 450 ml/min and 45 ml/min, respectively; the injector split ratio was 200:1; the detector sampling frequency was 50 Hz; the autosampler injections had a volume of 0.5 μ l; and the run time for a single sample was 13.23 min with a sample injection-to-injection time of 16 min.

RNA extraction and gene expression. Total RNA from the liver was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was determined spectrophotometrically. For DNA synthesis, reverse transcription was performed with Superscript II (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR was performed on cDNA, as described previously, using Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) and the SYBR Green Master mix kit (Eurogentec, Philadelphia, PA, USA). The values were expressed as ratios of RNA levels relative to one control rat (diets with a 1.5%-ALA palm-blend) using $\Delta\Delta$ (Ct) in duplicate [27]. The mRNA levels of Δ 5 desaturase (NM_053445), Δ 6 desaturase (NM_031344), Δ 9 desaturase (NM_139192), and elongase 2 (NM_001109118) were measured (see primer sequences in supplemental Table 1).

Statistical analysis. All multivariate data analyses and modeling were performed using Simca-P12 software (Umetrics, Umeå, Sweden). ANOVA were executed using Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Principal component analysis (PCA) was used to study the model overview and trends. In this study, multi-criteria assessment [28] for multivariate statistics was used to identify fatty acid biomarkers across groups. To further study the specific effects of gender and diet on the brain, red blood cells and plasma fatty acids, an orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was used. An orthogonal calculation filters out variations in the X-variables that are uncorrelated to the Y-variable. This makes the orthogonally treated data more precise and easier to interpret. The S-

plot method that combines the contribution/covariance [p1] and the reliability/correlation [p(corr)1] from the OPLS-DA model was used to select statistically significant fatty acids based on the differences between groups [29]. The loading plot with jack-knifed confidence intervals (99% CI) displayed the uncertainty of each variable, and the smaller span of the confidence interval gives more credibility to the selected variable. The variables with jack-knifed confidence intervals across zero were excluded [28]. The VIP (variable importance index) value reflecting the influence of each fatty acid on the classification was used as an additional selection criterion (VIP value ≥ 1). The variables meeting all three criteria (i.e. VIP > 1 , $|pCorr(1)| > 0.50$, and the exclusion of zero from the span of jack-knifed confidence intervals) were selected as potential biomarkers across the different groups.

The changes in brain fatty acids after the dietary challenge were additionally explored with Cytoscape 2.7 (<http://www.cytoscape.org/>) [30], which visualizes the complex interactions among fatty acids. The brain fatty acids in the rats were also displayed using a heat map generated by PermutMatrix 1.9.3 (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/>). The relationship between RBC and plasma fatty acids and brain DHA and the identification of the brain DHA biomarkers were analyzed by the orthogonal partial least-squares (OPLS) regression method.

Whenever necessary, an ANOVA and multiple regression analysis were performed using Statview (SAS institute Inc., NC, USA). An α -risk of 0.05 was the significance statistical threshold used for these tests. Statistically relevant results and uncertainty estimates obtained with OPLS were also calculated using the jack-knife method (a re-sampling method) with 99% confidence intervals [31]. Finally, we also used a multi-block OPLS procedure [32] to first determine the influence of diet or gender on the fatty acid profile in the brain, RBC or plasma and then calculate a composite latent variable from a selection of the fatty acids found in either RBC or plasma that best predicts brain DHA (selection from the OPLS results) to be used as a brain DHA predictor. A model validation that checks for over-fitting is presented in the supplemental material.

Results

Model overview and trends

Principal component analysis (PCA) was used as an unsupervised statistical method to study the differences in brain, plasma and red blood cell fatty acids in male and female rats fed with four different diets. The diet and gender effects can be decomposed along the first and second components, respectively (Figure 1). The butter-based-diet-fed rats clustered

along the right side of the first component, whereas the palm oil-based-diet-fed rats clustered on the left side. Similarly, females were virtually all located above the shaft, while males were below. The diet effect appeared more substantial (34% of the variance) than the gender effect (20%) in explaining the differences in the FA profiles in various tissues. Hierarchical principal component analysis on the FA profiles in the brain, red blood cells and plasma indicated that brain is the least sensitive to the diet and gender effects (supplemental data, Figure 1).

Gender effects analysis

To further emphasize the differences between the females and the males regardless of diet, a supervised OPLS-DA (orthogonal partial least-square discriminant analysis) procedure was used. This analysis allows the testing of whether individuals belong to a predefined class (gender) based on their biological signatures (their fatty acid profiles) and determination of which individual variables (the individual fatty acids in the profile) drive class assignment. Figure 2A emphasizes the gender differences in the brain, plasma and RBC. The first component discriminates the inter-group differences (gender), and the second orthogonal component determines the intra-group variation. The female group can be clearly separated from the male group based on the first component, and validation tests indicated that no overfitting occurred (see supplemental data). The discriminant analysis indicated that the difference between males and females depended on specific fatty acid changes that enabled class assignment (e.g. male or female) for most rats (Figure 2A). Statistically significant fatty acids based on the differences between males and females were selected by crossing the visual results of the S-plot (Figure 2B), the loading *p*-values of each fatty acid with statistical levels determined by the jack-knifed 99% confidence intervals (Figure 2C), and the variable importance values determined by the SIMCA software (VIP values >1 with confidence intervals over 95% after jack-knifing). In Figure 2B, the relevant variables satisfying our selection criteria are marked with a red square and were considered to be the biomarker fatty acids distinguishing males and females. Compared to male rats, female rats have increased 18:0 (stearic acid, +36.8% in RBC and 72.4% in plasma), 20:4n-6 (arachidonic acid, 57.7% in plasma), and 22:6n-3 (docosahexaenoic, 35.6% increase in plasma) and, conversely, decreased 16:0 (palmitic acid, 15.2% in RBC and 13.8% plasma) and delta-9 desaturated fatty acids (16:1n-7, palmitoleic, 51.5% in plasma, 18:1n-9, oleic acid, 16.2% in plasma, and cis-vaccenic acid 18:1n-7, 32.7% in plasma and 62.2% in RBC). It is interesting to note that no

differences were observed for brain DHA between males and females when correcting for the influence of diet (supplemental data, Table 2).

Analysis of dietary effects

In addition to gender, the dietary component of the fatty acid changes across various tissues was examined by a similar OPLS-DA modeling technique (Figure 3). Significant dietary group differences were observed in both female and male rats. The distances among the four dietary groups in the two-dimensional plot allowed the evaluation of dietary effects on the fatty acid profiles of various organs. For instance, compared with the 1.5%-ALA palm-blend diet (P1), the DHA- and AA-supplemented 1.5%-ALA palm-blend diet (P2) induced the fewest fatty acid changes than the two anhydrous butter diets (B1 and B2), with the 2.3%-ALA butter-blend diet (B2) inducing the greatest variation. Furthermore, the fatty acid signatures of the rats that were fed the two kinds of anhydrous butter (B1 and B2) could be distinguished from the rats that had received the palm oil based diets with or without DHA and AA (P2 and P1) by their first principal components. Moreover, a DHA gradient in the brain was observed, with lower values observed in the P1 (11.8%) and P2 diets (12.9%), higher values seen in the B1 diet (13.4%) and the highest values seen in B2 diet (14.2%) (supplemental data, Table 3).

We then performed pair-wise OPLS-DA comparisons to pinpoint the main dietary effects on the fatty acid profiles. In each of the following OPLS-DA plots, the first component represents the dietary effect, and the second orthogonal component represents the gender effect. Validation tests for all the following models were performed and found no over-fitting (see supplemental data).

The 1.5%-ALA butter-blend-diet-fed (B1) rats could be differentiated from the corresponding 1.5%-ALA palm-blend-diet-fed (P1) rats based on the first component (Figure 4A) (Fisher P -value = 1.8×10^{-9} and CV-ANOVA P -value = 1.6×10^{-14}). Interestingly, the distance between males and females in B1 was substantially smaller than in P1, indicating a lower gender effect in B1 diet-fed rats than in P1 diet-fed rats. The two diets induced differences in the tissue fatty acids in the first component that enabled 100% class assignment (Figure 4A) (Fisher P -value = 1.8×10^{-9} and CV-ANOVA P -value = 1.6×10^{-14}). The S-plot procedure identified eight fatty acids that were highly responsive to the dietary challenge (summarized in supplemental data, Table 4) (Figure 4B). Compared to 1.5%-ALA palm-blend diet, the 1.5%-ALA butter-blend diet increased ($P < 0.0001$) the brain DHA by 14.4% ($P < 0.0001$) with a commensurate 13.8% decrease of n-6 brain DPA ($P < 0.0001$) and

increased the RBC DPA n-3 by 31.3%. The butter-based diet also increased myristic acid compared to the palm oil blend (218.2% and 140.0% in the plasma and RBC, respectively).

The OPLS-DA model clearly separated the 1.5% butter-blend diet (B1) from the 2.3% ALA butter-blend diet (B2) (Figure 5A) (Fisher P value = 8.6×10^{-10} and CV-ANOVA P value = $6,9467 \times 10^{-11}$). The S-plot (Figure 5B) shows the extent to which each fatty acid is either over- or underrepresented in the rats fed with the two anhydrous butter diets (B1 and B2). The fatty acids in the bottom-left area were increased, and the ones in the upper-right area were decreased by the anhydrous butter diet with greater ALA levels (B2). Twelve fatty acids appeared to be significantly affected and are summarized in supplementary Table 5. For instance, compared to the 1.5%-ALA butter-blend diet (B1), the 2.3%-ALA butter-blend diet (B2) increased the brain DHA by 5.4% ($P < 0.0001$), along with EPA in plasma (100.7%) and RBC (121.3%) ($P < 0.0001$), and decreased the n-6 DPA in the brain (33.7%), RBC (50.0%), and plasma (62.2%) ($P < 0.0001$).

The distances between the rats fed the palm-oil diet augmented with DHA and ARA (P2) and the rats fed the palm-oil-blend diet without DHA and ARA (P1) were significantly different. (Figure 6A) (Fisher P -value = 1.8×10^{-9} and CV-ANOVA P -value = 1.6×10^{-14}). In the S-plot, the fatty acids in the bottom-left area of Figure 6B were decreased and the ones in upper-right area were increased by the P2 diet. Four fatty acids appeared to be especially modified by the dietary treatments (Figure 6B and supplementary Table 6). Namely, the 1.5%-ALA palm blend supplemented with DHA and ARA increased brain DHA by 9.7% and plasma 18:1n-9 by 15.8%. In turn, this was accompanied by a decrease in both RBC and plasma DPA n-6 (17.4% and 17%, $P < 0.0001$ respectively) despite the increased uptake of the parent ARA.

To analyze the relationships among the various fatty acids in the brain after our dietary treatments, we performed a pair-wise correlation analysis of the brain fatty acids and displayed the correlation matrix as an interactive relationship network (Figure 7A). This was transformed into a heat map showing the content of each of the fatty acid displayed in the network across the dietary treatments (Figure 7B). Under our stringent conditions (Pearson correlation coefficient over or equal to .5), 18 of the 19 FA demonstrated strong pair-wise relationships (Figure 7A). In the brain, 22:6n-3 (DHA) and 24:1n-9 correlated with the greatest number of other fatty acids (7 neighbors each with 3 in common). Thus, they appeared to be important hubs in the determination of the relative fatty acids in the brain. They were also found to be negatively associated (Figure 7A and 7B). Interestingly, 17:0, a marker of milk-fat intake that is increased by present dairy-based diets (Figure 7B), was also

found to be positively associated with all long-chain n-3 PUFA. In that instance, the DHA content in the brain was significantly increased by both butter diets compared to the palm oil diets. Furthermore, other n-3 PUFA, such as 22:5n-3 (DPAn-3) and 20:5n-3 (EPA), were positively correlated with DHA and negatively correlated with very-long-chain n-6 fatty acids (primarily DPA [22:5-6] and secondarily DTA [22:4n-6]). Both 24:1n-9 and 22:5n-6 were decreased in the butter diets compared to the palm diets.

Prediction of brain DHA by the fatty acids in RBC and plasma

Next, we intended to use the fatty acid profiles in RBC and plasma to predict brain DHA levels under our dietary conditions. Using an OPLS regression, we selected the most predictive fatty acids in RBC and plasma to explain brain DHA content (VIP criteria of the OPLS procedure > 1 at a 95% confidence interval). These were RBC DPAn-3, EPA, 20:3n-6, ALA, DPAn-6, and LA and plasma ALA, EPA, DPAn-3, DPAn-6. The 10 predictive fatty acid values were then reduced to a single composite variable (hierarchical PLS, see methods). We then compared the regression coefficient (against brain DHA) obtained with the composite variable made with 10 individual fatty acids to that obtained with 22:5n-3 in RBC, which was the best brain DHA predictor in our study. The non-linear prediction index R^2 is indicated regardless of whether when 22:5n-3 (Figure 8A) or the composite latent variable (Figure 8B) was used. We improved the prediction index from 0.4777 obtained with 22:5n-3 to 0.60 obtained with the composite latent variable.

Gene expression analysis

Finally, to explain the impact of the various diets on the fatty acid profiles, we measured the gene expression of fatty-acid-metabolizing enzymes in the liver, such as the delta 6 desaturase (FADS1), the delta 5 desaturase FADS2), the delta 9 desaturase (SCD1), and the very-long-fatty-acid elongase, ELOVL2. The corresponding enzyme activity ratios calculated from the product/precursor fatty acid ratios were used to check for phenotypic expression. The plasma 18:1n-9/18:0, 16:1n-7/16:0, 22:5n-6/20:4n-6 and 22:5n-3/20:5n-3 ratios were plotted against the expressions of their respective liver enzyme mRNA (Figure 9A, B, C, D). There was a significant correlation between the plasma 16:1n-7/16:0 ratio and Δ -9 desaturase (SCD1) expression ($R^2=0.39$, $P < 0.001$) and plasma 22:5n-6/20:4n-6 and elongase (ELOVL2) ($R^2=0.41$, $P < 0.001$) (Figure 9B and 9C). Thus, the higher expression of SCD1 and ELOVL2, the higher the resulting 16:1n-7 and 22:5n-6 products from their 16:0 and 20:4n-6 precursors, respectively. The relationship between the plasma 18:1n-9/18:0 ratio and

Δ -9 desaturase (SCD1) expression was weaker ($R^2=0.20$, $P = 0.002$), and no correlation was seen between the plasma 22:5n-3/20:5n-3 ratio and ELOVL2 expression ($R^2=0.08$, n.s.) (Figure 10A, D).

Discussion

This study investigates the ability of dairy-fat-based diets to modulate the tissue fatty acid profiles in young rats (with an emphasis on brain DHA) by a comparison to corresponding vegetable saturated-fat-based diets. ALA deficiency over both gestation and lactation in the dams was achieved by feeding a palm-oil-blend-based diet (0.4% ALA), and the rat pups were then switched at weaning to either a palm-oil-blend diet (P1) or a butter diet (B1) supplemented with sunflower and rapeseed oils to maintain 16% LA and 1.5% ALA. Two other diets were tested: 1.5%-ALA palm diet supplemented with 0.12% DHA and 0.4% ARA (P2) and a 2.3 %-ALA butter diet (B2). This latter was obtained by selectively increasing the rapeseed oil in the blend, which induced a further decrease in the n-6/n-3 ratio from 10 to 5.7.

The main finding of our study is that an anhydrous dairy-fat-based diet with 1.5% ALA is more efficient than a palm oil blend with as much ALA and 0.12% added DHA for increasing brain DHA levels in post-weaning rats. In addition, both anhydrous dairy fat blends optimized brain DHA levels were more than pure vegetable fat blends. The further increase in brain DHA levels observed with the 2.3%-ALA enriched-butter diet compared to the 1.5%-ALA butter diet could be attributed to both the increased level of dietary ALA and the concomitant decrease in the n-6/n-3 ratio induced by the selective enrichment of the blend with rapeseed oil. The n-6 to n-3 ratio has been recognized as an important factor driving the bioconversion of ALA into DHA because of the competition between the parent n-3 and n-6 fatty acids for the desaturation and elongation pathways. This could explain, at least part of the increase in brain DHA levels observed in the 2.3% ALA enriched dairy-fat diet. Together, these observations strongly advocate for a reevaluation of the use of dairy fats in infant formulas.

The other possibility would be that the various diets caused selective desaturase and elongase gene activation. We were unable to find such relationship that could explain at least part of the fatty acid variation in the tissues that we examined, except for SCD1 and its monounsaturated products. In this latter instance, the results obtained with palmitoleic acid were better than those obtained with oleic acid, due to the confounding effect of the substantial amount of exogenous dietary oleic acid mixing with the *de novo* occurring oleic

acid. In contrast, tissue palmitoleate relies mainly on endogenous synthesis (Paillard et al. 2008). Thus, mechanisms operating post-translationally on the desaturation pathways are more important for governing VLC-PUFA tissue accretion than direct effects on the desaturase and elongase gene expression system, as observed by others [34]. In that respect, the dairy fats differed from the plant oils in their content of short- and medium-chain fatty acids. ALA is one of the best β -oxidation substrates [35], whose activity can prevent its conversion into VLC-PUFA. Short-chain fatty acids, such as those found in dairy fats, are also highly oxidized after absorption [36, 37], may thereby spare ALA from oxidation, and favor ALA partitioning towards the desaturation and elongation pathways. The possible sparing of ALA from β -oxidation by short-chain and possibly medium-chain fatty acids [38] is a plausible explanation for our observation that better bioconversion of ALA into DHA is obtained with the dairy fat blend B1 and the corresponding palm oil blend P1. Both have as much as ALA (1.5%) with the same n-6/n-3 ratio. Recently similar results were obtained in the rat receiving a butter diet compared to SFA rich or MUFA rich diets [39]. However, this needs to be precisely addressed and deserves careful examination.

In our dietary conditions, the brain fatty acid profiles appeared to be more protected against environmental influences (such as nutritional changes) than red blood cells or plasma. This also holds true for gender influences. This appears to be an illustration of tighter control of membrane lipid fatty acids to preserve optimal brain function. Nonetheless, as observed by others [40, 41], changes in tissue fatty acid levels due to both dietary and gender influences occurred even in the brain. In fact, when excluding the influence of diet, our model predicted that brain DHA is not influenced by gender *per se*. Only a gender/diet interaction can reveal the differences between males and females that drive brain DHA variations. Likewise, we found that the butter-based diets smoothed the gender influence to a greater extent than the palm-oil-based diets. The brain DHA levels were lower in males than in females in palm-oil-based diet P1 (11.0% vs. 12.6%) but comparable in males and females in the counterpart diet P2 that provided both preformed DHA and ARA (12.91% vs. 12.88%). This observation also strongly supports that a specific gender effect should be considered in the design of infant formula because of a possible gender/diet interaction effect.

A great deal of concern in infant nutrition focuses on specific biomarker fatty acids that can be easily accessed and used as surrogates for brain DHA status [42]. For this purpose, RBC n-3 docosapentaenoic acid (DPA) was found to be the most reliable indicator in our study. Some have found that RBC DHA is best for predicting brain DHA [43, 44], whereas others obtained poor prediction with that fatty acid, similar to our study [45]. Since no single

fatty acid varies independently of the others, we investigated the interdependence of brain DHA and the other fatty acids measured in the plasma and RBC. Our goal was to reveal a fatty acid signature in peripheral tissues that could predict the DHA content in neuronal tissues better than any single fatty acid. Using a multivariate selection procedure (OPLS), we found 10 fatty acids in the plasma and red blood cells that, together, can serve as markers of DHA accretion in the brain. The composite variable calculated from these 10 fatty acids improved prediction compared to red blood cell n-3 DPA, which we had found to be the most strongly associated with brain DHA. We also compared the predictive performance of our composite index to the HUFA index of Stark et al [46] and found that our composite index was still better ($R^2 = 0.54$ calculated from RBC-FA and 0.41 calculated from plasma-FA, whereas our result was 0.60). Due to the contradictory results found across the literature in finding a reliable and universal biomarker of brain DHA, the strategy of using a composite biomarker could be an interesting alternative but, at this stage, still requires validation in other models.

The interaction network displaying the interactions among the brain fatty acids further underlines the role of DHA as an important player for the general determination of membrane fatty acid composition. The central positions of AHA and nervonic acid (24:1n-9) in the interaction network suggest that any conditions that change their content in brain membranes would affect the overall fatty acid profile and, thus, neuronal function.

In conclusion, our study demonstrates that a dairy-fat-based diet providing as little as 1.5% ALA is considerably superior to a palm oil analog for improving VLC-PUFA and especially DHA in the brain of post-weaning rats whose mothers were fed an ALA-poor diet during pregnancy and lactation. In that context, an increase to 2.3% ALA in the dairy-fat-based diet reduced the n-6/n-3 ratio by half and still improved brain DHA. In addition, with respect to this endpoint, the butter-based diets reduced the gender effect more than the palm oil blends. Since the efficiency of nutritional strategies that improve DHA content in the brain cannot be directly evaluated in humans, our approach of measuring a composite fatty acid signature in easily accessible tissues (plasma and RBC) to predict brain DHA levels could be an interesting alternative than using a single fatty acid indicator, but this warrants further validation. We believe that our findings are worth considering in a human perspective.

Acknowledgements

This study was partly funded by the Lactalis Group, France. Qin Du is a recipient of an Assistance Publique Hôpitaux de Marseille fellowship.

Literature cited

- [1] Jensen RG. Lipids in human milk composition and fat soluble vitamins. In: Lebenthal E, ed Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy 2nd edn. 1989;New York: Raven Press:157-208.
- [2] Koletzko B, Demmelmair H, Socha P. Nutritional support of infants and children: supply and metabolism of lipids. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1998;12:671-96.
- [3] Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta.* 2005;26 Suppl A:S70-5.
- [4] Innis SM, Gilley J, Werker J. Are human milk long-chain polyunsaturated fatty acids related to visual and neural development in breast-fed term infants? *J Pediatr.* 2001;139:532-8.
- [5] Malcolm CA, McCulloch DL, Montgomery C, Shepherd A, Weaver LT. Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88:F383-90.
- [6] Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Uauy R, Castaneda YS, Lopus MG, et al. Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:540-53.
- [7] Simmer K, Patole S. Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004:CD000375.
- [8] Uauy R, Mize CE, Castillo-Duran C. Fat intake during childhood: metabolic responses and effects on growth. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1354S-60S.
- [9] Koletzko B, Tsang R, Zlotkin SH, Nichols B, Hansen J. (eds): *Nutrition During Infancy: Principles and practice.* ed 1 Cincinnati, Digital Educational Publishing. 1997:pp 123–53.
- [10] Mohrhauer H, Holman RT. The Effect of Dose Level of Essential Fatty Acids Upon Fatty Acid Composition of the Rat Liver. *J Lipid Res.* 1963;4:151-9.
- [11] Clandinin MT, Jumpsen J, Suh M. Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *J Pediatr.* 1994;125:S25-32.
- [12] Brenna JT. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:127-32.
- [13] Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45:581-97.
- [14] Valenzuela A, Von Bernhardt R, Valenzuela V, Ramirez G, Alarcon R, Sanhueza J, et al. Supplementation of female rats with alpha-linolenic acid or docosahexaenoic acid leads to the same omega-6/omega-3 LC-PUFA accretion in mother tissues and in fetal and newborn brains. *Ann Nutr Metab.* 2004;48:28-35.
- [15] Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, Alessandri JM, Durand G, Latge C, et al. Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids.* 2001;36:793-800.
- [16] Bowen RA, Clandinin MT. Maternal dietary 22 : 6n-3 is more effective than 18 : 3n-3 in increasing the 22 : 6n-3 content in phospholipids of glial cells from neonatal rat brain. *Br J Nutr.* 2005;93:601-11.

- [17] Lefkowitz W, Lim SY, Lin Y, Salem N, Jr. Where does the developing brain obtain its docosahexaenoic acid? Relative contributions of dietary alpha-linolenic acid, docosahexaenoic acid, and body stores in the developing rat. *Pediatr Res.* 2005;57:157-65.
- [18] Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:619-34.
- [19] DIRECTIVE. 2006/141/CE DE LA COMMISSION, du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE, Règlement (CE) n° 1243/2008 de la commission du 12 décembre 2008.
- [20] Alessandri JM, Goustard B, Guesnet P, Durand G. Polyunsaturated fatty acids status in blood, heart, liver, intestine, retina and brain of newborn piglets fed either sow milk or a milk replacer diet. *Reprod Nutr Dev.* 1996;36:95-109.
- [21] Pugo-Gunsam P, Guesnet P, Subratty AH, Rajcoomar DA, Maurage C, Couet C. Fatty acid composition of white adipose tissue and breast milk of Mauritian and French mothers and erythrocyte phospholipids of their full-term breast-fed infants. *Br J Nutr.* 1999;82:263-71.
- [22] Innis SM. Plasma and red blood cell fatty acid values as indexes of essential fatty acids in the developing organs of infants fed with milk or formulas. *J Pediatr.* 1992;120:S78-86.
- [23] AFSSA. – saisine no 2006-SA-0359 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Mars 2010.
- [24] Guesnet P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie.* 2010.
- [25] Schwarz E, Prabakaran S, Whitfield P, Major H, Leweke FM, Koethe D, et al. High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *J Proteome Res.* 2008;7:4266-77.
- [26] Iepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1986;27:114–20.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- [28] Ni Y, Su M, Lin J, Wang X, Qiu Y, Zhao A, et al. Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.* 2008;582:2627-36.
- [29] Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem.* 2008;80:115-22.
- [30] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13:2498-504.
- [31] Chavance M. [Jackknife and bootstrap]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 1992;40:209-18.
- [32] Wold S, Kettaneh N, Tjessem K. Hierarchical multiblock PLS and PC models for easier model interpretation and as an alternative to variable selection. *Journal of Chemometrics.* 1996;10:463-82.
- [33] Paillard F, Catheline D, Duff FL, Bouriel M, Deugnier Y, Pouchard M, et al. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18:436-40.
- [34] Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Muhlhausler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;83:61-8.

- [35] Jones PJ. Dietary linoleic, alpha-linolenic and oleic acids are oxidized at similar rates in rats fed a diet containing these acids in equal proportions. *Lipids*. 1994;29:491-5.
- [36] Rolland V, Roseau S, Fromentin G, Nicolaidis S, Tome D, Even PC. Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:21-30.
- [37] Bendixen H, Flint A, Raben A, Hoy CE, Mu H, Xu X, et al. Effect of 3 modified fats and a conventional fat on appetite, energy intake, energy expenditure, and substrate oxidation in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:47-56.
- [38] Jan S, Guillou H, D'Andrea S, Daval S, Bouriel M, Rioux V, et al. Myristic acid increases delta6-desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44:131-40.
- [39] Legrand P, Beauchamp E, Catheline D, Pedrono F, Rioux V. Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue PUFA content in the rat. *Lipids*. 45:975-86.
- [40] Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC, Calder PC. Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc Nutr Soc*. 2008;67:19-27.
- [41] Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavialle M, et al. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem*. 21:180-7 (EPub).
- [42] Kuratko CN, Salem N, Jr. Biomarkers of DHA status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;81:111-8.
- [43] Sarkadi-Nagy E, Wijendran V, Diau GY, Chao AC, Hsieh AT, Turpeinen A, et al. Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates. *J Lipid Res*. 2004;45:71-80.
- [44] Ward GR, Huang YS, Bobik E, Xing HC, Mutsaers L, Auestad N, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in formulae influence deposition of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in brain and red blood cells of artificially reared neonatal rats. *J Nutr*. 1998;128:2473-87.
- [45] Blank C, Neumann MA, Makrides M, Gibson RA. Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio. *J Lipid Res*. 2002;43:1537-43.
- [46] Stark KD. The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues. *Lipids*. 2008;43:45-53.

Figure legends

Figure 1. PCA score plots derived from the fatty acid data in the brain, plasma and red blood cell of rats. Seven principal components were calculated by cross-validation, and 54.9% of the variables can be explained by the first two components (79.7% can be explained by the 7 components). P1, palm oil blend diet with the ALA level 1.5% of FA; P2, palm oil blend with an ALA level 1.5% of FA and supplementation with DHA (0.12% of FA) and AA (0.4% of FA); B1, butter blend with rapeseed with an ALA level 1.5% of FA; B2, butter blend with rapeseed and a higher ALA level of 2.3% of FA. N = 20 rats per group.

Figure 2. Strategy for the identification of relevant fatty acids, showing differences between females and males. OPLS-DA model with fast GC data; the R²Y and Q²Y (predictive ability) were 0.95 and 0.946, respectively. Panel A: Two-dimensional OPLS-DA score plot showing group discriminations according to gender effects; percentage of variation of the GC variables (R²X) explained by each component *t* is indicated. The group assignment for individual rats was calculated using one significant component to explain 94.6% of brain, plasma and RBC FA. Panel B: S-plots of the first component. Discriminated fatty acids (VIP value > 1) are marked with a red square. Panel C: Loading plot with jack-knifed confidence intervals. The weight coefficients *p* of the fatty acids marked with a red square in panel B were significant. Lower-left square of the plot: fatty acids increasing in male rats and decreasing in female rats; upper-right square of the plot: fatty acids increasing in female rats and decreasing in male rats.

Figure 3. Characterization of the brain, plasma and RBC fatty acids changes induced by dietary challenges. Two-dimensional OPLS-DA score plot showing group discrimination according to the dietary treatments; percentage of variation of the fatty acid variables (R²X) explained by each component *t* is indicated. The group assignment for individual rats was calculated using three significant components to explain 84.5% of the fatty acid variations. P1: 1.5%-ALA palm-blend diet; P2: 0.12% DHA/0.4% AA-supplemented 1.5%-ALA palm-blend diet; B1: 1.5%-ALA butter-blend diet; B2: 2.3%-ALA butter-blend diet. N=16 rats per group.

Figure 4. OPLS-DA model with the brain, RBC and plasma fatty acid data in the palm and butter diets providing identical ALA intakes. Panel A: OPLS-DA model with the GC data; the R²Y and Q²Y (predictive ability) were 0.97 and 0.95, respectively. OPLS-DA score plot shows group discrimination according to the dietary treatments. The group assignment for

individual rats was calculated using one significant component to explain 94.6% of FA variations. Panel B: S-plot, FA variations with $VIP > 1$ are marked with a red square. Panel C: Loading plot with jack-knifed confidence intervals for the FA variations with the red squares in panel B. Lower-left square of the plot: fatty acids increasing in the B1 (1.5%-ALA butter-blend) diet and decreasing in the P1 (1.5%-ALA palm-blend) diet; upper-right square of the plot: fatty acids increasing in the P1 (1.5%-ALA palm-blend) diet and decreasing in the B1 (1.5%-ALA butter-blend) diet.

Figure 5. OPLS-DA model with the brain, RBC and plasma fatty acid data between the groups fed anhydrous butter with different ALA levels (1.5% FA and 2.3% FA). Panel A: OPLS-DA score plot showing group discrimination according to the dietary treatments; the R^2Y and Q^2Y (predictive ability) were 0.98 and 0.94, respectively. The group assignment for individual rats was calculated using one significant component to explain 98.4% of FA variations. Panel B: S-plot, FA variations with $VIP > 1$ are marked with a red square. Panel C: Loading plot with jack-knifed confidence intervals for the FA variations with the red squares in panel B. Lower left square of the plot: fatty acids increasing in the B2 (2.3%-ALA butter-blend) diet and decreasing in the B1 (1.5%-ALA butter-blend) diet; upper right square of the plot: fatty acids increasing in the B1 (1.5%-ALA butter-blend) diet and decreasing in the B2 (2.3%-ALA butter-blend) diet.

Figure 6. OPLS-DA model with the brain, RBC and plasma fatty acids data in the palm oil group with or without DHA and ARA supplementation. Panel A: OPLS-DA score plot showing group discrimination according to the dietary treatments, the R^2Y and Q^2Y (predictive ability) were 0.88 and 0.70, respectively. The group assignment for individual rats was calculated using one significant component to explain 86.5% of FA variations. Panel B: S-plot, FA variations with $VIP > 1$ are marked with a red square. Panel C: Loading plot with jack-knifed confidence intervals for the FA variations with the red squares in panel B. Lower left square of the plot: fatty acids increasing in the P1 (1.5%-ALA palm-blend) diet and decreasing in the P2 (DHA/ARA-supplemented 1.5%-ALA palm-blend) diet; upper right square of the plot: fatty acids increasing in the P2 (DHA/ARA-supplemented 1.5%-ALA palm-blend) diet and decreasing in the P1 (1.5%-ALA palm-blend) diet.

Figure 7. Fatty acid-fatty acid interaction network in the brains of both male and female pups fed with the various diets. Panel A: Correlation plots indicating pair-wise correlations among

brain fatty acids of both male and female pups that have an absolute Pearson correlation coefficient over or equal to .5 ($R^2=.5$). Only the strongest relationships remained after this stringent filtering (18 of the 19 fatty acids can be visualized). Nodes represent the annotated fatty acids, the edges with solid lines represent positive coefficients, and the edges with dashed lines negative coefficients. Arrows show the most interconnected fatty acids (hubs). Panel B: heat map showing the selected fatty acid content displayed in the interaction network according to the dietary challenges (yellow boxes: increase, blue boxes: decrease, black boxes: no relative change) with rows describing the fatty acids and columns describing individual rats; *P* values comparing fatty acid content across the dietary challenges are indicated (a,b,c,d: a fatty acid not sharing the same letter is significantly different, $P < 0.05$).

Figure 8. Panel A: Relationship between erythrocyte (RBC) lipid DPAn-3 and brain lipid DHA. The content of brain lipid DHA was significantly and positively correlated with the content of DPAn-3 in RBC lipids. Panel B: Relationship between a selection (best OPLS index, VIP values > 1) of RBC and plasma fatty acids (RBC DPAn-3, EPA, C20:3n-6, ALA, DPAn-6, LA, and Plasma ALA, EPA, DPAn-3, DPAn-6) and brain lipid DHA. The individual values of the selected fatty acids were reduced to one composite latent variable per individual prior to calculation (hierarchical PLS, see methods section). The non-linear prediction index R^2 is indicated, whether when DPA panel A or the composite latent variable in panel B is used.

Figure 9. Panel A: Liver SCD1 mRNA in relation to the plasma 18:1n-9/18:0 ratio across four diets and sex. The plasma fatty acid 18:1n-9/18:0 ratio was significantly and positively correlated with liver SCD1 mRNA. Panel B: Liver SCD1 mRNA in relation to the plasma 16:1n-7/16:0 ratio across four diets and sex. The proportion of plasma fatty acid 16:1n-7/16:0 ratio was significantly and positively correlated with the liver SCD1 mRNA. Panel C: Liver ELOVL2 mRNA in relation to the plasma fatty acid 22:5n-6/20:4n-6 ratio across four diets and sex. The plasma fatty acid 22:5n-6/20:4n-6 ratio was significantly and positively correlated with the liver ELOVL2 mRNA. Panel D: Liver ELOVL2 mRNA in relation to the plasma fatty acid 22:5n-3/20:5n-3 ratio across four diets and sex. The plasma fatty acid 22:5n-3/20:5n-3 ratio was not significantly correlated with the liver ELOVL2 mRNA. P1: 1.5%-ALA palm-blend diet; P2: DHA/ARA-supplemented 1.5%-ALA palm-blend diet; B1: 1.5%-ALA butter-blend diet; B2: 2.3%-ALA palm-blend diet.

Table 1.

Dietary fatty acid compositions (g/100 g diet)

	Diet 10% lip	Diet 10% lip	Diet 10% lip	Diet 10% lip
	P1	P2	B1	B2
	Palm	Palm	MGLA	MGLA
	ALA1.5%	ALA1.5%	ALA1.5%	ALA2.3%
FA		+ DHA ARA		
14:0	0.08	0.08	0.75	0.7
16:0	3.62	3.62	1.99	1.87
18:0	0.41	0.41	0.96	0.9
18:1	3.84	3.84	2.66	2.94
18:2n-6	1.6	1.6	1.39	1.33
18:3n-3	0.16	0.16	0.15	0.23
18:2n-6/18:3n-3	10.27	10.27	9.09	5.71
SFA	4.17	4.17	4.1	3.85
sat-18:0	3.76	3.76	3.59	2.95
Short-Chains				
fatty acids*		0	0.61	0.57
DHA		0.012		
ARA		0.04		

*includes C8:0, C10:0, C12:0

Figure 1

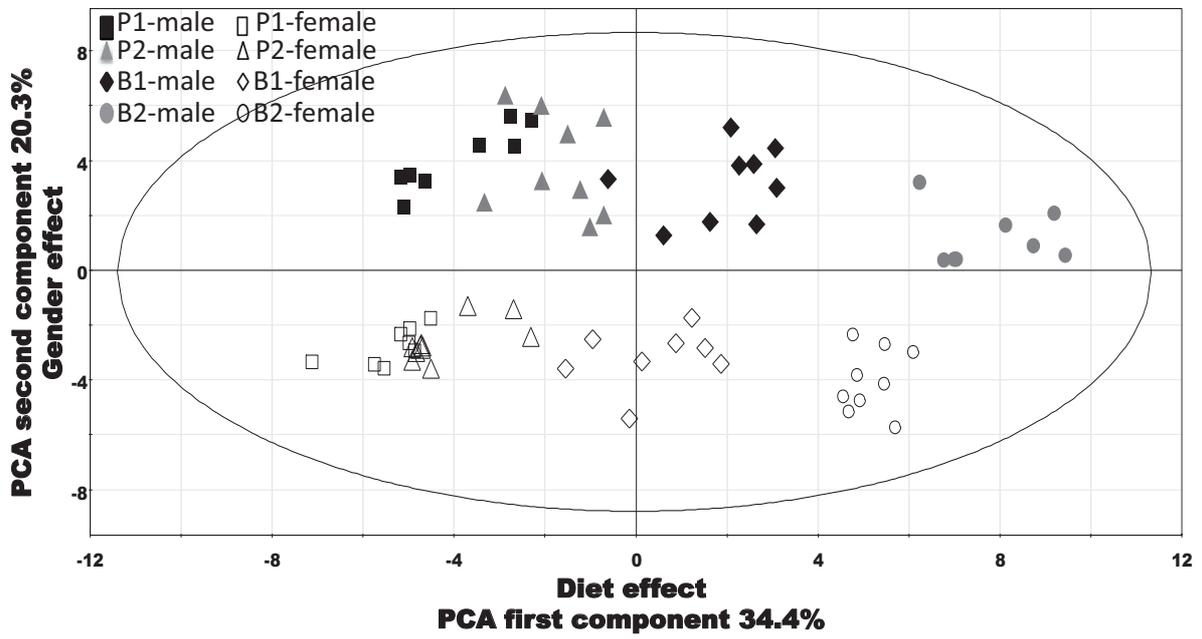


Figure 2

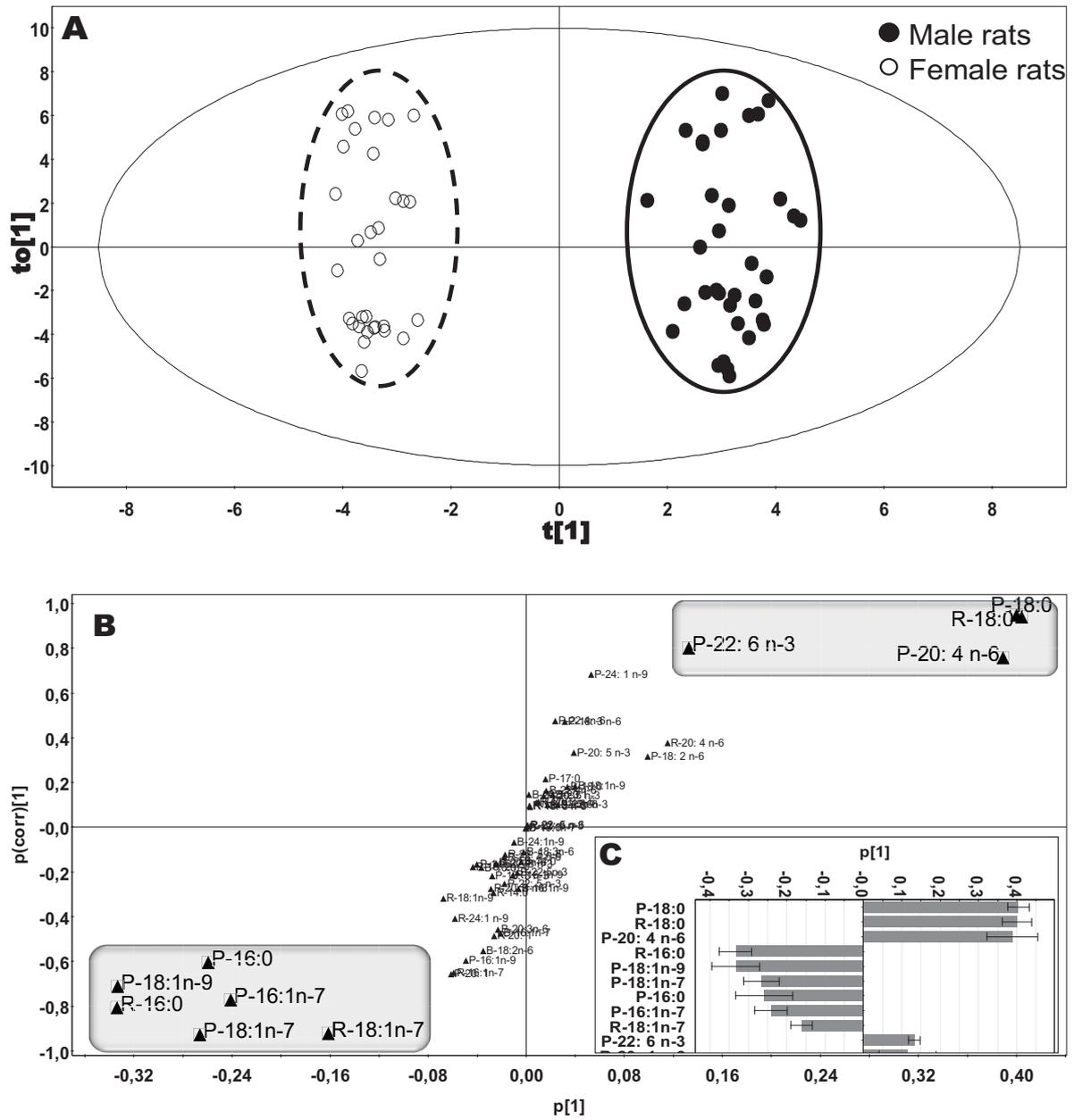


Figure 3

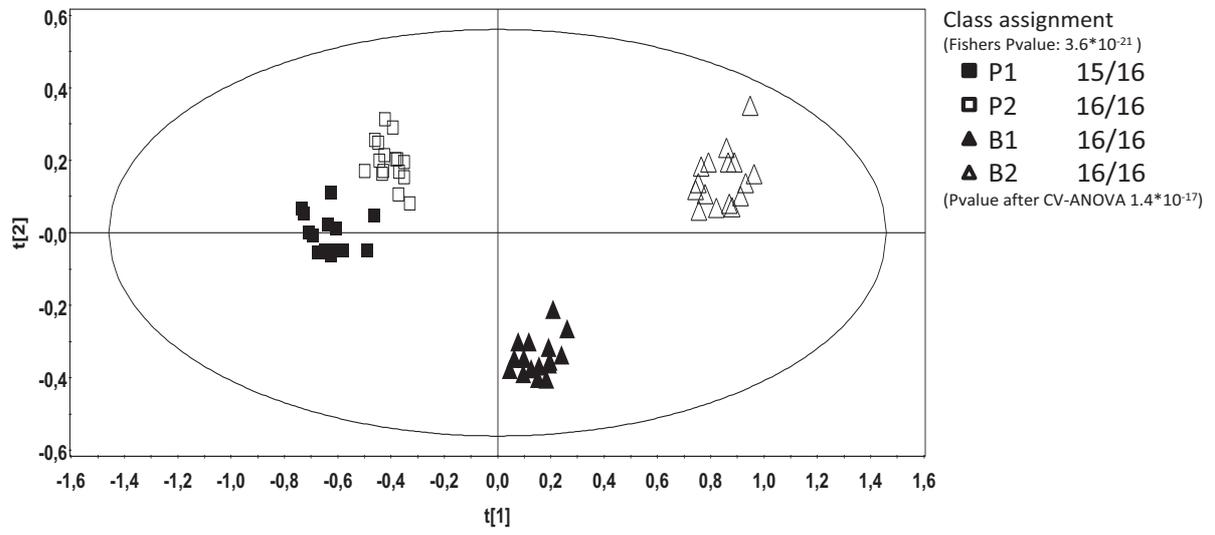


Figure 4

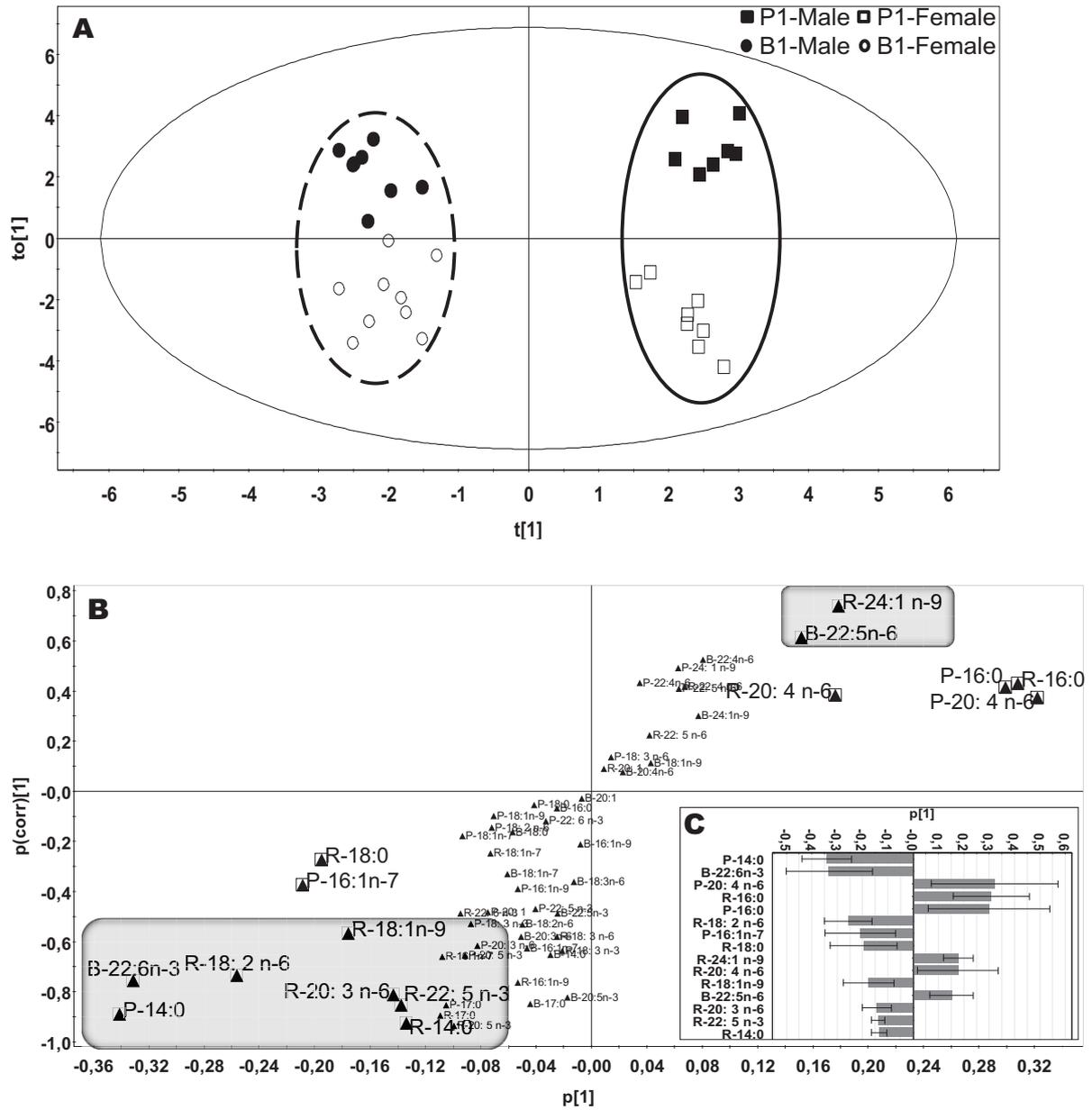


Figure 6

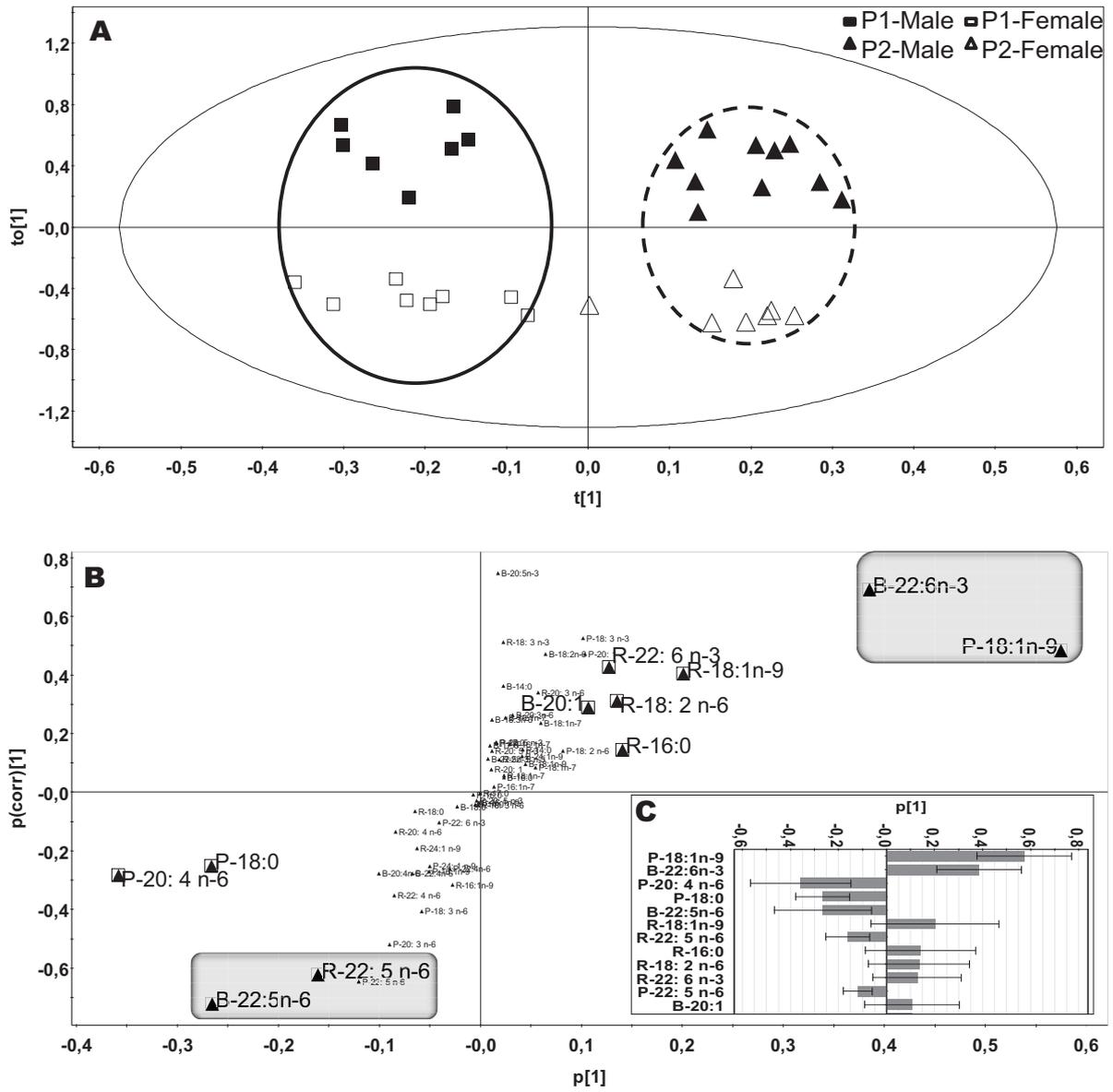


Figure 7

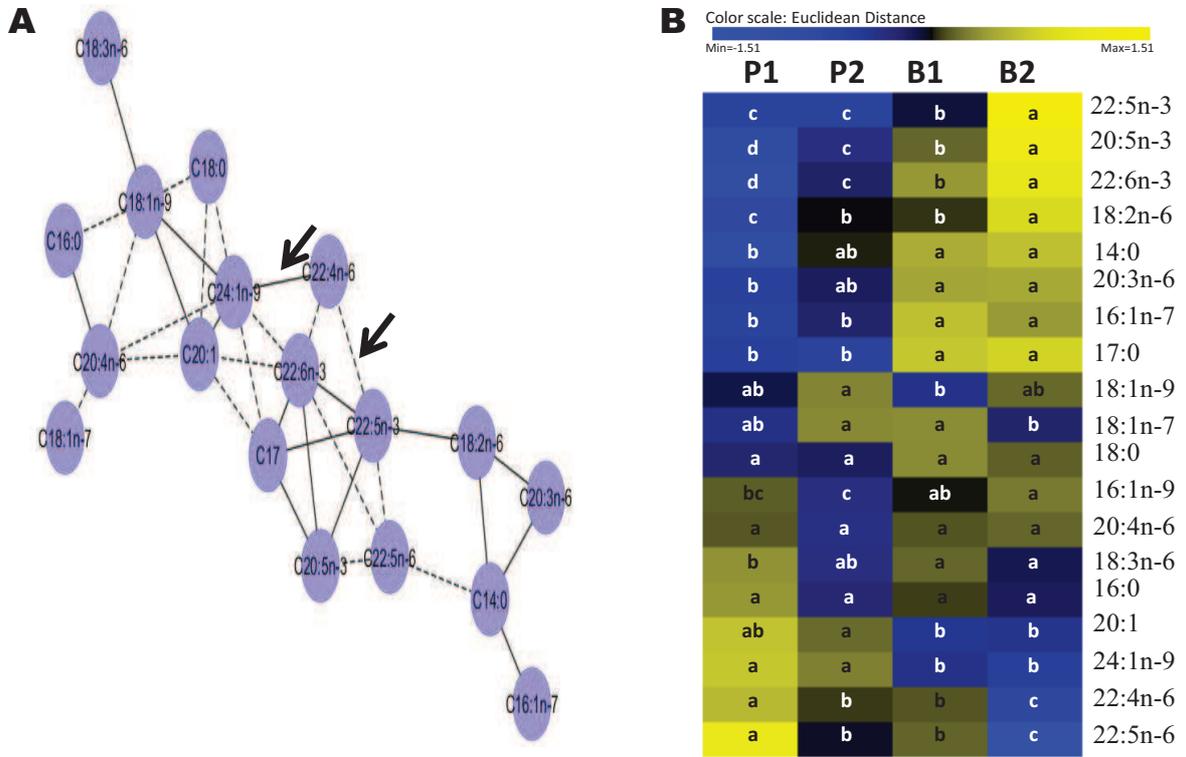


Figure 8

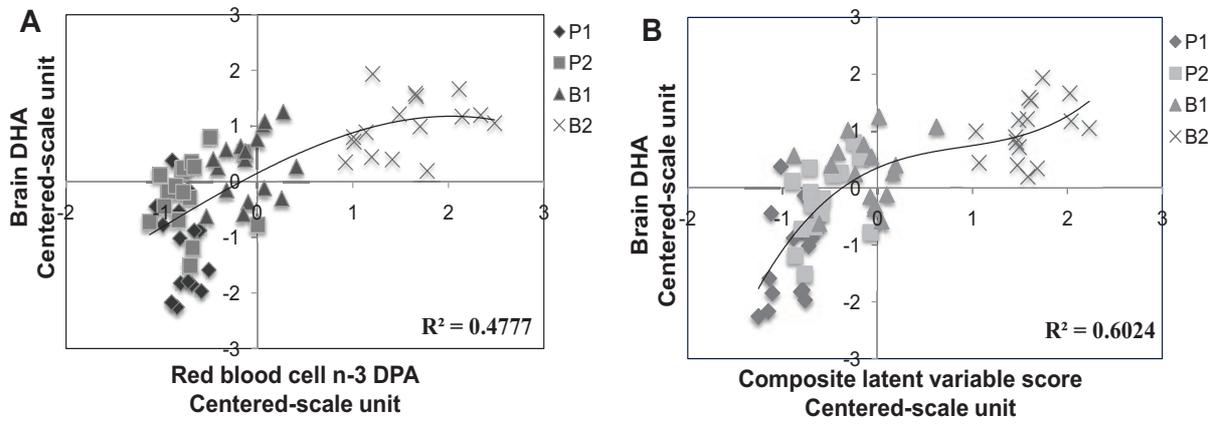
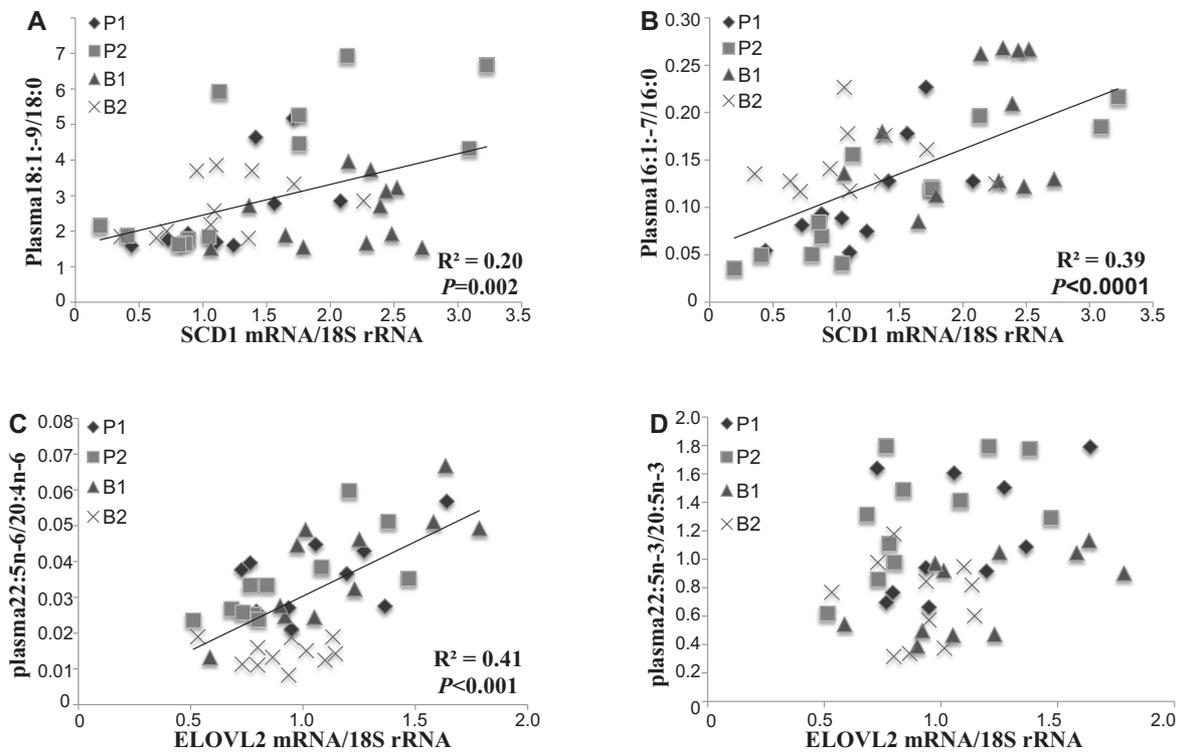


Figure 9



Supplemental on line

Table 1. Primer sequence of genes

Enzyme	Gene	Accession number	Sequence
Δ 5 desaturase	FADS1	NM_053445	F/5'-GAACTCTCTGATTGGAGAGCTA R/5'-CCGGAATTCATCAGTGAGC
Δ 6 desaturase	FADS2	NM_031344	F/5'-AATTTCCAGATTGAGCACCAC R/5'-AGTGGGGCAATCTTGTGC
Δ 9 desaturase	SCD1	NM_139192	F/5'-GAAGCGAGCAACCGACAG R/5'-GGTGGTCTGTAGGAACTGG
elongase 2	ELOVL2	NM_001109118	F/5'-AACCTCGGAATCACACTTCTTT R/5'-TCCCAGCTGGAGAGAACG

Figure 1. VIP plots. Impact of the dietary or the gender influence on the fatty acid profiles summarized in one score (VIP index). (A) diet effect, (B) gender effect. Variable with large VIP, larger than 1, are the most relevant for explaining the corresponding effect examined.

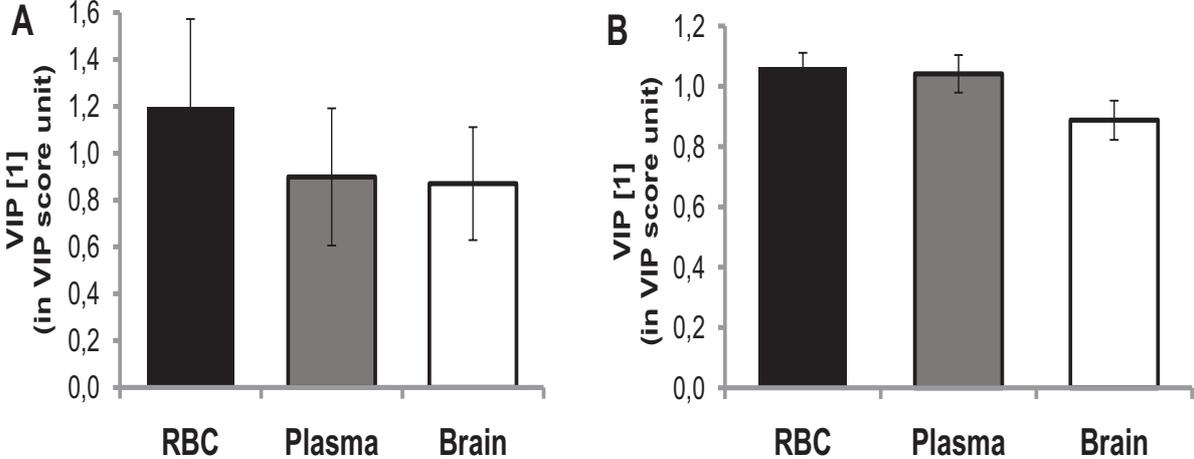


Table 2. values (%total fatty acids) of the differentiating fatty acids between female and male rats.

Fatty acids	Males	Females	Females/Males ratio	<i>P</i> value
Plasma DHA	1.81±0.05	2.46±0.04	1.36	<0.001
Plasma AA	10.23±0.45	16.13±0.51	1.58	<0.001
RBC 18:0	14.09±0.18	19.28±0.14	1.37	<0.001
Plasma 18:0	7.30±0.20	12.59±0.18	1.72	<0.001
RBC 16:0	26.29±0.32	22.29±0.24	0.85	<0.001
Plasma 16:0	25.13±0.46	21.65±0.30	0.86	<0.001
Plasma 16:1n-7	4.35±0.12	2.11±0.11	0.49	<0.001
Plasma 18:1n-9	27.77±0.51	23.26±0.38	0.84	<0.001
RBC 18:1n-7	2.77±0.04	1.87±0.03	0.67	<0.001
Plasma 18:1n-7	3.69±0.13	1.39±0.04	0.38	<0.001

Note: results are means ± SD

Table 3. Brain fatty acids values (% total fatty acids) among female and male rats fed with the P1, P2, B1 and B2 diets.

Fatty Acids	Brain fatty acids				P value		
	P1	P2	B1	B2	Diet effect	gender effect	Diet effect*gender effect
14:0	0.118±0.002 ^b	0.122±0.002 ^{ab}	0.127±0.002 ^a	0.128±0.003 ^a	<0.001	0.1975	0.6109
16:0	18.655±0.150	18.577±0.135	18.794±0.193	18.741±0.140	0.779	0.1002	0.8065
17:0	0.143±0.002 ^b	0.148±0.003 ^b	0.168±0.002 ^a	0.170±0.002 ^a	<0.001	0.9796	0.0637
18:0	20.658±0.209	20.708±0.082	20.997±0.115	20.875±0.097	0.1193	0.0197	<0.001
16:1n-9	0.134±0.002 ^{bc}	0.131±0.002 ^c	0.136±0.002 ^{ab}	0.140±0.002 ^a	0.0038	0.0075	0.1928
16:1n-7	0.315±0.004 ^b	0.332±0.007 ^b	0.353±0.007 ^a	0.350±0.007 ^a	<0.001	<0.001	0.6052
18:1n-9	16.146±0.130 ^{ab}	16.407±0.153 ^a	15.896±0.231 ^b	16.272±0.171 ^{ab}	0.216	0.0797	0.1745
18:1n-7	3.610±0.050 ^{ab}	3.706±0.033 ^a	3.709±0.034 ^a	3.561±0.041 ^b	0.0222	0.6667	0.3049
20:1	2.210±0.110 ^{ab}	2.409±0.082 ^a	2.100±0.074 ^b	2.111±0.067 ^b	0.0249	0.3434	0.0315
24:1 n-9	2.178±0.091 ^a	2.242±0.061 ^a	1.921±0.076 ^b	1.874±0.057 ^b	0.0008	0.5679	0.5466
18: 2 n-6	0.492±0.009 ^c	0.532±0.012 ^b	0.541±0.011 ^b	0.585±0.017 ^a	<0.001	<0.001	0.4403
18: 3 n-6	0.038±0.002 ^b	0.040±0.001 ^{ab}	0.042±0.001 ^a	0.043±0.001 ^a	0.0552	0.3583	0.1025
20: 3 n-6	0.351±0.012 ^b	0.368±0.010 ^{ab}	0.392±0.008 ^a	0.387±0.008 ^a	0.0052	0.0001	0.9562
20: 4 n-6	9.951±0.108	9.727±0.062	9.898±0.110	9.962±0.068	0.1031	0.0989	0.0047
22: 4 n-6	3.506±0.031 ^a	3.386±0.039 ^b	3.350±0.022 ^b	3.235±0.034 ^c	<0.001	0.4233	0.363
22: 5 n-6	2.577±0.071 ^a	2.128±0.064 ^b	2.222±0.064 ^b	1.473±0.046 ^c	<0.001	0.1579	<0.001
20: 5 n-3	0.002±2.396E-4 ^d	0.005±2.857E-4 ^c	0.006±4.011E-4 ^b	0.010±0.001 ^a	<0.001	0.011	0.1689
22: 5 n-3	0.089±0.003 ^c	0.092±0.0042 ^c	0.103±0.002 ^b	0.134±0.002 ^a	<0.001	0.0036	0.7054
22: 6 n-3	11.755±0.221 ^d	12.896±0.136 ^c	13.445±0.145 ^b	14.167±0.125 ^a	<0.001	0.0252	<0.001

Note: results are means ± SD

Table 4. Values (% total fatty acids) of the differentiating fatty acids among female and male rats fed with P1 and B1diets.

Fatty acids	P1	B1	B1/P1 ratio	<i>P</i> -value
Plasma myristic acid	0.66±0.05	2.10±0.11	3.18	<0.0001
RBC myristic acid	0.15±0.01	0.36±0.01	2.40	<0.0001
Brain DHA	11.76±0.22	13.45±0.15	1.14	<0.0001
RBC LA	6.40±0.07	7.34±0.14	1.15	<0.0001
RBC oleic acid	7.35±0.13	7.91±0.08	1.08	<0.0001
RBC 20:3n-6	0.48±0.02	0.74±0.03	1.54	<0.0001
RBC n-3 DPA	0.77±0.01	1.01±0.02	1.31	<0.0001
RBC 24:1n-9	1.29±0.08	0.86±0.02	0.67	<0.0001
Brain n-6 DPA	2.58±0.07	2.22±0.06	0.86	<0.0001

Note: results are means ± SD

Table 5. Values (% total fatty acids) the differentiating fatty acids among female and male rats fed with B1 and B2 diets.

Fatty acids	B1	B2	B2/B1 ratio	<i>P</i> value
Brain DHA	13.45±0.15	14.17±0.13	1.05	<0.0001
RBC n-3 DPA	1.01±0.02	1.59±0.04	1.57	<0.0001
RBC EPA	0.22±0.01	0.49±0.03	2.21	<0.0001
Plasma ALA	0.56±0.04	0.98±0.04	1.74	<0.0001
Plasma EPA	0.29±0.03	0.57±0.05	2.01	<0.0001
RBC LA	7.34±0.14	8.37±0.16	1.14	<0.0001
RBC oleic acid	7.91±0.08	8.55±0.14	1.08	0.0006
Brain n-6 DPA	2.22±0.06	1.47±0.05	0.66	<0.0001
RBC n-6 DPA	1.27±0.05	0.64±0.03	0.50	<0.0001
Plasma n-6 DPA	0.44±0.04	0.17±0.01	0.38	<0.0001
RBC 22:4n-6	1.80±0.03	1.33±0.05	0.74	<0.0001
RBC ARA	26.89±0.26	25.31±0.25	0.94	<0.0001

Note: results are means ± SD

Table 6. Values (% total fatty acids) of the differentiating fatty acids among female and male rats fed with P1 and P2 diets.

Fatty acid	P1	P2	P2/P1 ratio	<i>P</i> -value
Brain DHA	11.76±0.22	12.90±0.14	1.10	<0.0001
Plasma oleic acid	23.76±0.74	27.52±0.96	1.16	<0.0001
RBC n-6 DPA	1.34±0.04	1.12±0.03	0.83	<0.0001
Brain n-6 DPA	2.58±0.07	2.13±0.06	0.83	<0.0001

Note: results are means ± SD

Table 7. Values (% total fatty acids) of RBC fatty acids among female and the male rats fed with P1, P2, B1 and B2 diets.

Fatty Acids	RBC Fatty Acids				P value		
	P1	P2	B1	B2	Diet effect	gender effect	Diet effect*gender effect
C14:0	0.150±0.010 ^c	0.147±0.009 ^c	0.363±0.010 ^b	0.415±0.014 ^a	<0.001	<0.001	0.1249
C16:0	25.602±0.636 ^a	25.795±0.566 ^a	22.906±0.504 ^b	22.838±0.421 ^b	<0.001	<0.001	<0.001
C17:0	0.224±0.003 ^c	0.222±0.007 ^c	0.373±0.010 ^b	0.422±0.012 ^a	<0.001	0.0214	0.0106
C18:0	16.369±0.700	15.998±0.693	17.610±0.639	16.794±0.656	<0.001	<0.001	0.6877
C16:1n-9	0.172±0.004 ^c	0.157±0.006 ^d	0.213±0.005 ^b	0.244±0.005 ^a	<0.001	<0.001	0.0009
C16:1n-7	0.235±0.017 ^b	0.265±0.024 ^b	0.425±0.034 ^a	0.388±0.023 ^a	<0.001	<0.001	0.0208
C18:1n-9	7.348±0.132 ^c	7.922±0.168 ^b	7.908±0.082 ^b	8.553±0.142 ^a	<0.001	0.0056	0.1392
C18:1n-7	2.127±0.111	2.273±0.126	2.455±0.126	2.432±0.113	<0.001	<0.001	0.1264
C20:1	0.245±0.020	0.251±0.005	0.237±0.006	0.260±0.009	0.2812	<0.001	0.059
C24:1 n-9	1.294±0.080 ^a	1.196±0.068 ^a	0.862±0.018 ^b	1.003±0.012 ^b	<0.001	<0.001	<0.001
C18: 2 n-6	6.403±0.070 ^d	6.828±0.186 ^c	7.336±0.139 ^b	8.366±0.159 ^a	<0.001	0.1959	0.2099
C18: 3 n-6	0.050±0.002 ^b	0.049±0.002 ^b	0.062±0.002 ^a	0.067±0.002 ^a	<0.001	0.1705	0.7454
C20: 3 n-6	0.478±0.018 ^b	0.524±0.019 ^b	0.744±0.031 ^a	0.811±0.026 ^a	<0.001	<0.001	0.0006
C20: 4 n-6	27.851±0.334 ^a	27.367±0.239 ^{ab}	26.886±0.263 ^b	25.313±0.254 ^c	<0.001	0.0001	0.106
C22: 4 n-6	1.876±0.051 ^a	1.806±0.040 ^a	1.803±0.029 ^a	1.328±0.048 ^b	<0.001	0.0098	0.0174
C22: 5 n-6	1.343±0.041 ^a	1.115±0.032 ^b	1.274±0.051 ^a	0.637±0.029 ^c	<0.001	0.0018	<0.001
C18: 3 n-3	0.037±0.001 ^c	0.043±0.002 ^b	0.044±0.001 ^b	0.083±0.002 ^a	<0.001	0.0003	0.7029
C20: 5 n-3	0.109±0.005 ^c	0.117±0.005 ^c	0.221±0.007 ^b	0.489±0.026 ^a	<0.001	<0.001	<0.001
C22: 5 n-3	0.769±0.014 ^c	0.793±0.023 ^c	1.011±0.023 ^b	1.590±0.040 ^a	<0.001	<0.001	0.0016
C22: 6 n-3	3.314±0.045 ^c	3.521±0.068 ^b	3.543±0.046 ^b	3.852±0.092 ^a	<0.001	0.7586	0.3846

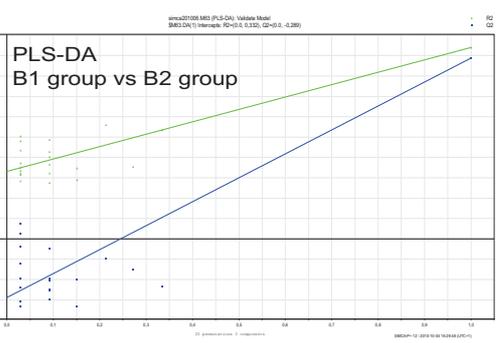
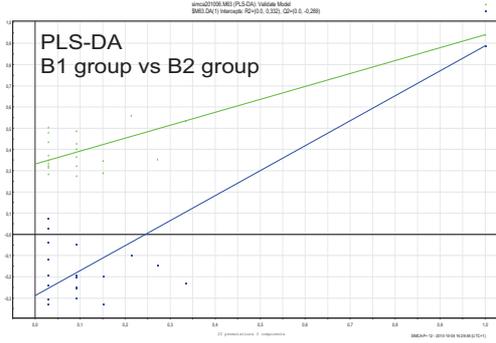
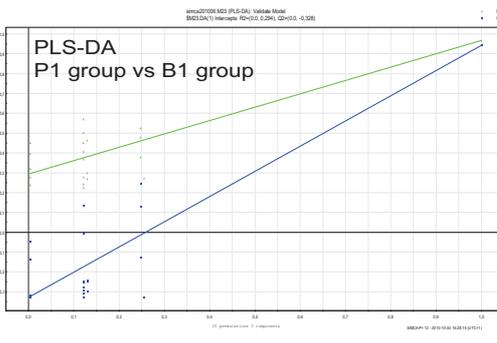
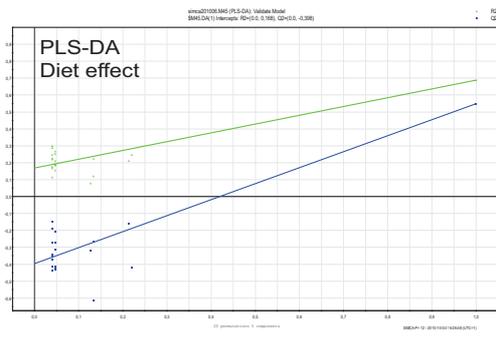
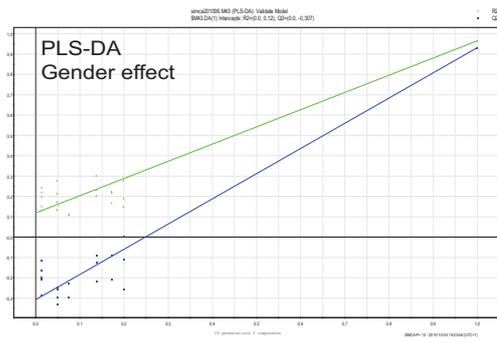
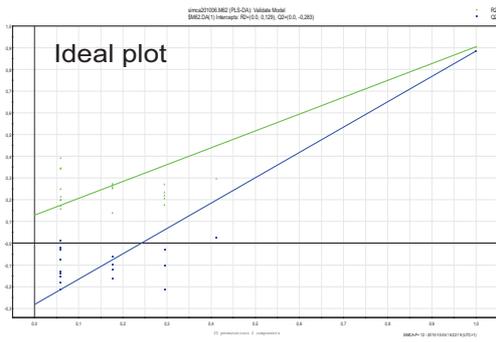
Note: results are means ± SD

Table 8. Values (% total fatty acids) of plasma fatty acids among female and male rats fed with P1, P2, B1 and B2 diets.

Fatty Acids	Plasma Fatty Acids				P value		
	P1	P2	B1	B2	Diet effect	gender effect	Diet effect*gender effect
C14:0	0.661±0.050 ^c	0.743±0.063 ^c	2.104±0.107 ^b	2.524±0.131 ^a	<0.001	0.002	0.0408
C16:0	24.898±0.794 ^a	24.919±0.554 ^a	22.759±0.489 ^b	21.007±0.456 ^c	<0.001	<0.001	0.0547
C17:0	0.142±0.004 ^b	0.150±0.007 ^b	0.286±0.013 ^a	0.307±0.007 ^a	<0.001	<0.001	0.0002
C18:0	10.391±0.751	8.833±0.744	10.499±0.746	10.146±0.509	0.0001	<0.001	0.0008
C16:1n-9	0.403±0.022 ^b	0.355±0.025 ^c	0.491±0.025 ^a	0.441±0.019 ^{ab}	<0.001	<0.001	0.1285
C16:1n-7	2.811±0.343 ^b	2.829±0.375 ^b	4.069±0.427 ^a	3.225±0.247 ^{ab}	<0.001	0.0005	0.0269
C18:1n-9	23.756±0.737 ^c	27.515±0.956 ^a	24.337±0.678 ^b	26.233±0.635 ^{ab}	<0.001	<0.001	0.0193
C18:1n-7	2.363±0.282	2.545±0.293	2.929±0.416	2.315±0.228	0.0246	<0.001	0.0002
C20:1	0.470±0.026 ^b	0.557±0.035 ^a	0.578±0.032 ^a	0.621±0.027 ^a	0.0006	<0.001	0.1251
C24:1 n-9	0.285±0.023 ^a	0.235±0.029 ^{ab}	0.189±0.017 ^b	0.237±0.019 ^{ab}	0.0065	<0.001	0.3796
C18: 2 n-6	13.159±0.176 ^b	13.373±0.265 ^b	13.603±0.420 ^b	15.116±0.414 ^a	<0.001	0.0104	0.0465
C18: 3 n-6	0.243±0.015 ^a	0.194±0.011 ^b	0.223±0.015 ^{ab}	0.263±0.024 ^a	0.0266	<0.001	0.0128
C20: 3 n-6	0.503±0.017 ^c	0.418±0.018 ^b	0.618±0.021 ^a	0.617±0.029 ^a	<0.001	0.1544	0.437
C20: 4 n-6	15.653±1.017 ^a	13.191±1.086 ^{ab}	12.539±0.856 ^b	11.465±0.756 ^b	0.0002	<0.001	0.1163
C22: 4 n-6	0.193±0.011 ^a	0.171±0.008 ^{ab}	0.159±0.006 ^b	0.133±0.007 ^c	<0.001	<0.001	0.2972
C22: 5 n-6	0.544±0.022 ^a	0.428±0.018 ^b	0.444±0.036 ^b	0.168±0.010 ^c	<0.001	0.9233	0.0014
C18: 3 n-3	0.409±0.023 ^c	0.511±0.021 ^b	0.562±0.036 ^b	0.977±0.043 ^a	<0.001	0.0007	0.1507
C20: 5 n-3	0.151±0.011 ^c	0.151±0.014 ^c	0.286±0.025 ^b	0.574±0.050 ^a	<0.001	<0.001	0.0005
C22: 5 n-3	0.168±0.006 ^c	0.175±0.007 ^c	0.208±0.011 ^b	0.323±0.017 ^a	<0.001	0.0002	0.1662
C22: 6 n-3	2.005±0.100 ^b	2.038±0.106 ^{ab}	2.190±0.085 ^{ab}	2.304±0.093 ^a	0.0012	<0.001	0.501

Note: results are means ± SD

PLS-Permutation validation plots



1.2. Analyse des profils d'acides gras cérébraux

Comparativement au plasma et aux globules rouges le profil en acides gras du cerveau semblait être moins influencé par les régimes ou le sexe. Nous avons néanmoins souhaité mieux évaluer l'influence de ces deux facteurs sur la composition en acides gras de cet organe en raison des conséquences fonctionnelles liés aux modifications des profils d'acides gras. Nous nous sommes pour cela focalisés uniquement sur les données obtenues sur le cerveau, ce qui permet de s'affranchir de problèmes de « distorsion » statistique lorsque plusieurs types de profils sont analysés simultanément comme nous l'avons réalisés dans l'article présenté ci-dessus. Cette distorsion peut s'exprimer lorsque l'on compare la variance des profils les plus sensibles (par ex les érythrocytes) qui aura tendance à amenuiser celles des profils les moins sensibles (ex cerveau), et qui aura donc tendance à servir de référentiel.

En premier lieu, nous avons examiné l'influence des régimes sur le profil en acides gras du cerveau dans un modèle d'analyse discriminante de type OPLS-DA (Figure 27).

Le modèle peut décrire 81.9% de la variance des acides gras ($R^2X=0.819$), 49.2% de la variation de la réponse de groupe ($R^2Y=0.492$) avec un coefficient de prédiction de 35.5% ($Q^2Y=0.355$). La capacité de classification des rats soumis aux 4 régimes peut être vue sur la figure 27a. On note que les animaux de groupes P1, P2, B1 et B2 peuvent être distingués par la première composante. De façon intéressante, seuls les rats alimentés avec le régime P1 peuvent être distingué en fonction du sexe sur la seconde composante. Le test de permutations ($n=999$) montre que ce modèle n'est pas le résultat d'un facteur aléatoire (Figure 27b).

Comme décrit dans la publication au dessus, nous avons utilisé un critère d'évaluation multiple pour statistiques multivariées (i.e. $VIP>1$ (Figure 27d), $[p(\text{corr})1]>0,5$ (Figure 27c) et l'intervalle de confiance jack-knifed excluant la valeur zéro (Figure 27e)) (Ni et al., 2008) afin d'identifier dans le cerveau les acides gras sensibles à l'effet régime et à l'effet sexe. Il ressort qu'en regard de tous les acides gras, le DHA est celui qui possède l'impact majeur pour séparer les différents groupes.

A cet égard, on peut mettre évidence un gradient croissant de concentration de DHA dans les différents groupes avec une concentration minimale dans le groupe P1 et maximale dans le groupe B2 (Tableau 9). Cette observation confirme les résultats développés dans l'article et montrant que les régimes à base de MGLA potentialisent l'accumulation de DHA dans le cerveau comparativement à ceux à base de matière grasse végétale de type palme. L'autre acide gras cérébral sensible aux régimes est le DPA n-6 qui varie inversement au

DHA (Tableau 9). Cet accroissement du DPA n-6 tend à compenser le DHA lorsque celui-ci n'atteint pas son niveau optimal (Garcia-Calatayud et al. 2005).

Figure 27: Analyse en O2PLS-DA des acides gras cérébraux entre des rats nourris avec des régimes P1, P2, B1 et B2. (a) carte des observations en OPLS-DA indiquant une discrimination de groupe en fonction du régime. L'attribution de groupe des rats individuels a été calculée par la procédure de « mauvaise classification » du logiciel SIMCA. (b) test de permutation (n=999) effectué sur l'analyse PLS-DA. (c) S-plot permettant de visualiser les acides gras les plus sensibles aux régimes (marqués en rouge et dans la zone grise). (d) histogramme des indices VIP. (e) score des contributions individuelles pour distinguer l'effet régime, avec significatifon statistique obtenue par rééchantillonnage (intervalle de confiance Jack-knife à 99%).

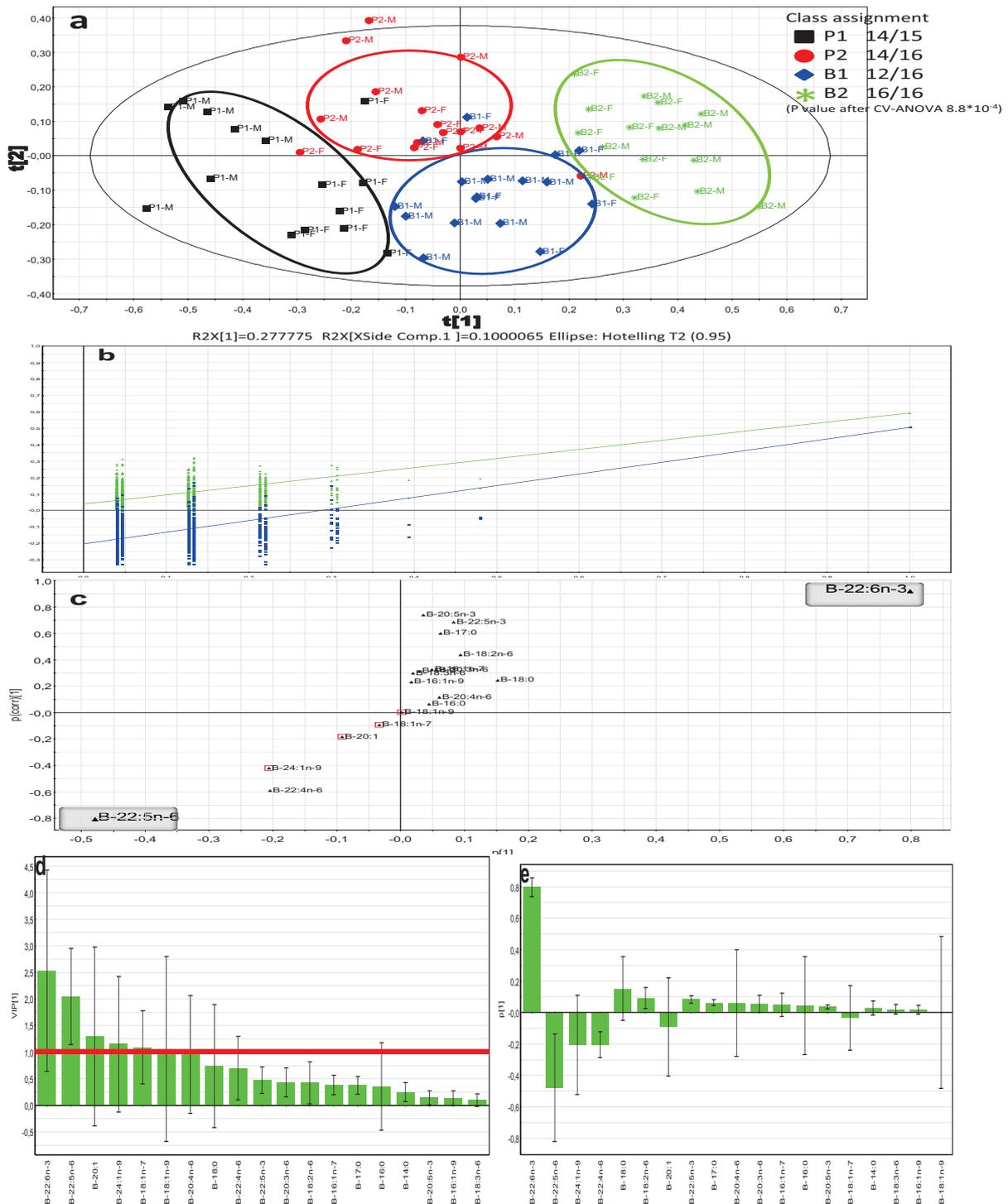


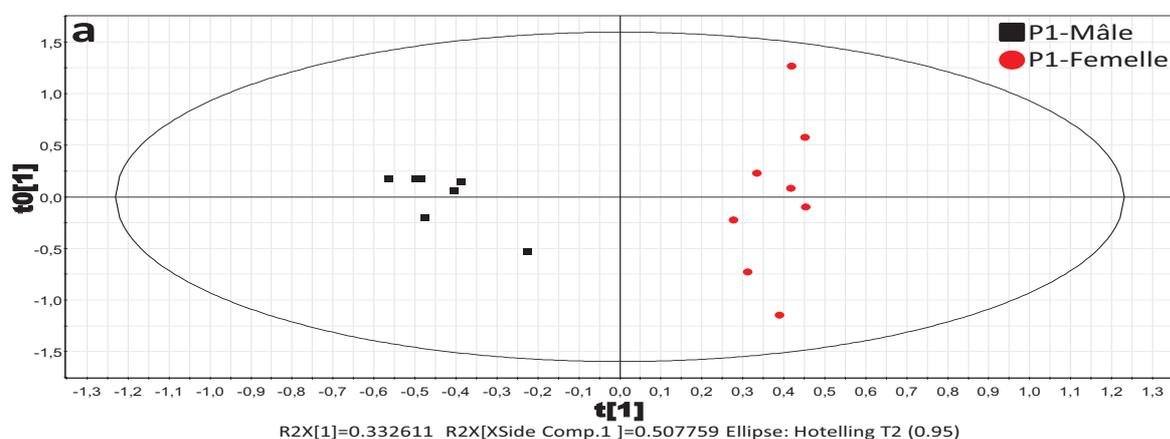
Tableau 9 : Valeurs d'acides gras (pourcentage des AGT) ségrégeants les rats soumis aux 4 régimes.

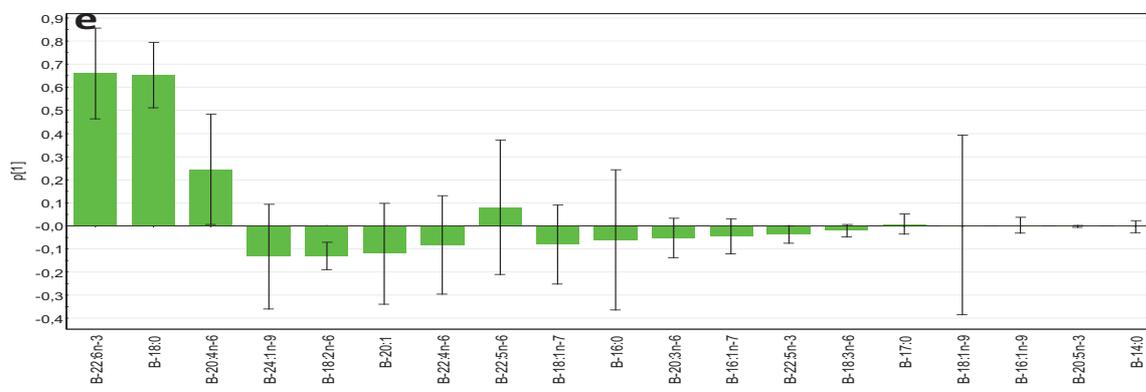
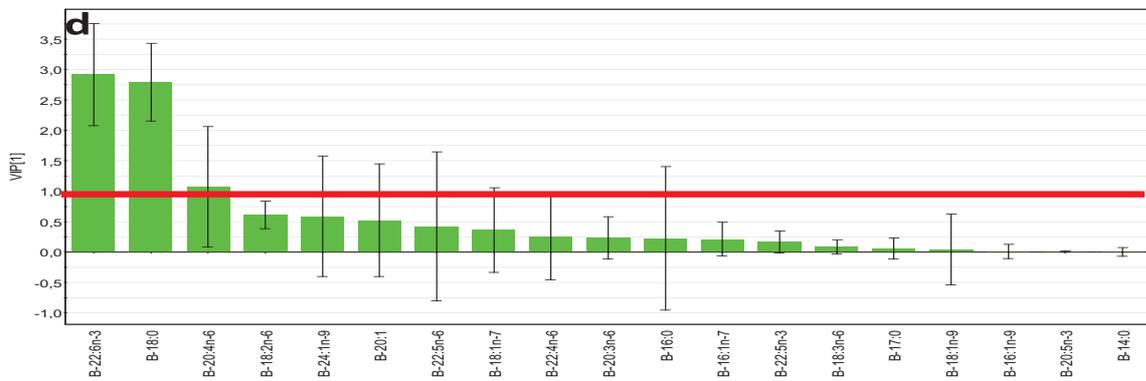
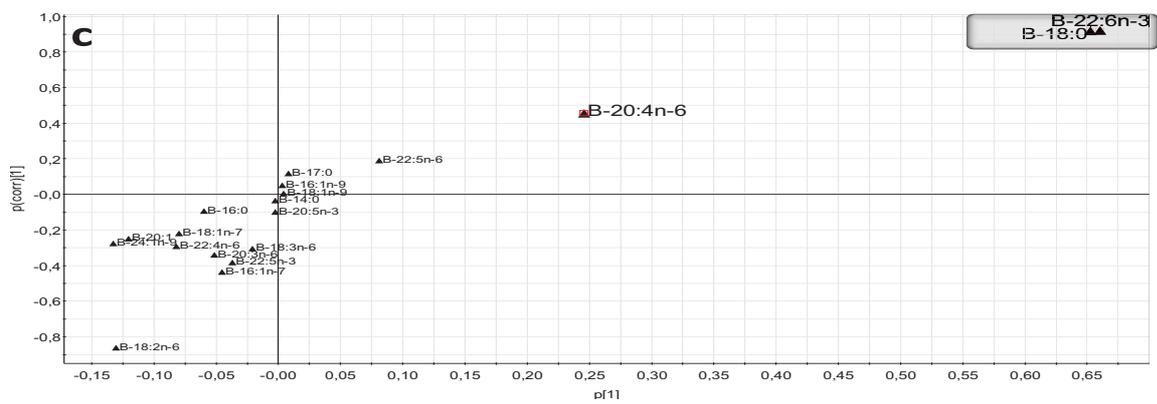
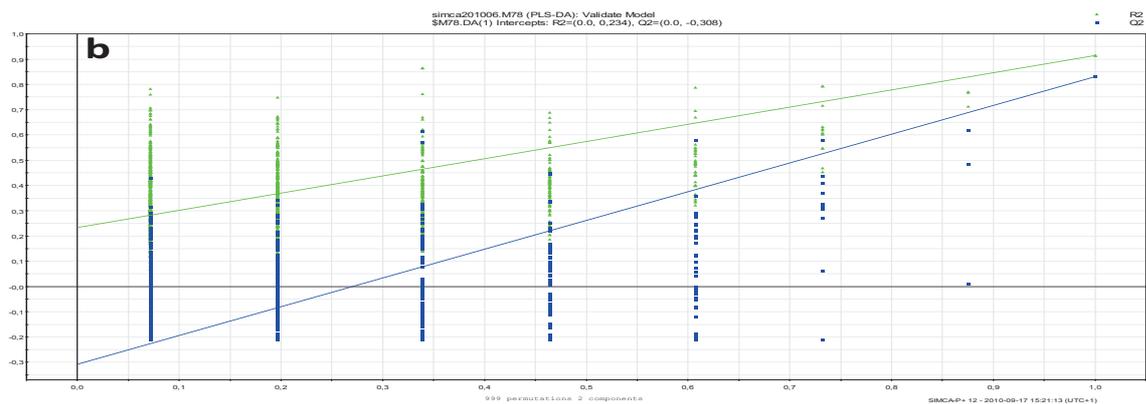
AG	P1	P2	B1	B2	p value		
					Effet régime	Effet sexe	Effet régime *Effet sexe
DHA	11,76±0,22 ^d	12,90±0,14 ^c	13,45±0,15 ^b	14,17±0,13 ^a	<0,0001	0,03	<0,0001
DPA n-6	2,58±0,07 ^a	2,13±0,06 ^b	2,22±0,06 ^b	1,47±0,05 ^c	<0,0001	0,16	<0,0001

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un acide gras ne partageant pas la même lettre est significativement différent, $p < 0.05$

On a ensuite identifié des acides gras cérébraux qui contribuent à différencier le groupe de rats mâles et femelles sous le régime P1 à l'aide d'une analyse supervisée de type OPLS-DA selon la procédure décrite précédemment. Le modèle peut décrire 84.0% de variables x ($R^2X=0.840$), 91.4% de la variation de réponse y ($R^2Y=0.914$) et prédire les 85.0% des variables de réponse y ($Q^2Y=0.850$). Les groupes de rats mâles et femelles sont nettement séparés par la première composante (Figure 28a). Le test de permutations (n=999) montre que ce modèle n'est pas le résultat d'un facteur aléatoire (Figure 28b). Les acides gras discriminatoires sont indiqués dans le S-plot (Figure 28c).

Figure 28 : Analyse en O2PLS-DA des acides gras cérébraux entre des rats sous régime P1. (a) carte des observations, (b) Test de permutation (n=999) effectué sur l'analyse PLS-DA. (c) S-plot permettant de visualiser les acides gras les plus sensibles aux régimes (marqués en rouge et dans la zone grise). (d) histogramme des indices VIP. (e) score des contributions individuelles pour distinguer l'effet régime, avec significatifon statistique obtenue par rééchantillonnage (intervalle de confiance Jack-knife à 99%).





Cette dernière figure indique que le contenu cérébral en DHA est significativement augmenté avec des rats femelles comparativement aux mâles sous le régime P1 (1.5%ALA-palme-mélange). Cet effet sexe est aboli lorsque l'on apporte du DHA (et ARA) préformé dans le régime P1, ou bien lorsque les rats sont nourris avec un régime à base de MGLA. (Tableau 10). La MGLA permet ainsi de niveler de façon identique le contenu en DHA du cerveau des rats entre mâles et femelles, au bénéfice des mâles qui rattrapent les valeurs observées chez les femelles. Cette donnée est intéressante dans la perspective de l'élaboration de formules infantiles qui soient aussi efficace selon le sexe.

Si l'on considère le régime et le sexe, on peut également conclure que le DHA est dans les deux cas l'acide gras le plus labile dans les structures cérébrales relativement à ces deux facteurs. Compte tenu de son rôle fonctionnel essentiel dans cet organe, ceci souligne encore l'attention qui doit être portée aux stratégies visant à optimiser les contenus en DHA dans les structures cérébrales. A cet égard, l'usage de formules à base de MGLA paraît être avantageux, d'une part en optimisant la bioconversion apparente de l'ALA en DHA, d'autre part en abolissant l'effet sexe.

Tableau 10 : DHA du cerveau (pourcentage des acides gras totaux). P1: mélange 1,5%ALA-palme; P2: mélange 1,5%ALA-palme avec DHA et ARA supplémentaire - B1: mélange 1.5%ALA-MGLA; B2: mélange 2.3%ALA-MGLA.

Groupe	AG	Mâles	Femelles	p value
P1	DHA -B	11,02±0,14	12,58±0,17	<0,0001
P2	DHA -B	12,91±0,21	12,88±0,18	0,92
B1	DHA -B	13,47±0,15	13,45±0,16	0,87
B2	DHA -B	14,31±0,16	14,05±0,19	0,32

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards.

2. Analyse des profils lipidomiques dans le cerveau (Lipidomics)

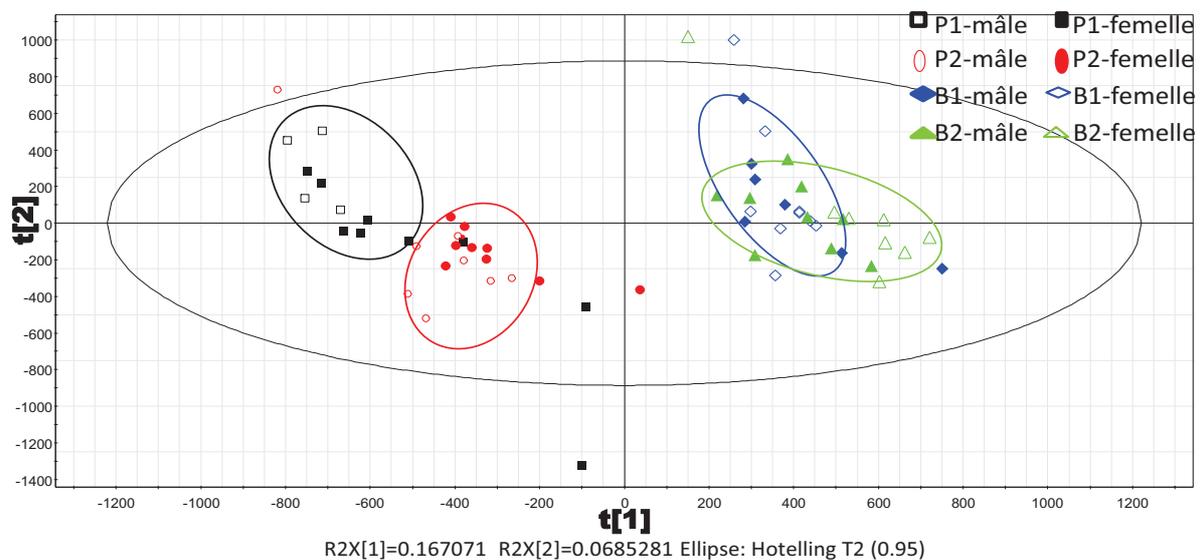
On a montré que la proportion cérébrale en DHA des rats en période de post-sevrage avaient été modifiée par l'effet des régimes à base d'huile de palme et de MGLA, et également mais de façon plus ténue en fonction du caractère sexuel.

Notre objectif suivant est d'examiner, au-delà des contenus en DHA et même en acides gras, si les stratégies nutritionnelles visant à optimiser les AGPI-LC n-3 peuvent également affecter le contenu des diverses espèces moléculaires de lipides dans le cerveau. Nous ne rapportons ici que les résultats obtenus avec les régimes décrits plus hauts, à la fois dans un but de concision et également en raison de l'exploitation complète des données qui n'est pas terminée à ce jour.

2.1. Analyse non supervisée de type ACP

Une analyse en Composante Principale (ACP) a été effectuée sur les 880 signaux intégrés de rats mâles et femelles sous 4 différents régimes (Figure 29).

Figure 29 : Analyse en ACP de lipidomes cérébraux des 4 groupes de rats ayant reçu 4 régimes différents. 7 composantes principales ont été calculées. L'axe horizontal représente la première composante principale modélisant 16,7% de la variance de la population, l'axe vertical représente la seconde composante principale modélisant 6,9% de la variation mesurée de la population (65,9% de la variance de la population peuvent être expliqués par les 7 composantes principales).



Les résultats obtenus (Figure 31) montrent que qu'il est possible de mettre en évidence une différence entre les profils de lipides cérébraux entre les 4 groupes d'animaux nourris avec différents régimes (P1, P2, B1 et B2). L'axe horizontal permet de séparer les différents régimes en fonction du type de matrice lipidique composant les régimes (l'huile palme et MGLA) avec, en se déplaçant de gauche à droite sur cette première composante les groupes à base d'huile de palme (P1 et P2) puis de MGLA (B1 et B2), expliquant 16,7% de la variance de la population. Dans ce modèle, seuls les groupes à base d'huile de palme sont séparés le long de la première composante, les groupes MGLA ne pouvant être distingués. La seconde composante principale, expliquant 6,8 % de la variance de la population, n'ajoute qu'une distinction supplémentaire marginale entre P1 et P2 et est de ce fait peu informative relativement aux spécificités des groupes. Contrairement aux profils en acides gras étudiés plus haut, le modèle d'ACP ne parvient pas à distinguer un effet lié au caractère sexuel s'agissant des profils lipidomiques.

En fait, les facteurs de variabilité biologique peuvent souvent cacher l'information recherchée, il est donc intéressant d'introduire une variable Y (dans notre cas le traitement avec les régimes P1, P2, B1 et B2) afin de réaliser une nouvelle analyse de type PLS qui permet de mieux mettre en évidence l'information liée à l'effet du régime.

2.2. Effet du régime sur le profil lipidomique dans le cerveau (Lipidomique)

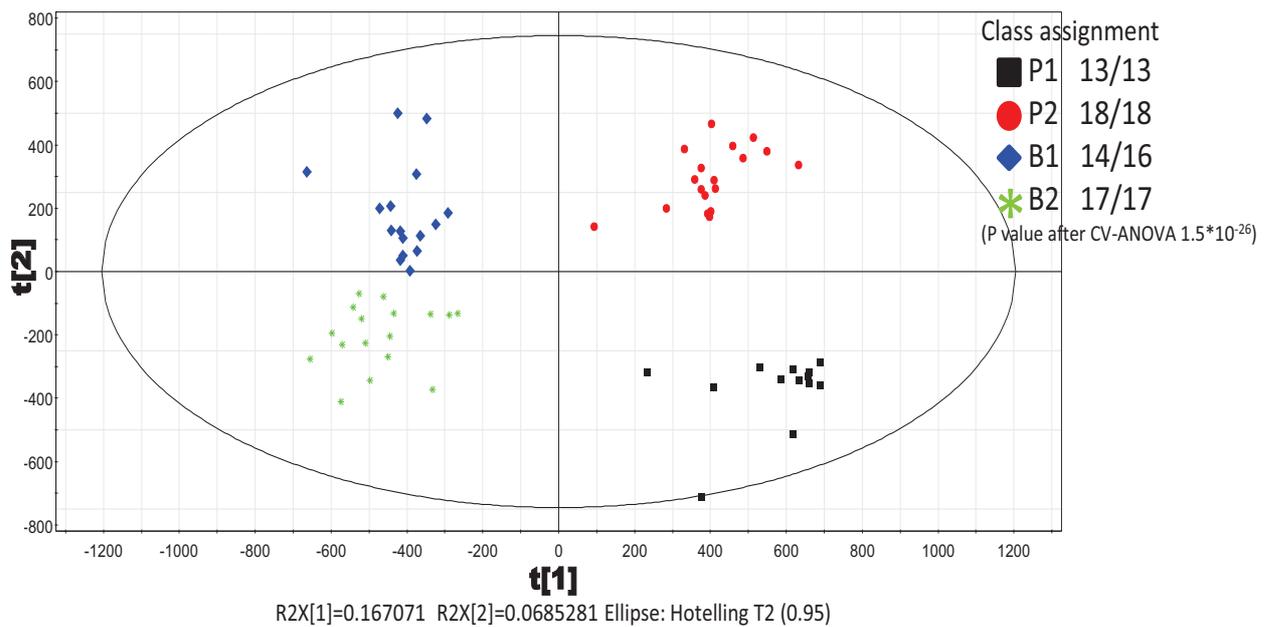
2.2.1 Analyse supervisée de type PLS-DA

Afin de diminuer l'influence des facteurs de variabilité autres que celui étudié (ici l'effet régime) et d'identifier les caractéristiques du profil des lipides cérébraux influencés par les divers types de graisses alimentaires, une variable Y (correspondant aux 4 groupes de régime) est introduite dans le jeu de données, et une analyse supervisée de type PLS discriminante (PLS-DA) est utilisée. (Figure 32). Le modèle peut décrire 23,6% de la variance des variables x ($R^2X=0.236$), expliquer 59.8% ($R^2Y=0.598$) de la variance de groupe y avec un indice de prédiction de 55 % ($Q^2Y=0.553$).

La capacité de classification des rats sous différents régimes après-sevrage est mise en évidence sur la figure 30. On peut noter que les animaux des groupes P1, P2, B1 et B2 se distinguent nettement, avec d'une part un effet type de matière grasse sur la première composante (palme contre MGLA), et un effet entre les régimes à même base lipidique sur la

seconde composante (P1 contre P2, B1 contre B2). Ce résultat indique que d'une part l'ajout de DHA et ARA préformés, et d'autre part que l'accroissement d'ALA de 1,5% à 2,5% peuvent modifier certaines caractéristiques des profils en lipides complexes du cerveau, au-delà du simple statut en acides gras comme vu plus haut.

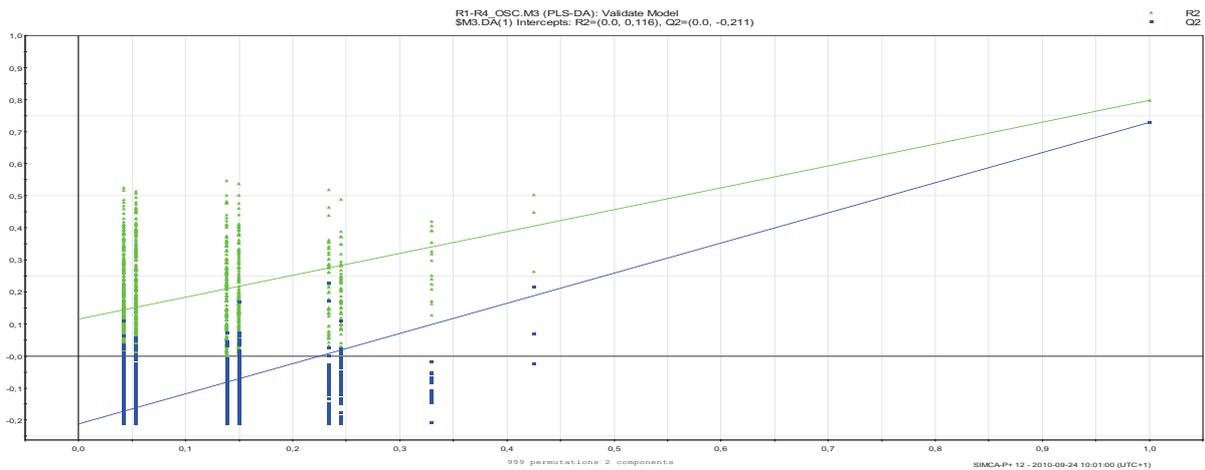
Figure 30 : Analyse en PLS-DA des lipides cérébraux de rats. Régime P1, mélange 1,5%ALA-palme; Régime P2, 1,5%ALA-palme et mélange DHA/ARA supplémentaire; Régime B1, mélange 1,5% ALA-beurre; Régime B2, mélange 2,3%ALA-beurre.



2.2.2 Validation du modèle PLS-DA

L'analyse PLS présentée en Figure 32 est fondée sur 880 ions détectés dans les 64 échantillons analysés. Puisque le nombre d'échantillons est nettement inférieur au nombre de variables, il est donc nécessaire de vérifier que la discrimination observée sur la Figure 31 n'est pas liée à des variables non significatives et par conséquent à un facteur aléatoire. Un test de permutations ($n=999$) est utilisé et présenté dans Figure 33. Les résultats indiquent clairement que les variables de $R^2(Y)$ et surtout de $Q^2(Y)$ deviennent plus faibles lorsque la variable Y est soumise à des permutations ($n=999$). Ils démontrent ainsi que le modèle n'est pas le résultat d'un facteur aléatoire mais d'une réelle différence observée entre les échantillons de rats post-sevrages sous différents régimes.

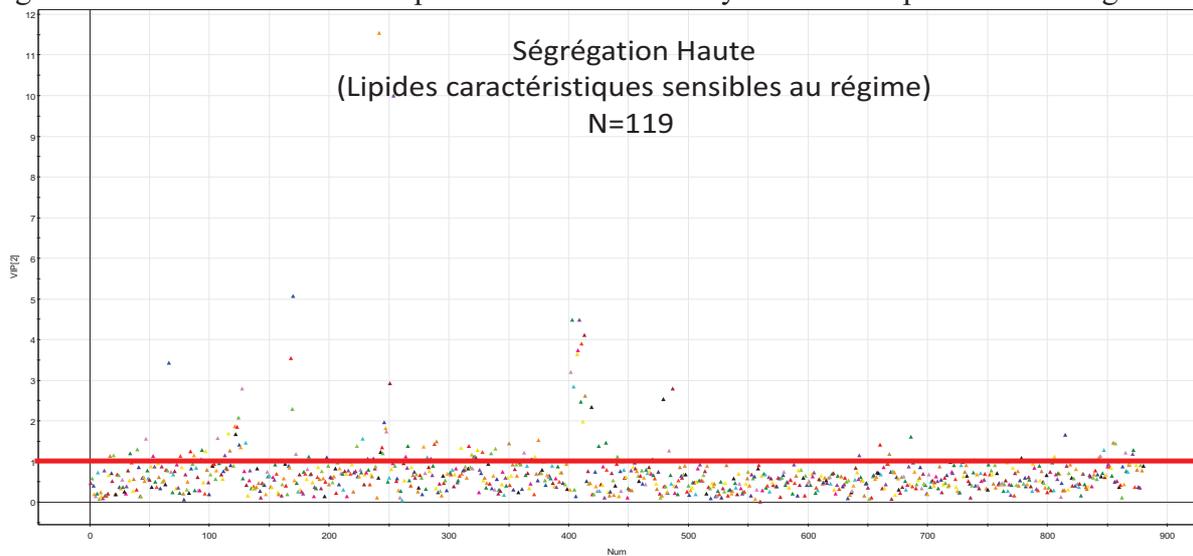
Figure 31 : Test de permutation effectué sur l'analyse PLS-DA présentée en figure 30



2.2.3 Réduction du nombre d'ion

L'objectif à ce stade est d'identifier un nombre relativement restreint d'ions qui contribuent le plus pour distinguer les différents groupes d'animaux nourris avec les 4 régimes P1, P2, B1 et B2. La solution consiste donc à sélectionner les variables sur la base de leur indice discriminatoire VIP et à rebâtir un modèle avec les variables sélectionnées. Après sélection VIP dont on a fixé la valeur seuil à 1 (Figure 32) seuls les ions qui ont fortement contribué à la ségrégation sont donc sélectionnés comme ions d'intérêt. Le nombre d'ions se réduit de 880 à 119.

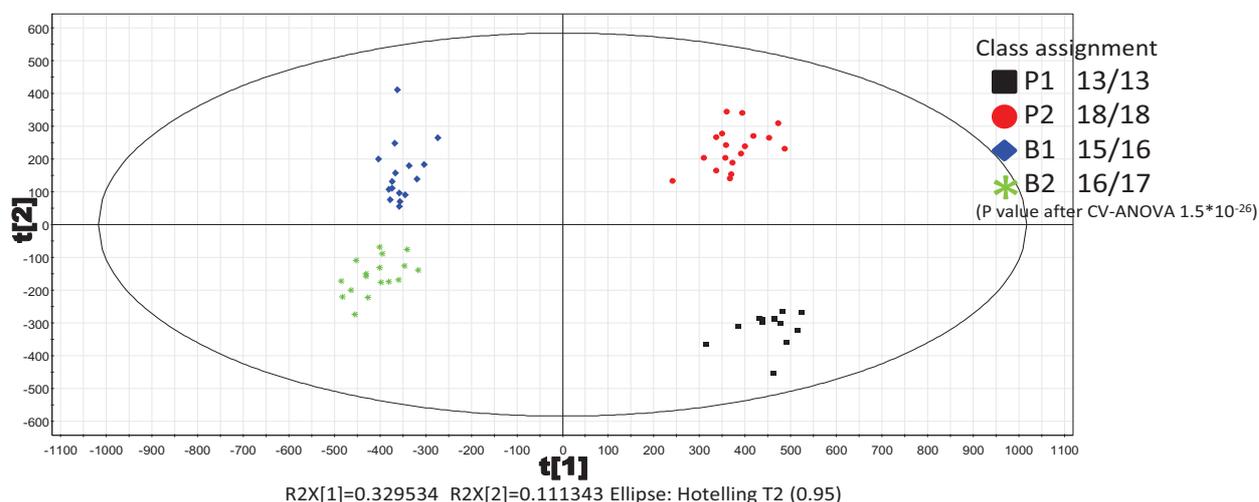
Figure 32 : Variables « VIP » plot effectué sur l'analyse PLS-DA présentée en figure 30



2.2.4 Nouveau modèle de PLS-DA calculs avec les ions sélectionnés

Un nouveau modèle supervisé de type PLS-DA est établi avec les 119 ions sélectionnés ci-dessus (Figure 33). Le modèle peut décrire 50.1% de la variance de ces 119 variables x ($R^2X=0.501$), 72.4% de la variance de groupe y ($R^2Y=0.724$) avec un indice de prédiction de 62.6% ($Q^2Y=0.626$). Ces indices d'explication et de prédiction sont supérieurs à ceux obtenus avec les 880 variables initiales (voir plus haut), surtout s'agissant de l'indice de prédiction Q^2Y .

Figure 33 : Analyse en PLS-DA des lipides cérébraux après sélection de variables régime P1, mélange 1,5%ALA-palme ; régime P2, mélange 1,5%ALA-palme et DHA/ARA supplémentaire- ; régime B1, mélange 1,5% ALA-beurre; régime B2, mélange 2,3%ALA-beurre.

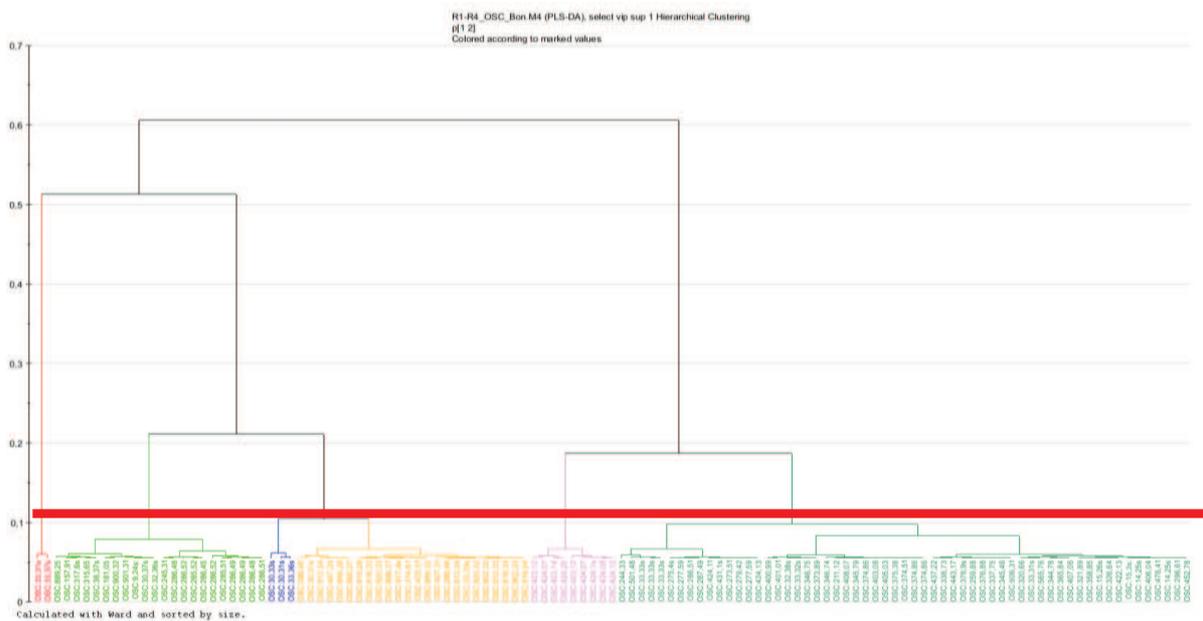


2.2.5 Classification des ions d'intérêt

Le but de cette procédure est de regrouper à l'aide d'un critère statistique les variables lipidiques qui sont proches. L'information contenue dans ces groupes de variables ainsi créées peut ensuite être « compressée » dans une variable composite (voir la description de cette procédure par PLS hiérarchique dans l'article s'agissant du calcul d'une variable composite prédictive des contenus en DHA du cerveau). Cette opération permet de simplifier l'interprétation en mettant en évidence des signatures biologiques simples reflétant des modifications complexes mesurées à l'aide des variables individuelles originales.

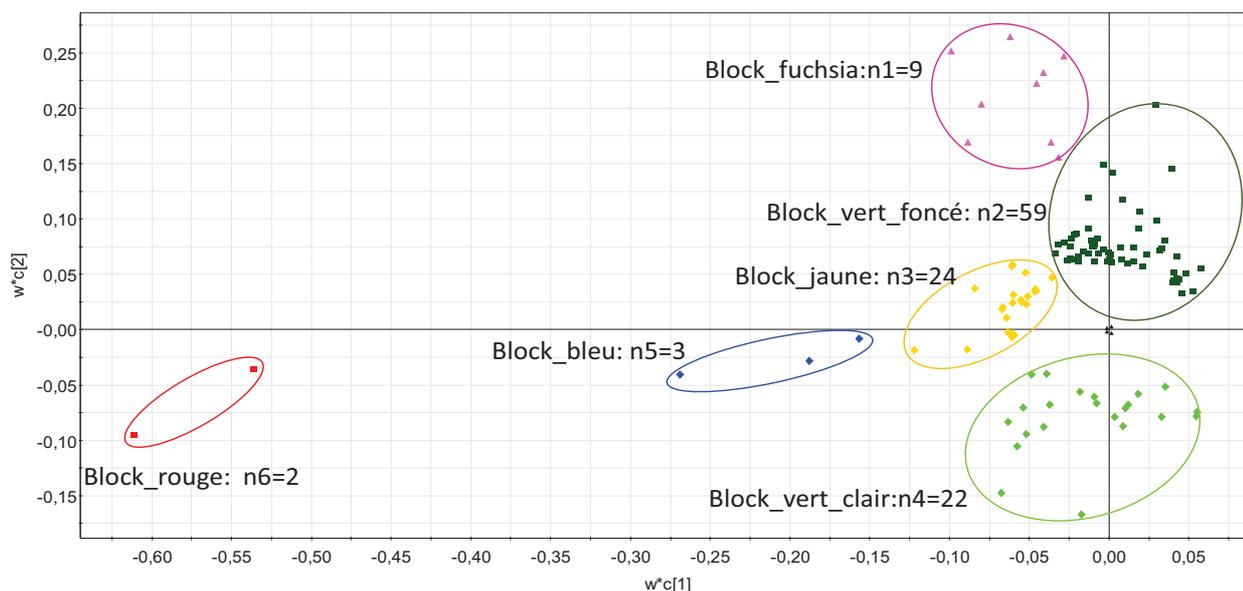
Le regroupement des variables lipidiques a été réalisé à l'aide d'une procédure de classification hiérarchique ascendante, utilisant la méthode de Ward de sériation. Les regroupements sont représentés à l'aide d'un arbre de sériation ou dendrogramme, dont les feuilles sont représentées par les variables, et les groupes par les branches (Figure 34). Les groupes de variables sont fixés par l'utilisateur, un seuil est fixé permettant de savoir combien l'arbre de décision possède de branches et ce nombre sera le nombre de groupes. On peut ici voir qu'en fixant le seuil à 0.1 on obtient six groupes de variables.

Figure 34 : Dendrogramme obtenu par classification hiérarchique ascendante des données présentée en figure 33



Ces groupes obtenus par classification hiérarchique peuvent également être visualisés sur la carte des variables de l'analyse discriminante PLS. Cette inspection visuelle permet ainsi de vérifier que les groupes déterminés par la méthode de classification hiérarchique ascendante correspondent bien à des variables statistiquement proches. La figure 35 met en évidence les 119 variables de lipides cérébraux caractéristiques qui ont été groupés en 6 blocks d'espèces de lipides caractérisant la signature lipidique de chaque traitement.

Figure 35 : carte des variables (Loading plot) représentant les 119 variables lipidiques sélectionnées en fonction de leur contribution à la composante 1, effectué sur l'analyse PLS-DA présentée en figure 33.



2.2.6 Changements des blocs de lipides induits par l'effet du régime

Chacun des 6 groupes de variables a ensuite été modélisés en autant de variables composites selon la procédure décrite plus haut de PLS hiérarchique (Wold et al. 1996).

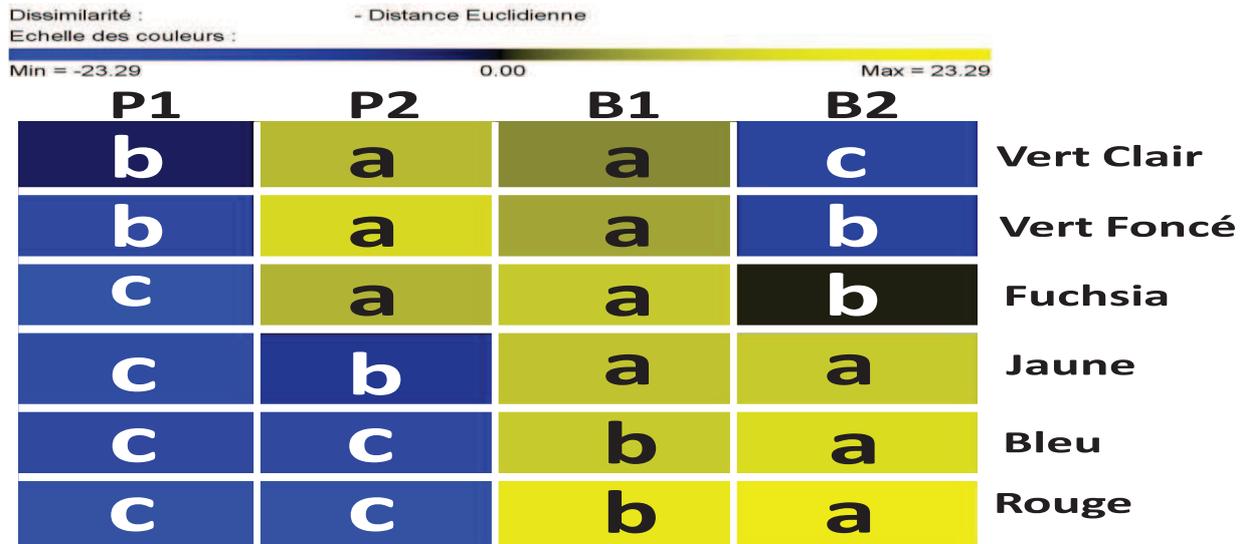
Cette procédure a permis de générer des valeurs semi-quantitatives pour chacune de ces variables composites et pour chacun des rats ($n = 6$ variables par rat). Les valeurs moyennes obtenus pour les rats ayant consommé les régimes P1, P2, B1 et B2 ont été calculées et représentées sous forme de code couleur pour mieux visualiser l'empreinte lipidomique cérébrale induite par chaque régime (Figure 36). Une ANOVA simple pour chaque variable composite (block) permet de distinguer s'il existe une différence statistique significative entre les groupes (test F de Fisher comme test post-hoc au seuil α 0,05).

L'analyse de cette signature lipidomique comprenant 119 variables regroupées en 6 ensembles permet immédiatement de mettre en évidence une réponse inverse entre les rats alimentés avec les régimes à base de palme comparativement à ceux alimentés avec les régimes à base de MGLA (P1 et B1 d'une part, P2 et B2 d'autre part).

L'ajout de DHA et ARA (P2) sur la base palme (P1) produit également un effet profond sur le profil lipidomique. Egalement, l'accroissement de l'ALA de 1,5% à 2,5%

modifie plus profondément une partie spécifique de la signature lipidomique (blocks « vert clairs », « vert foncé » et « fuchsia »).

Figure 36 : Les blocks ou variables composites correspondent aux regroupements calculés figure 35. Les couleurs correspondent à la valeur des scores des variables composites, reflet des changements induits par les régimes au niveau des 119 ions constitutifs. La couleur bleue indique un signe inverse à la couleur jaune, et l'intensité des couleurs correspondant à l'importance numérique des scores respectifs. Les lettres a,b,c,d indiquent si il existe une différence statistique entre P1, P2, B1 et B2 pour chaque block (ANOVA, $P < 0.05$)



Conclusion

En plus d'influencer les profils en acides gras du cerveau, la qualité des lipides alimentaires peut aussi fortement influencer sur les profils des lipides complexes dans cet organe. Notre étude démontre que les stratégies nutritionnelles visant à améliorer le statut en DHA du cerveau sont susceptibles de modifier d'autres composants lipidiques que celui initialement visé. La nature des changements lipidiques induits et les conséquences fonctionnelles possibles ne peuvent pas être ignorées et devraient sans doute être pris en considération pour rechercher les conditions optimales d'apports lipidiques pour le cerveau. Contrairement aux acides gras, une dichotomie sexuelle de la réponse lipidomique n'a pu être observée dans le cerveau. Les propositions d'identification des composés lipidiques les plus significativement modifiés dans chaque block par l'intervention nutritionnelle sont présentées dans le paragraphe suivant.

2.3. Identification des biomarqueurs lipidomiques caractéristiques des régimes dans les différents ensembles (blocks)

Nous avons ensuite tenté d'identifier les espèces moléculaires lipidiques les plus sensibles à l'influence des régimes parmi celles qui composaient la signature lipidomique. Pour cela, nous avons calculé la contribution individuelle de chaque variable pour constituer le score de chacune des 6 variables composites, sur la base de l'indice VIP.

Dans un but de simplification et à titre d'illustration, les figures et tableaux suivants reportent une sélection des variables les plus affectées par les divers régimes parmi toutes celles constituant les 6 ensembles de variables lipidomiques (sélection supplémentaire sur la base de l'indice VIP). Les figures 37 à 42 illustrent les variations d'intensité de certains de ces ions parmi les rats de chacun des groupes. Les tableaux 11 à 16 proposent des identifications possibles des espèces lipidiques les plus sensibles à l'influence des régimes P1, P2, B1 et B2.

Figure 37 : Block vert clair ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

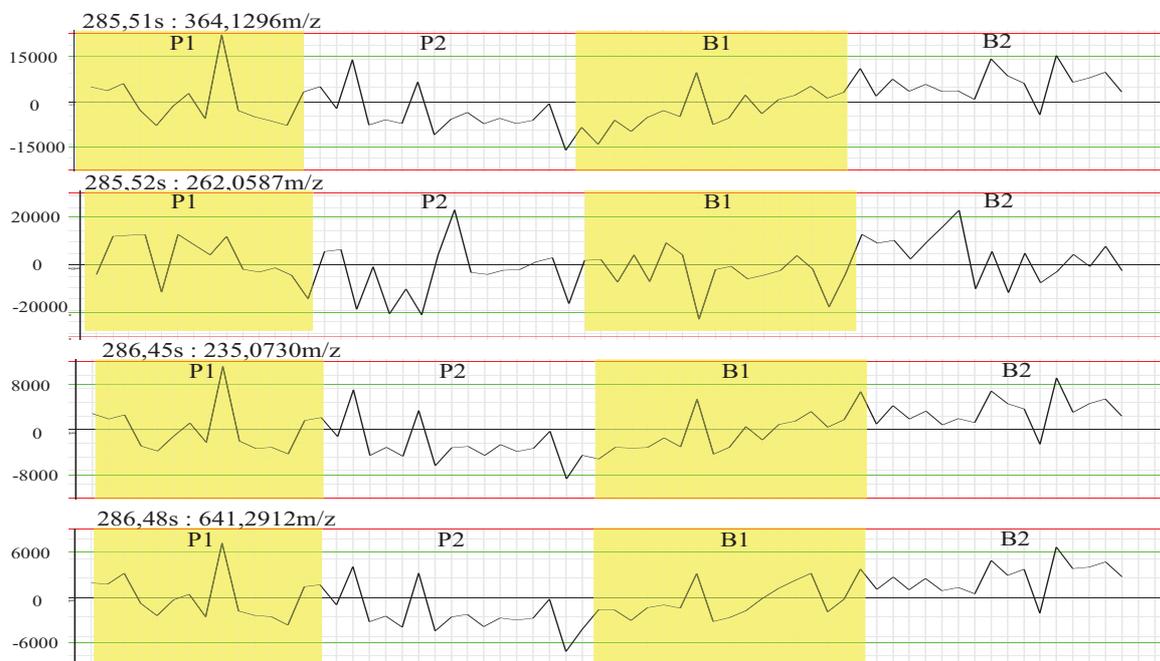


Tableau 11 : Block vert clair ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 22 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposé

TR(s)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
285,51	364,1296	-357,4±640,0 ^{bc}	-1509,3±502,4 ^c	-53,1±448,9 ^b	1921,3±358,0 ^a	<0,0001	
285,52	262,0587	-356,5±409,3 ^b	-808,2±346,4 ^b	50,6±286,6 ^b	1080,7±366,1 ^a	0,0003	
286,45	235,073	-550,8±501,2 ^{bc}	-1062,4±431,7 ^c	223,9±398,5 ^b	1335,4±337,9 ^a	0,0001	3,5,7,9,11-dodecapentaenoic acid
286,48	641,2912	-140,3±820,8 ^c	-1796,5±663,2 ^c	-614,4±501,2 ^b	2587,7±488,8 ^a	<0,0001	
286,49	298,1414	374,8±873,1 ^{ab}	-1823,7±706,9 ^c	-200,5±641,6 ^{bc}	1833,0±706,9 ^a	0,0004	
286,49	307,1505	-490,4±1000,6 ^{bc}	-2178,2±730,4 ^c	-43,4±675,5 ^b	2722,2±532,7 ^a	<0,0001	6alpha-Glucuronosylhydoxycholeate
286,51	437,7307	-261,0±1244,5 ^b	-2305,8±928,5 ^b	-965,5±772,2 ^b	3549,8±696,5 ^a	<0,0001	
286,52	307,6567	-59,2±491,3 ^b	-1005,9±233,0 ^b	-313,6±347,5 ^b	1405,5±423,8 ^a	<0,0001	
286,52	437,2284	-52,1±2451,5 ^b	-3976,3±1792,4 ^b	-2450,1±1635,8 ^b	6555,9±1274,7 ^a	<0,0001	tetracosatetraenoic acid n-6 (C24:4n-6)
889,25	815,5769	3885,6±2441,4 ^{ab}	-3922,9±2794,8 ^c	-3356,1±2119,5 ^{bc}	4341,0±2357,3 ^a	0,0504	

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas la même lettre est significativement différent, $p < 0.05$ (test F de Fisher après ANOVA).

Figure 38 : block vert foncé; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

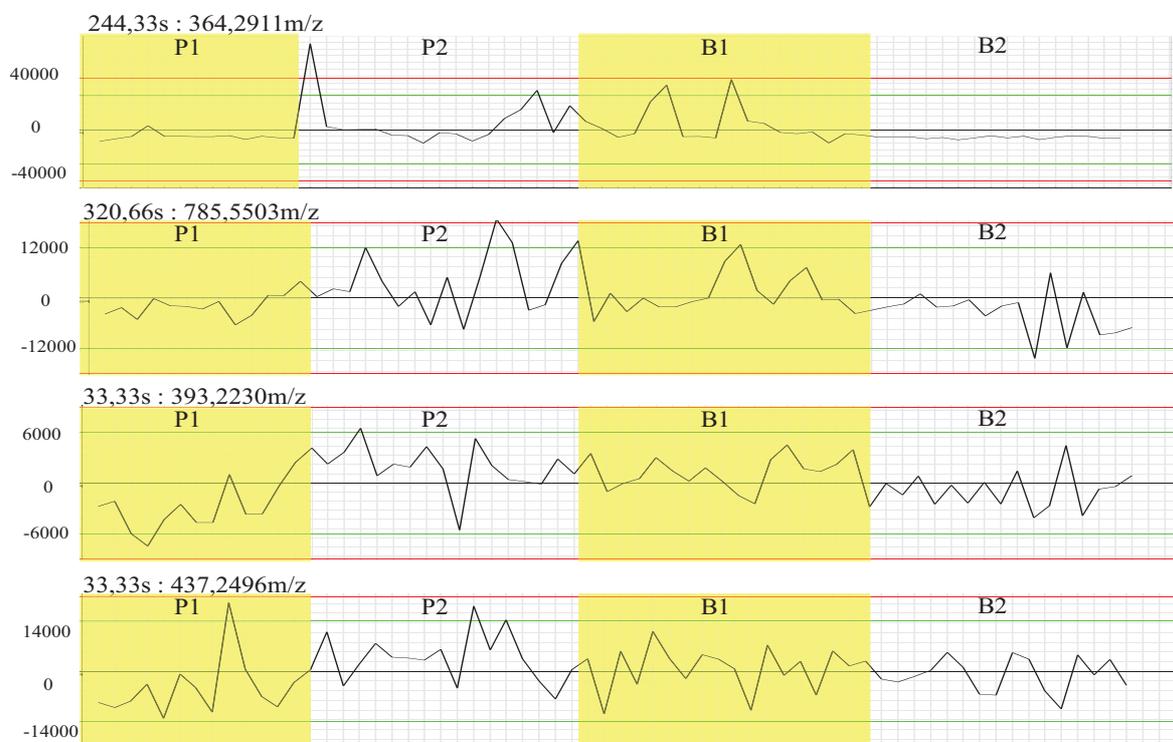


Tableau 12 : block vert foncé ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 59 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identifications proposées

TR(S)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
244,33	364,2911	-5729,6±749,4 ^{bc}	5875,2±4140,1 ^a	3647,9±3555,5 ^{ab}	-5731,6±237,7 ^c	0,014	
320,66	785,5503	-1147,4±567,0 ^b	1527,9±705,8 ^a	359,9±700,5 ^{ab}	-1079,2±634,6 ^b	0,0124	Arachidonoylmorpholine
33,33	393,223	-1498,0±672,8 ^b	1349,9±893,4 ^a	2282,5±1570,4 ^a	-2432,0±516,1 ^b	0,0017	PGF1α/PGF2α/PGE1
33,33	437,2496	-883,2±763,397 ^b	1349,9±631,2 ^a	1528,0±1129,1 ^a	-2192,0±397,7 ^b	0,0003	18-acetoxy-PGF2α-11-acetate
33,33	481,2785	-706,2±829,7 ^b	1580,9±504,3 ^a	700,2±860,9 ^a	-1792,8±379,5 ^b	<0,0001	PI(16:0/18:2(9Z,12Z))
346,75	245,2314	-818,3±325,3 ^{bc}	1841,7±816,9 ^a	-516,1±308,9 ^{ab}	-838,5±326,2 ^c	0,0009	
424,11	1190,9181	-2778,8±705,2 ^b	1891,1±571,8 ^a	1069,2±443,5 ^b	-883,6±489,5 ^b	<0,0001	
424,13	1191,4222	-2692,2±988,4 ^c	1478,9±635,1 ^a	871,884±480,1 ^a	-327,7±584,0 ^b	0,002	
431,1	785,6383	-4322,0±2125,0 ^c	3331,4±1429,5 ^a	588,5±1480,9 ^{ab}	-776,2±1054,4 ^b	0,0169	PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/dm16:0/0:0)
501,48	586,5313	-1809,1±776,5 ^b	3391,1±1780,2 ^a	1401,5±1168,7 ^a	-3526,2±1251,1 ^{ab}	0,0024	

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas le même lettre est significativement différent, $p < 0.05$ (test F de Fisher après ANOVA).

Figure 39 : block fuchsia ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

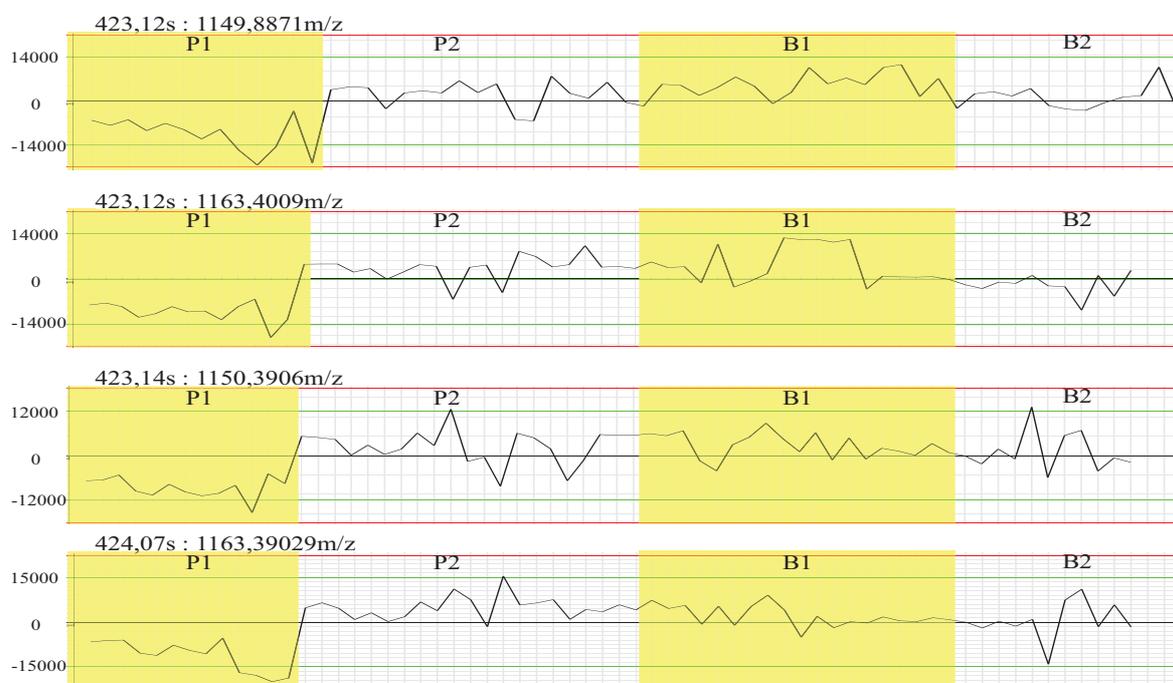


Tableau 13 : block fuchsia ; 9 ions les plus caractéristiques sur les 9 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée

TR(S)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
423,12	1149,8871	-9033,4±938,8 ^b	1563,3±1251,0 ^a	2895,6±1199,6 ^a	2527,4±1451,0 ^a	<0,0001	1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-3-keto-(25R)-hexaconsanol
423,12	1163,4009	-11072,6±1537,9 ^c	2109,6±971,2 ^b	5875,3±902,3 ^a	703,9±878,7 ^b	<0,0001	
423,14	1150,3906	-7080,9±987,3 ^b	3222,0±1874,3 ^a	1139,8±1405,1 ^a	930,5±803,8 ^a	<0,0001	
424,07	1163,9029	-8370,8±747,0 ^b	1850,9±1090,7 ^a	3662,3±833,0 ^a	994,5±1028,6 ^a	<0,0001	
424,07	1164,4041	-7550,2±975,8 ^c	3330,1±640,3 ^a	2002,4±631,1 ^{ab}	363,1±832,1 ^b	<0,0001	farnesylfarnesylgeraniol
424,08	1176,9116	-8821,7±734,6 ^c	2950,6±799,5 ^a	5020,0±1155,4 ^a	-1102,9±616,7 ^b	<0,0001	
424,12	1177,4144	-6910,3±1070,6 ^c	2921,4±929,3 ^a	3424,0±609,9 ^a	-1031,5±762,0 ^b	<0,0001	
424,1	1176,411	-6760,3±766,1 ^c	3422,5±718,6 ^a	3467,5±877,4 ^a	-1717,7±902,5 ^b	<0,0001	Cholesteryl lauric acid
424,25	1177,9176	-4261,1±949,7 ^b	1745,6±751,0 ^a	1768,8±743,4 ^a	-254,6±669,8 ^a	<0,0001	

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas le même lettre est significativement différent, $p < 0.05$ (test F de Fisher après ANOVA).

Figure 40 : block jaune ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

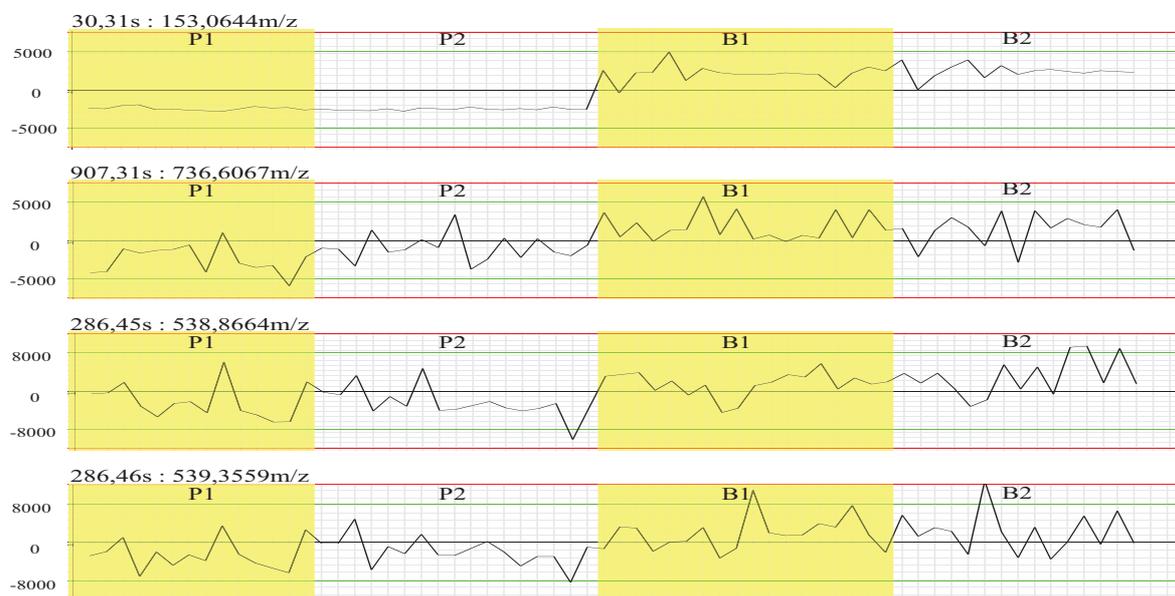


Tableau 14 : block jaune ; 10 ions les plus caractéristiques sur les 24 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée

TR(S)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
286,45	538,8664	-2367,0±930,6 ^b	-2086,2±731,8 ^b	1381,7±631,0 ^a	2718,6±850,1 ^a	<0,0001	Hiragonic acid (C16 fatty acyl) hexadecatrienoic acid (C14 fatty acyl)
286,46	539,3559	-1903,8±516,8 ^b	-998,4±463,7 ^b	1336,1±574,7 ^a	1255,4±648,6 ^a	0,0001	
30,31	153,0644	-2474,1±74,1 ^b	-2587,2±36,3 ^b	2162,2±292,7 ^a	2596,3±224,0 ^a	<0,0001	(24R,25R)-3alpha,7alpha,12alpha,24-Tetrahydroxy-5beta-cholestan-26-DGTS(16:0/18:2(9Z,12Z))
33,33	268,1115	-1705,4±276,6 ^b	-1073,3±272,1 ^b	1209,9±684,9 ^a	1301,8±800,8 ^a	0,0006	
900,27	1198,4271	-1189,8±303,8 ^b	-744,7±160,0 ^b	559,2±252,2 ^a	1172,1±250,2 ^a	<0,0001	PC(16:0/22:1(13Z)) ou PC(14:0/24:1(15Z))
907,31	736,6067	-2700,8±564,1 ^c	-1099,0±425,8 ^b	1708,4±481,6 ^a	1621,0±554,5 ^a	<0,0001	
913,34	767,0865	-1600,8±252,5 ^c	-664,9±256,5 ^b	778,5±291,6 ^a	1195,5±271,0 ^a	<0,0001	CerP(d18:1/24:0)
915,29	408,8285	-2159,5±437,7 ^c	-345,2±312,0 ^b	1294,4±548,8 ^a	798,6±312,3 ^a	<0,0001	
916,32	387,7919	-2210,1±382,9 ^c	-408,8±459,9 ^b	1379,4±486,0 ^a	824,6±445,6 ^{ab}	<0,0001	18:0-18:1-PI
920,32	452,2638	-1882,9±343,7 ^c	-524,2±467,7 ^b	708,5±396,5 ^a	1328,1±429,9 ^a	<0,0001	

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas le même lettre est significativement différent, p< 0.05 (test F de Fisher après ANOVA).

Figure 41 : block bleu ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

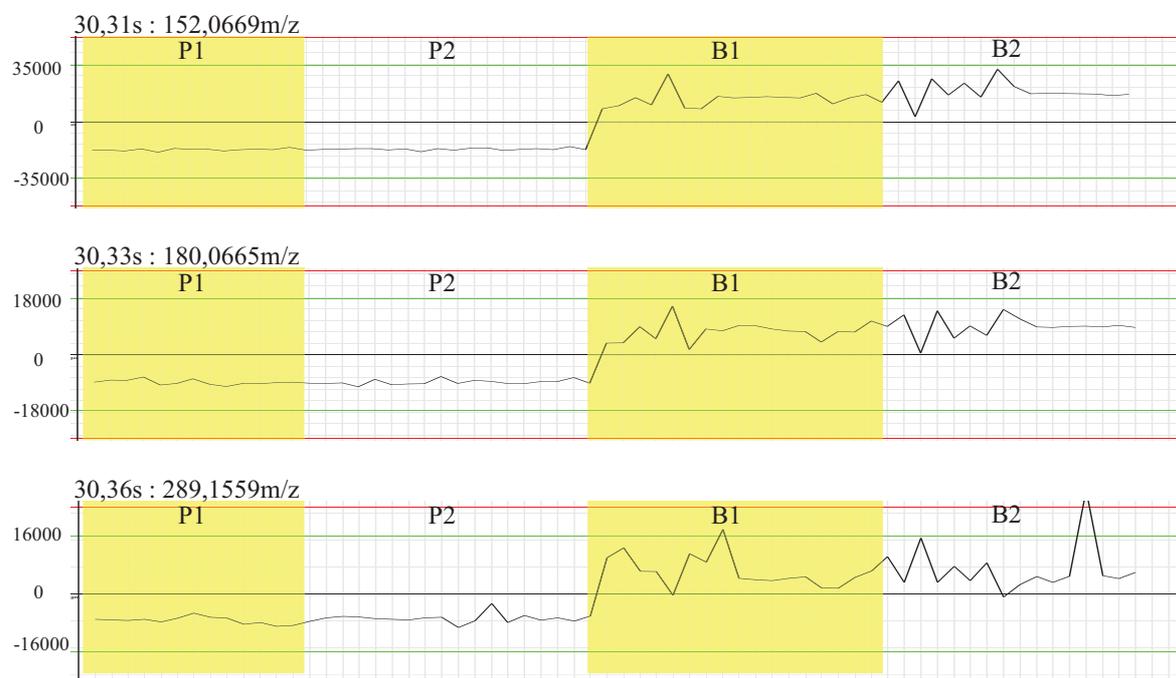


Tableau 15 : block bleu ; 3 ions les plus caractéristiques sur les 3 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée

TR(S)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
30,31	152,0669	-5969,8±155,3 ^c	-5970,2±127,8 ^c	4910,8±541,2 ^b	6264,6±542,0 ^a	<0,0001	
30,33	180,0665	-12243,5±146,3 ^c	-12025,0±118,7 ^c	9749,8±918,2 ^b	12918,7±1095,8 ^a	<0,0001	
33,36	289,1559	-4918,1±186,3 ^b	-4526,5±202,8 ^b	4209,6±786,2 ^a	4591,6±1084,9 ^a	<0,0001	7,10,13-hexadecatrienoic acid ou 4,7,10-hexadecatrienoic acid

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas le même lettre est significativement différent, p< 0.05 (test F de Fisher après ANOVA).

Figure 42 : le block rouge ; Variations d'intensité de certain lipides mesurés dans le cerveau des rats alimentés avec les 4 régimes P1, P2, B1, B4. Intensité en valeurs normées centrées après correction OSC. Les variables sont caractérisées par leur temps de rétention après élution chromatographique et par leur masse exacte /charge.

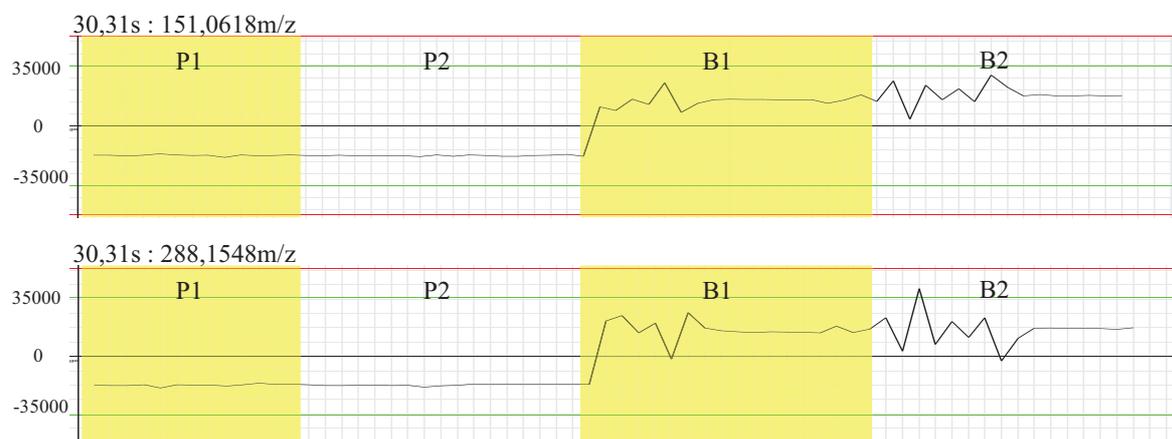


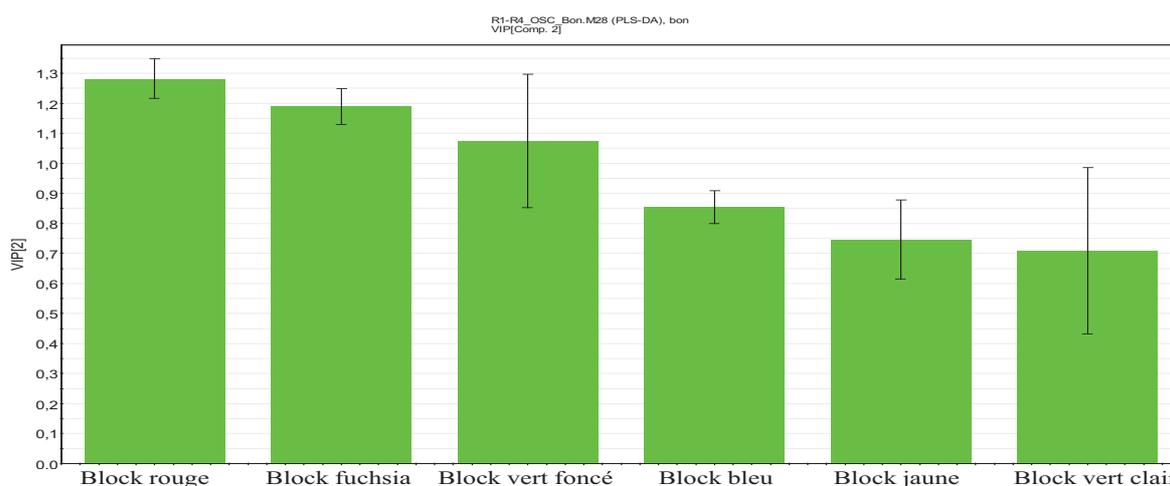
Tableau 16 : block rouge; 2 ions les plus caractéristiques sur les 2 constitutifs parmi les rats nourris avec les 4 régimes et leur identification proposée

TR(S)	Masse (m/z)	P1	P2	B1	B2	P value	espèces moléculaires
33,31	151,0618	5059,2±702,8 ^c	4463,6±145,3 ^c	109493,0±34994,8 ^b	139439,9±35747,7 ^a	<0,0001	
33,37	288,1548	1148,9±281,1 ^b	1488,2±206,1 ^b	90276,1±28307,0 ^a	104466,1±28405,0 ^a	<0,0001	Triterpenoid

*Les données représentent les moyennes ± erreurs standards. a, b, c, d : Un lipide ne partageant pas le même lettre est significativement différent, p< 0.05 (test F de Fisher après ANOVA).

Nous avons également calculé à partir du modèle hiérarchique quel était l'ensemble de variables parmi les 6 ensembles examinés qui était le plus sensible à l'influence nutritionnelle dans notre modèle. Le block rouge était celui qui était le plus affecté, puis le block fuchsia, le block vert foncé ; les blocks bleu, jaune et vert clair étaient moins sensiblement affectés, relativement (Figure 43).

Figure 43 : graphe VIP des ensembles lipidomiques sensibles à l'influence nutritionnelle de la figure 35

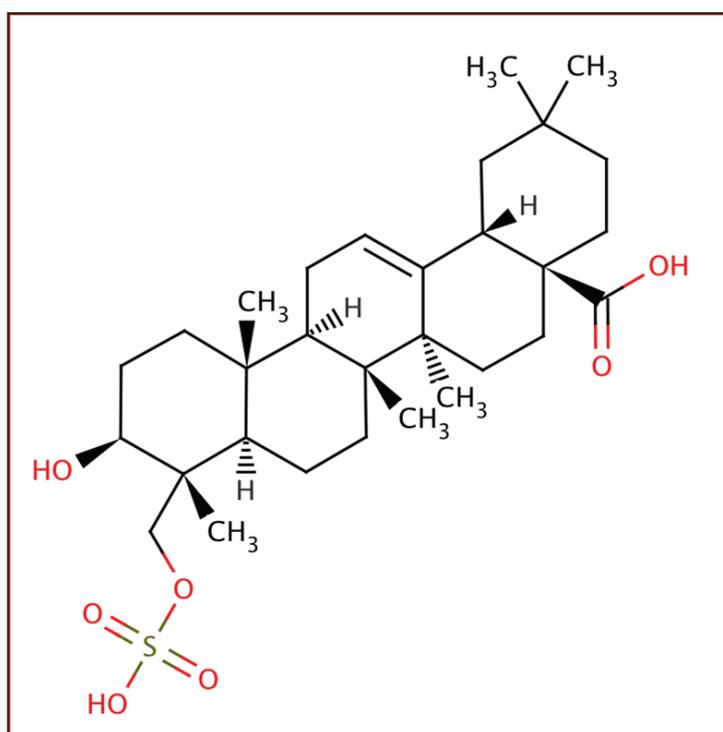


Nous avons ensuite recherché s'il était possible d'avoir des informations sur la nature des composés lipidiques constitutifs de ces blocks. La recherche sur MZedDB n'a permis d'obtenir qu'un nombre limité de suggestion de composés, sur la base des meilleures sélections de variables que nous avons retenues.

A titre d'exemple, la variable du block rouge élué à 33.37sec, d'une masse apparente de 288,1548 m/z est compatible avec un adduit sodium et hydrogène de triterpénoïde $[M+H+Na]^{2+}$ dont la masse exacte originale est de 552,312079 uma (Figure 44). Ce métabolite est enregistré dans la banque de données du métabolome humain sous le numéro HMDB04309 et est un intermédiaire du métabolisme du squalène, un précurseur de la synthèse du cholestérol. D'après nos données statistiques, il est parmi les métabolites le plus affecté par nos traitements nutritionnels, et est particulièrement augmenté par les régimes à base de MGLA. Nous avons également trouvé une autre structure compatible avec des métabolites issus du métabolisme du cholestérol, comme le farnesylfarnesyl geraniol (tableau 13, block fuchsia). Nous avons également identifié deux métabolites issus des acides biliaires, de façon surprenante : le 6alpha-Glucuronosylhyodeoxycholate (block vert clair) et le (24R, 25R)-3alpha,7alpha,12alpha,24-Tetrahydroxy-5beta-cholestan-26- (block jaune), tous deux

augmentés par les régimes B1 et B2 (surtout). Si ces structures peuvent être confirmées, il est vraisemblable que ces intermédiaires de la biosynthèse des acides biliaires se trouvaient dans le liquide céphalo-rachidien, issus de la circulation entéro-hépatique comme rapporté par ailleurs chez des sujets sains (Verhoeven et al. 1995). Les régimes pourraient avoir de ce fait un rôle majeur sur le métabolisme du cholestérol dans le cerveau.

Figure 44 : Triterpénoïde, formule brute $C_{30}H_{48}O_7S$, masse exacte 552,312079 uma



D'autres métabolites correspondent à des intermédiaires du métabolisme des AGPI, soient de biosynthèse ($C_{24}:4n-6$) soit de β -oxydation (7,10,13-hexadécatriénoïque acid ou 4,7,10-hexadécatriénoïque acid, higaronic acid, hexadécatriénoïque acid (C_{14} fatty acyl)). Parmi les autres composés dont nous proposons une identification, on note des messagers lipidiques (dérivés de prostaglandines, endocannabinoïde endogène –arachidonylemorpholine-), diverses espèces de glycérolipides, mais il est difficile à ce stade de pousser plus loin les interprétations sur la base de structures non confirmées.

Quoiqu'il en soit, nos résultats témoignent de la grande diversité des structures lipidiques qui peuvent être affectées sur la base d'une simple intervention nutritionnelle. Nos observations incitent à pousser plus loin les identifications, et ouvrent la voie à un nouveau champ d'investigations pour y associer des observations fonctionnelles.

Conclusion

Nos résultats, même s'ils ne donnent pas encore satisfaction à ce stade s'agissant de l'identification de la plupart des métabolites extraits par l'analyse statistique, nous paraissent intéressants car ils démontrent que des interventions nutritionnelles peuvent avoir un retentissement insoupçonné sur le lipidome du cerveau ; ces résultats vont bien au-delà de la simple modification de contenus en acides gras, et peuvent ouvrir la voie à de nouvelles recherches visant à améliorer le développement cérébral par des approches nutritionnelles.

**C
O
N
C
L
U
S
I
O
N**

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons apporté la preuve que l'incorporation du DHA dans le cerveau issue de l'ALA administré dans des proportions respectant les recommandations (rapport n-6/n-3 entre 5 et 10), peut être sensiblement améliorée en utilisant une matrice de matière grasse laitière plutôt qu'une matrice végétale à base d'huile de palme. De plus cette différence de matrice permet de gommer les différences liées au genre, en induisant une revalorisation des quantités de DHA obtenues chez le mâle soumis à un régime présentant les apports les plus faibles en ALA. Parmi les raisons qu'il semble raisonnable d'envisager pour expliquer cette propriété est la présence d'acides gras à courte (C4 à C8) et moyenne chaîne (C10 à C14) dans la matière grasse laitière dont est dépourvue la matière grasse végétale utilisée dans notre protocole. Ces acides gras ont la propriété d'être fortement β -oxydés dans les mitochondries du foie après avoir été ingérés (Curr and Harwood 1991; Decker 1996). Ils protégeraient de ce fait l'ALA de la dégradation et le rendrait alors plus disponible pour être utilisés dans les voies de désaturation et d'élongation des hépatocytes où l'activité spécifique de ces voies est élevée (Seaton 1986; Scalfi 1991; Dulloo 1996). Toutefois, cette hypothèse signifierait que les acides gras de la série n-6 bénéficient également de cet effet d'épargne ; ce n'est pas ce que nous avons observé ; les contenus en acide arachidonique des tissus, le principal acide gras à longue chaîne produit à partir de son précurseur LA, ne semblant pas suivre cette logique entre les rats nourris avec un régime à base de MGLA ou d'huile de palme. Au contraire, les contenus en ARA dans les globules rouges et le plasma étaient même significativement diminués parmi les rats nourris à base de MGLA (Tableaux 7 et 8 des données complémentaires de l'article). Cette observation n'est pas contradictoire avec notre hypothèse de l'épargne de l'ALA mais également de LA, si l'on considère la compétition pour les voies de désaturation et d'élongation entre les acides gras de la série n-3 et n-6, et qui s'exerce en faveur des n-3. Dans cette perspective, l'accroissement des AGPI-LC n-3 sur les n-6 traduit bien le potentiel supérieur de conversion de l'ALA sur le LA dans la situation nutritionnelle de notre protocole. Il s'agirait donc d'un système de production des AGPI-LC n-3 indépendant de celui de la régulation au niveau génique par le système métabolique des désaturases et des élongases. Cette observation correspond bien à nos résultats montrant que le système d'élongases/désaturases au niveau hépatique n'est pas associé aux contenus tissulaires en AGPI-LC, ainsi qu'aux conclusions de même nature de Tu et al (Tu et al. 2010). Ce système dépendrait plus de la disponibilité du substrat et donc d'une régulation par

transfert quantitatif spécifique à partir de l'ALA. Malgré ces fortes présomptions, il reste encore à apporter la confirmation à notre hypothèse. Notamment, nous n'avons pu évaluer si l'activité du système de désaturation/élongation au niveau du cerveau pouvait rendre compte au moins en partie des contenus cérébraux en DHA.

Un résultat inattendu de notre étude a été d'identifier l'acide nervonique, le C24 :1n-9, comme un acide gras clé dans l'équilibre entre les différents acides gras du cerveau, en forte interaction (négative) avec le DHA. Cet acide gras est un composé important des céramides constitutives de la gaine de myéline ; il s'agit donc là d'un acide gras à fort potentiel fonctionnel. Sa diminution concomitante à l'accroissement du DHA interroge et il conviendrait sans doute d'en déterminer tant la nature que les conséquences fonctionnelles potentielles. En particulier, il serait bon de savoir la typologie principale sur laquelle porte cette diminution (sphingolipides de myéline, phospholipides de neurones,.. ?), sur quelle zone fonctionnelle du cerveau, afin d'en tirer des conséquences potentielles.

La seconde partie du travail rapportée dans ce manuscrit était consacrée aux modifications des lipides structuraux du cerveau consécutivement à l'administration des régimes visant à accroître les AGPI-LC cérébraux. Jusqu'à présent peu d'études, à notre connaissance, ont examiné si la nature des lipides de régimes en période néonatale pouvait modifier les profils des espèces moléculaires de lipides structuraux dans le cerveau. Nous avons pour cela choisi d'utiliser une approche sans a priori d'analyse globale de lipidomique. C'est à notre sens la meilleure stratégie pour répertorier de nouvelles cibles moléculaires sensibles aux interventions nutritionnelles. Ainsi, nous avons pu déterminer que $119 \times 100 / 880 = 13,5\%$ des signaux lipidomiques détectés dans le cerveau étaient modifiés par les 4 régimes utilisés dans notre étude. Ces modifications ont permis de mettre en évidence une signature se composant de 6 ensembles spécifiquement modifiés par chacun des régimes. Certains éléments de cette signature pourraient être liés au métabolisme du cholestérol et des AGPI et à la synthèse de messagers lipidiques. Au-delà du simple profil en acides gras modifié par les régimes, la présente approche de lipidomique utilisée dans ce projet apporte un nouveau relief aux études nutritionnelles visant à améliorer le développement cérébral du nouveau né. Elle semble en effet intéressante pour révéler des conséquences insoupçonnées au niveau moléculaire des interventions nutritionnelles. Elle pourrait ainsi aider à guider les choix pour formuler des recommandations plus précises pour améliorer les laits infantiles. Quoiqu'il en soit, il s'agit à notre connaissance de la première étude de ce genre menée chez le jeune rat; il nous semble que cette étude apporte une preuve de principe pour sa faisabilité et son intérêt en nutrition néonatale.

Perspectives

Nous avons apporté des éléments forts en faveur de l'utilisation de formules infantiles à base de MGLA pour améliorer le statut cérébral en AGPI-LC n-3 (particulièrement le DHA) du nouveau-né et du jeune. Ces acides gras sont reconnus comme ayant un rôle majeur fonctionnel au niveau des structures cérébrales. En considérant que la période de maturation critique du cerveau se prolonge jusqu'à 5 ans chez l'humain, et que celle-ci n'est définitive que vers l'âge de 20 ans, nos résultats pourraient aider à la formulation de recommandations spécifiques en faveur de l'utilisation de matières grasses laitières.

D'un point de vue plus fondamental, il reste à comprendre comment la MGLA permet une meilleure bioconversion de l'ALA en ses dérivés à longues chaînes plus insaturées. Nous avons émis l'hypothèse d'un effet synergique avec les acides gras à courte et moyenne chaîne qui induiraient un effet d'épargne oxydative en faveur de l'ALA, le rendant ainsi plus biodisponible pour sa conversion en dérivés supérieurs. Ceci reste toutefois à démontrer. Le rôle spécifique de l'acide myristique présent en grande quantité dans la MGLA a déjà été évoqué comme un facteur pouvant favoriser la désaturation/ élongation des AGPI (Jan 2004; Dabadie 2005). L'utilisation de formules riches en acides gras saturés dépourvues de myristique ou ne contenant que du myristique comme acide gras à chaîne courte/moyenne pourrait apporter des réponses à ce sujet.

Les traitements statistiques novateurs que nous avons utilisés et issus des approches omiques, ont démontré leur intérêt pour faciliter l'interprétation des profilages d'acides gras à haut débit. Notamment, les résultats peuvent être facilement visualisés sous forme de carte, au lieu de tableaux complexes difficiles à lire ; également, ce type d'approche permet de prendre en compte les interactions entre acides gras, ce qui n'est pas possible avec les techniques classiques de statistiques univariés. A cet égard, nous avons pu calculer un nouvel indice d'acides gras à partir des mesures effectuées dans les globules rouges et le plasma, pour prédire les taux de DHA dans le cerveau. La performance prédictive de notre indice était meilleure en comparaison avec les indices proposés dans la littérature (Stark 2008). Cela tient sans doute au fait que nous avons considéré sans a priori les meilleurs prédicteurs et leurs interactions (approche descendante ou *top down*), alors que les indices publiés sont calculés à partir d'une sélection a priori d'acides gras sur la base d'une proximité métabolique (approche ascendante ou *bottom up*). Toutefois, la validité de notre stratégie et de notre indice reste

encore à confirmer dans d'autres conditions nutritionnelles et sur d'autres modèles expérimentaux.

Nous avons également apporté la preuve de principe pour l'utilisation d'approche globale de lipidomique pour évaluer le retentissement des interventions nutritionnelles au niveau des lipides du cerveau. Il reste encore à compléter notre phase de développement pour améliorer encore l'utilisation de cette approche, notamment au niveau de l'identification des composés identifiés par l'analyse statistique comme biomarqueurs. Cette phase passe par l'analyse des signaux sélectionnés en mode CID (collision ionization detection), générant des spectres de fragmentation plus informatif sur la nature des composés. La comparaison des spectres avec des banques de données suffisamment performante reste encore un nœud d'étranglement pour populariser cette approche.

Dans notre protocole initial, au-delà des résultats présentés dans ce manuscrit, nous avons étudié 3 groupes de mères nourries avec des régimes différents, ayant donné naissance à des rattons ayant reçu en post-sevrage divers régimes selon un protocole croisé. Nous avons aussi recueilli et préparé des échantillons de plasma à la fois chez les mères nourries et chez les petits nourris aux divers régimes. Notre objectif est de déterminer si il existe une empreinte métabolique maternelle qui est transmise aux petits et qui subsiste, même lorsque les jeunes sont soumis à un régime de rattrapage différent du régime de la mère. Cette approche entre dans le cadre des conséquences santé à long terme de l'imprégnation nutritionnelle maternelle. Nous comptons lancer prochainement cette nouvelle série d'analyses.

Enfin il sera intéressant d'évaluer, tout comme nous l'avons fait avec l'indice d'acides gras, s'il existe un indice métabolique dans le plasma associé à des signatures lipidomiques cérébrales spécifiques, en lien avec les régimes.

Références bibliographiques

- Ailhaud G, Massiera F, Weill P, Legrand P, Alessandri JM and Guesnet P (2006). "Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity." *Prog Lipid Res* **45** (3):203-36.
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G and Laviaille M (2004). "Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life." *Reprod Nutr Dev* **44**(6): 509-38.
- Anderson GJ, Connor WE and Corliss JD (1990). "Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina." *Pediatr Res* **27**(1): 89-97.
- Ariel A and Serhan CN (2007). "Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation." *Trends Immunol* **28**(4): 176-83.
- Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noisette N, Galan P and Hercberg S (2004). "Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women." *Lipids* **39**(6): 527-35.
- Bach AC, Ingenbleek Y and Frey A (1996). "The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy?" *J Lipid Res* **37**(4): 708-26.
- Bandeira-Melo C, Serra MF, Diaz BL, Cordeiro RS, Silva PM, Lenzi HL, Bakhle YS, Serhan CN and Martins MA (2000). "Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia." *J Immunol* **164**(2): 1029-36.
- Bazan NG (2003). "Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor." *J Lipid Res* **44**(12): 2221-33.
- Bazan NG (2006). "The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling." *Cell Mol Neurobiol* **26**(4-6): 901-13.
- Bazan NG (2007). "Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid: the Proctor Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(11): 4866-81; biography 4864-5.
- Beblo S, Reinhardt H, Demmelmair H, Muntau AC and Koletzko B (2007). "Effect of fish oil supplementation on fatty acid status, coordination, and fine motor skills in children with phenylketonuria." *J Pediatr* **150**(5): 479-84.
- Bennett DA and Waters MD (2000). "Applying biomarker research." *Environ Health Perspect* **108**(9): 907-10.
- Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG and Leibowitz MD (1996). "Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice." *Endocrinology* **137**(10): 4189-95.
- Borgeson CE, Pardini L, Pardini RS and Reitz RC (1989). "Effects of dietary fish oil on human mammary carcinoma and on lipid-metabolizing enzymes." *Lipids* **24**(4): 290-5.
- Brenna JT (2002). "Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**(2): 127-32.
- Bretillon L, Chardigny JM, Sebedio JL, Noel JP, Scrimgeour CM, Fernie CE, Loreau O, Gachon P and Beaufre B (2001). "Isomerization increases the postprandial oxidation of linoleic acid but not alpha-linolenic acid in men." *J Lipid Res* **42**(6): 995-7.

- Brody T, Rasband W, Baler K, Kuzin A, Kundu M and Odenwald WF (2007). "cis-Decoder discovers constellations of conserved DNA sequences shared among tissue-specific enhancers." Genome Biol **8**(5): R75.
- Broughton KS, Johnson CS, Pace BK, Liebman M and Kleppinger KM (1997). "Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production." Am J Clin Nutr **65**(4): 1011-7.
- Brown JD and Plutzky J (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets." Circulation **115**(4): 518-33.
- Burdge G (2004). "Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **7**(2): 137-44.
- Burdge GC (2006). "Metabolism of alpha-linolenic acid in humans." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 161-8.
- Burdge GC and Calder PC (2005). "Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults." Reprod Nutr Dev **45**(5): 581-97.
- Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM and Wootton SA (2003). "Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men." Br J Nutr **90**(2): 311-21.
- Burdge GC, Jones AE and Wootton SA (2002). "Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men*." Br J Nutr **88**(4): 355-63.
- Burdge GC and Wootton SA (2002). "Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women." Br J Nutr **88**(4): 411-20.
- Burdge GC and Wootton SA (2003). "Conversion of alpha-linolenic acid to palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids in men and women." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **69**(4): 283-90.
- Calder PC (2002). "Dietary modification of inflammation with lipids." Proc Nutr Soc **61**(3): 345-58.
- Calder PC (2006). "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1505S-1519S.
- Chavko M, Nemoto EM and Melick JA (1993). "Regional lipid composition in the rat brain." Mol Chem Neuropathol **18**(1-2): 123-31.
- Chiang N, Gronert K, Clish CB, O'Brien JA, Freeman MW and Serhan CN (1999). "Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion." J Clin Invest **104**(3): 309-16.
- Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC and Calder PC (2008). "Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues." Proc Nutr Soc **67**(1): 19-27.
- Cho HP, Nakamura M and Clarke SD (1999). "Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase." J Biol Chem **274**(52): 37335-9.
- Cho HP, Nakamura MT and Clarke SD (1999). "Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase." J Biol Chem **274**(1): 471-7.
- Chugani HT (1998). "A critical period of brain development: studies of cerebral glucose utilization with PET." Prev Med **27**(2): 184-8.
- Claria J and Serhan CN (1995). "Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9475-9.
- Cunnane SC, Ryan MA, Nadeau CR, Bazinet RP, Musa-Veloso K and McCloy U (2003). "Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis?" Lipids **38**(4): 477-84.

- Curr ML and Harwood JL (1991). "Lipid Biochemistry: an Introduction." ed 4. London, Chapman and Hall.
- Curtis CL, Hughes CE, Flannery CR, Little CB, Harwood JL and Caterson B (2000). "n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation." J Biol Chem **275**(2): 721-4.
- D'Andrea S, Guillou H, Jan S, Catheline D, Thibault JN, Bouriel M, Rioux V and Legrand P (2002). "The same rat Delta6-desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis." Biochem J **364**(Pt 1): 49-55.
- Dabadie H, Peuchant E, Bernard M, LeRuyet P and Mendy F (2005). "Moderate intake of myristic acid in sn-2 position has beneficial lipidic effects and enhances DHA of cholesteryl esters in an interventional study." J Nutr Biochem **16**(6): 375-82.
- Damsgaard CT, Lauritzen L, Kjaer TM, Holm PM, Fruekilde MB, Michaelsen KF and Frokiaer H (2007). "Fish oil supplementation modulates immune function in healthy infants." J Nutr **137**(4): 1031-6.
- Das UN (2008). "Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules." Lipids Health Dis **7**: 37.
- de Antueno RJ, Cantrill RC, Huang YS, Elliot M and Horrobin DF (1993). "Relationship between mouse liver delta 9 desaturase activity and plasma lipids." Lipids **28**(4): 285-90.
- Decker EA (1996). "The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition." Nutr Rev **54**(4 Pt 1): 108-10.
- DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM and Bray GA (2000). "Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans." Am J Clin Nutr **72**(4): 905-11.
- Demmelair H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T and Koletzko B (1995). "Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of 13C content." J Pediatr Gastroenterol Nutr **21**(1): 31-6.
- Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM, Hayes L, Holt PG, Sehmi R, Dunstan JA and Prescott SL (2005). "Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy." Pediatr Res **57**(2): 276-81.
- Desvergne B and Wahli W (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-88.
- Dhopeswarkar GA and Subramanian C (1976). "Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the developing brain: I. Metabolic transformations of intracranially administered 1-14C linolenic acid." Lipids **11**(1): 67-71.
- Diczfalusy U (1994). "Beta-oxidation of eicosanoids." Prog Lipid Res **33**(4): 403-28.
- Dulloo AG, Fathi M, Mensi N and Girardier L (1996). "Twenty-four-hour energy expenditure and urinary catecholamines of humans consuming low-to-moderate amounts of medium-chain triglycerides: a dose-response study in a human respiratory chamber." Eur J Clin Nutr **50**(3): 152-8.
- Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P and Foufelle F (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-48.
- Emken EA (1994). "Metabolism of dietary stearic acid relative to other fatty acids in human subjects." Am J Clin Nutr **60**(6 Suppl): 1023S-1028S.
- Engler MM, Engler MB, Malloy M, Chiu E, Besio D, Paul S, Stuehlinger M, Morrow J, Ridker P, Rifai N and Mietus-Snyder M (2004). "Docosahexaenoic acid restores endothelial function in children with hyperlipidemia: results from the EARLY study." Int J Clin Pharmacol Ther **42**(12): 672-9.

- Enoch HG, Catala A and Strittmatter P (1976). "Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid." *J Biol Chem* **251**(16): 5095-103.
- Enser M (1979). "The role of insulin in the regulation of stearic acid desaturase activity in liver and adipose tissue from obese--hyperglycaemic (ob/ob) and lean mice." *Biochem J* **180**(3): 551-8.
- Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Laviolle M and Alessandri JM (2010). "Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion." *J Nutr Biochem* **21**(3): 180-7.
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL and Dennis EA (2005). "A comprehensive classification system for lipids." *J Lipid Res* **46**(5): 839-61.
- Fewtrell MS (2006). "Long-chain polyunsaturated fatty acids in early life: effects on multiple health outcomes. A critical review of current status, gaps and knowledge." *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **57**: 203-14; discussion 215-21.
- Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE and Clandinin MT (2008). "Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates." *Br J Nutr* **99**(1): 91-9.
- Finnegan YE, Howarth D, Minihane AM, Kew S, Miller GJ, Calder PC and Williams CM (2003). "Plant and marine derived (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect blood coagulation and fibrinolytic factors in moderately hyperlipidemic humans." *J Nutr* **133**(7): 2210-3.
- Funk CD (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *Science* **294**(5548): 1871-5.
- Garcia-Calatayud S, Redondo C, Martin E, Ruiz JI, Garcia-Fuentes M and Sanjurjo P (2005). "Brain docosahexaenoic acid status and learning in young rats submitted to dietary long-chain polyunsaturated fatty acid deficiency and supplementation limited to lactation." *Pediatr Res* **57**(5 Pt 1): 719-23.
- Geyeregger R, Zeyda M and Stulnig TM (2006). "Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease." *Cell Mol Life Sci* **63**(5): 524-39.
- Ghys A, Bakker E, Hornstra G and van den Hout M (2002). "Red blood cell and plasma phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acid levels at birth and cognitive development at 4 years of age." *Early Hum Dev* **69**(1-2): 83-90.
- Gibson RA, Neumann MA and Makrides M (1997). "Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants." *Eur J Clin Nutr* **51**(9): 578-84.
- Giltay EJ, Gooren LJ, Toorians AW, Katan MB and Zock PL (2004). "Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects." *Am J Clin Nutr* **80**(5): 1167-74.
- Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB and Mensink RP (2006). "Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio." *Am J Clin Nutr* **84**(1): 44-53.
- Guesnet P, Alessandri JM, Vancasel S, Denis I and Laviolle M (2005). "Omega 3 fatty acids and functions of the central nervous system." *Nutrition clinique et métabolisme* **19**: 131-134.
- Guesnet P, Antoine JM, Rochette de Lempdes JB, Galent A and Durand G (1993). "Polyunsaturated fatty acid composition of human milk in France: changes during the course of lactation and regional differences." *Eur J Clin Nutr* **47**(10): 700-10.

- Harnack K, Andersen G and Somoza V (2009). "Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids." Nutr Metab (Lond) **6**: 8.
- Hayman LL, Meininger JC, Daniels SR, McCrindle BW, Helden L, Ross J, Dennison BA, Steinberger J and Williams CL (2007). "Primary prevention of cardiovascular disease in nursing practice: focus on children and youth: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." Circulation **116**(3): 344-57.
- Heird WC and Lapillonne A (2005). "The role of essential fatty acids in development." Annu Rev Nutr **25**: 549-71.
- Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T and Drevon CA (2001). "Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women." Pediatrics **108**(5): E82.
- Hertz R, Magenheim J, Berman I and Bar-Tana J (1998). "Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha." Nature **392**(6675): 512-6.
- Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Uauy R, Castaneda YS, Lapus MG and Wheaton DH (2000). "Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development." J Pediatr Gastroenterol Nutr **31**(5): 540-53.
- Horrobin DF (1993). "Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase." Am J Clin Nutr **57**(5 Suppl): 732S-736S; discussion 736S-737S.
- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I and Shimano H (1998). "Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5987-92.
- Igarashi M, DeMar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM and Rapoport SI (2007). "Upregulated liver conversion of alpha-linolenic acid to docosahexaenoic acid in rats on a 15 week n-3 PUFA-deficient diet." J Lipid Res **48**(1): 152-64.
- Innis SM (1991). "Essential fatty acids in growth and development." Prog Lipid Res **30**(1): 39-103.
- Innis SM (2003). "Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids." J Pediatr **143**(4 Suppl): S1-8.
- Innis SM (2005). "Essential fatty acid transfer and fetal development." Placenta **26 Suppl A**: S70-5.
- Innis SM and Friesen RW (2008). "Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants." Am J Clin Nutr **87**(3): 548-57.
- Innis SM, Gilley J and Werker J (2001). "Are human milk long-chain polyunsaturated fatty acids related to visual and neural development in breast-fed term infants?" J Pediatr **139**(4): 532-8.
- Innis SM, Vaghri Z and King DJ (2004). "n-6 Docosapentaenoic acid is not a predictor of low docosahexaenoic acid status in Canadian preschool children." Am J Clin Nutr **80**(3): 768-73.
- Isaac G, Fredriksson A, Danielsson R, Eriksson P and Bergquist J (2006). "Brain lipid composition in postnatal iron-induced motor behavior alterations following chronic neuroleptic administration in mice." Febs J **273**(10): 2232-43.
- James MJ, Ursin VM and Cleland LG (2003). "Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids." Am J Clin Nutr **77**(5): 1140-5.

- Jan S, Guillou H, D'Andrea S, Daval S, Bouriel M, Rioux V and Legrand P (2004). "Myristic acid increases delta6-desaturase activity in cultured rat hepatocytes." Reprod Nutr Dev **44**(2): 131-40.
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ and Mangelsdorf DJ (1999). "Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 266-71.
- Jensen RG (1989). "Lipids in human milk composition and fat soluble vitamins." In: Lebenthal E, ed. Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy. 2nd edn. New York: Raven Press: 157-208.
- Jensen RG (1996). "The lipids in human milk." Prog Lipid Res **35**(1): 53-92.
- Jones AE, Murphy JL, Stolinski M and Wootton SA (1998). "The effect of age and gender on the metabolic disposal of [1-13C] palmitic acid." Eur J Clin Nutr **52**(1): 22-8.
- Jones AE, Stolinski M, Smith RD, Murphy JL and Wootton SA (1999). "Effect of fatty acid chain length and saturation on the gastrointestinal handling and metabolic disposal of dietary fatty acids in women." Br J Nutr **81**(1): 37-43.
- Jones PJ, Pencharz PB, Bell L and Clandinin MT (1985). "Model for determination of 13C substrate oxidation rates in humans in the fed state." Am J Clin Nutr **41**(6): 1277-82.
- Jump DB (2002). "Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription." Curr Opin Lipidol **13**(2): 155-64.
- Jump DB (2008). "N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription." Curr Opin Lipidol **19**(3): 242-7.
- Katan MB, Deslypere JP, van Birgelen AP, Penders M and Zegwaard M (1997). "Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study." J Lipid Res **38**(10): 2012-22.
- Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K and Wahli W (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2160-4.
- Kim HY, Bigelow J and Kevala JH (2004). "Substrate preference in phosphatidylserine biosynthesis for docosahexaenoic acid containing species." Biochemistry **43**(4): 1030-6.
- Klein CJ (2002). "Nutrient requirements for preterm infant formulas." J Nutr **132**(6 Suppl 1): 1395S-577S.
- Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM and Lehmann JM (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4318-23.
- Koletzko B, Demmelmair H and Socha P (1998). "Nutritional support of infants and children: supply and metabolism of lipids." Baillieres Clin Gastroenterol **12**(4): 671-96.
- Koletzko B, Tsang R, Zlotkin SH, Nichols B and Hansen J (1997). "(eds): Nutrition During Infancy: Principles and practice." ed 1. Cincinnati, Digital Educational Publishing: pp 123-153.
- Kouba M, Bernard-Griffiths MA and Lemarchal P (1993). "Liver stearyl-CoA desaturase activity and fatness in birds. In vitro studies in the growing turkey and chicken." Comp Biochem Physiol Comp Physiol **105**(2): 359-62.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG and Wahli W (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." Mol Endocrinol **11**(6): 779-91.

- Lagarde M, Geloën A, Record M, Vance D and Spener F (2003). "Lipidomics is emerging." Biochim Biophys Acta **1634**(3): 61.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH and Michaelsen KF (2001). "The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina." Prog Lipid Res **40**(1-2): 1-94.
- Lauritzen L, Jørgensen MH, Mikkelsen TB, Skovgaard M, Straarup EM, Olsen SF, Hoy CE and Michaelsen KF (2004). "Maternal fish oil supplementation in lactation: effect on visual acuity and n-3 fatty acid content of infant erythrocytes." Lipids **39**(3): 195-206.
- Lee J and Hwang DH (2008). "Dietary fatty acids and eicosanoids; in Chow CK (ed): *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*." London, CRC Press: pp 713–739.
- Legrand P and Hermier D (1992). "Hepatic delta 9 desaturation and plasma VLDL level in genetically lean and fat chickens." Int J Obes Relat Metab Disord **16**(4): 289-94.
- lepage G and Roy CC (1986). "Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction." J. Lipid Res. **27**: 114–120.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K and Serhan CN (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." Nat Immunol **2**(7): 612-9.
- Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ and Serhan CN (2007). "Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness." J Immunol **178**(1): 496-502.
- Leyton J, Drury PJ and Crawford MA (1987). "Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat." Br J Nutr **57**(3): 383-93.
- Li J, Ding SF, Habib NA, Fermor BF, Wood CB and Gilmour RS (1994). "Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues." Int J Cancer **57**(3): 348-52.
- Lin YH and Salem N, Jr. (2007). "Whole body distribution of deuterated linoleic and alpha-linolenic acids and their metabolites in the rat." J Lipid Res **48**(12): 2709-24.
- Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reilly MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A and Thomas C (2003). "Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project." Toxicol Appl Pharmacol **187**(3): 137-46.
- Liou YA, King DJ, Zibrik D and Innis SM (2007). "Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men." J Nutr **137**(4): 945-52.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR and Chapkin RS (2004). "n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research." J Nutr Biochem **15**(11): 700-6.
- Malcolm CA, McCulloch DL, Montgomery C, Shepherd A and Weaver LT (2003). "Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **88**(5): F383-90.
- Manach C, Hubert J, Llorach R and Scalbert A (2009). "The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics." Mol Nutr Food Res **53**(10): 1303-15.
- Marangoni F, Agostoni C, Lammardo AM, Bonvissuto M, Giovannini M, Galli C and Riva E (2002). "Polyunsaturated fatty acids in maternal plasma and in breast milk." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(5-6): 535-40.

- McCloy U, Ryan MA, Pencharz PB, Ross RJ and Cunnane SC (2004). "A comparison of the metabolism of eighteen-carbon ¹³C-unsaturated fatty acids in healthy women." J Lipid Res **45**(3): 474-85.
- Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ and Howe PR (2003). "Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids." Lipids **38**(4): 391-8.
- Moore SA (1993). "Cerebral endothelium and astrocytes cooperate in supplying docosahexaenoic acid to neurons." Adv Exp Med Biol **331**: 229-33.
- Moore SA (2001). "Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro." J Mol Neurosci **16**(2-3): 195-200; discussion 215-21.
- Moore SA, Hurt E, Yoder E, Sprecher H and Spector AA (1995). "Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid." J Lipid Res **36**(11): 2433-43.
- Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN and Bazan NG (2004). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8491-6.
- Muller M and Kersten S (2003). "Nutrigenomics: goals and strategies." Nat Rev Genet **4**(4): 315-22.
- Mutch DM, Wahli W and Williamson G (2005). "Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition." Faseb J **19**(12): 1602-16.
- Nettleton JA (1991). "Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition." J Am Diet Assoc **91**(3): 331-7.
- Niemoller TD and Bazan NG (2010). "Docosahexaenoic acid neurolipidomics." Prostaglandins Other Lipid Mediat **91**(3-4): 85-9.
- Niinikoski H, Lagstrom H, Jokinen E, Siltala M, Ronnema T, Viikari J, Raitakari OT, Jula A, Marniemi J, Nanto-Salonen K and Simell O (2007). "Impact of repeated dietary counseling between infancy and 14 years of age on dietary intakes and serum lipids and lipoproteins: the STRIP study." Circulation **116**(9): 1032-40.
- Niu SL, Mitchell DC, Lim SY, Wen ZM, Kim HY, Salem N, Jr. and Litman BJ (2004). "Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency." J Biol Chem **279**(30): 31098-104.
- Ottosson UB, Lagrelius A, Rosing U and von Schoultz B (1984). "Relative fatty acid composition of lecithin during postmenopausal replacement therapy--a comparison between ethinyl estradiol and estradiol valerate." Gynecol Obstet Invest **18**(6): 296-302.
- Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL and Brown MS (2001). "Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6027-32.
- Paillard F, Catheline D, Duff FL, Bouriel M, Deugnier Y, Pouchard M, Daubert JC and Legrand P (2008). "Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity." Nutr Metab Cardiovasc Dis **18**(6): 436-40.
- Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y and Salem N, Jr. (2003). "n-3 fatty acid metabolism in women." Br J Nutr **90**(5): 993-4; discussion 994-5.
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA and Salem N, Jr. (2001). "Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans." J Lipid Res **42**(8): 1257-65.

- Pawlosky RJ, Hibbeln JR and Salem N, Jr. (2007). "Compartmental analyses of plasma n-3 essential fatty acids among male and female smokers and nonsmokers." J Lipid Res **48**(4): 935-43.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE and Mangelsdorf DJ (1998). "Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." Cell **93**(5): 693-704.
- Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, Alessandri JM, Durand G, Latge C and Guesnet P (2001). "Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat." Lipids **36**(8): 793-800.
- Rapoport SI, Rao JS and Igarashi M (2007). "Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **77**(5-6): 251-61.
- Rioux V, Lemarchal P and Legrand P (2000). "Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes." J Nutr Biochem **11**(4): 198-207.
- Roux A, Lison D, Junot C and Heilier JF (2010). "Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review." Clin Biochem.
- Ryan D and Robards K (2006). "Metabolomics: The greatest omics of them all?" Anal Chem **78**(23): 7954-8.
- Salem N, Jr., Pawlosky R, Wegher B and Hibbeln J (1999). "In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **60**(5-6): 407-10.
- Sampath H and Ntambi JM (2005). "Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism." Annu Rev Nutr **25**: 317-40.
- SanGiovanni JP, Berkey CS, Dwyer JT and Colditz GA (2000). "Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review." Early Hum Dev **57**(3): 165-88.
- Sauerwald TU, Hachey DL, Jensen CL, Chen H, Anderson RE and Heird WC (1997). "Intermediates in endogenous synthesis of C22:6 omega 3 and C20:4 omega 6 by term and preterm infants." Pediatr Res **41**(2): 183-7.
- Scalfi L, Coltorti A and Contaldo F (1991). "Postprandial thermogenesis in lean and obese subjects after meals supplemented with medium-chain and long-chain triglycerides." Am J Clin Nutr **53**(5): 1130-3.
- Schoonjans K, Brendel C, Mangelsdorf D and Auwerx J (2000). "Sterols and gene expression: control of affluence." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 114-25.
- Schwarz E, Prabakaran S, Whitfield P, Major H, Leweke FM, Koethe D, McKenna P and Bahn S (2008). "High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides." J Proteome Res **7**(10): 4266-77.
- Seaton TB, Welle SL, Warenko MK and Campbell RG (1986). "Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man." Am J Clin Nutr **44**(5): 630-4.
- Serhan CN (2005). "Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **8**(2): 115-21.
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N and Gronert K (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J Exp Med **192**(8): 1197-204.
- Serhan CN and Savill J (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-7.

- Sheaff Greiner RC, Zhang Q, Goodman KJ, Giussani DA, Nathanielsz PW and Brenna JT (1996). "Linoleate, alpha-linolenate, and docosahexaenoate recycling into saturated and monounsaturated fatty acids is a major pathway in pregnant or lactating adults and fetal or infant rhesus monkeys." J Lipid Res **37**(12): 2675-86.
- Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS and Goldstein JL (1996). "Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a." J Clin Invest **98**(7): 1575-84.
- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS and Goldstein JL (1997). "Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells." J Clin Invest **99**(5): 846-54.
- Simmer K and Patole S (2004). "Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants." Cochrane Database Syst Rev(1): CD000375.
- Simmer K, Patole SK and Rao SC (2008). "Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term." Cochrane Database Syst Rev(1): CD000376.
- Simopoulos AP (2002). "Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases." J Am Coll Nutr **21**(6): 495-505.
- Sinclair AJ, Attar-Bashi NM and Li D (2002). "What is the role of alpha-linolenic acid for mammals?" Lipids **37**(12): 1113-23.
- Smit EN, Martini IA, Mulder H, Boersma ER and Muskiet FA (2002). "Estimated biological variation of the mature human milk fatty acid composition." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(5-6): 549-55.
- Sprecher H (2000). "Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids." Biochim Biophys Acta **1486**(2-3): 219-31.
- Sprecher H (2002). "The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **67**(2-3): 79-83.
- Sprecher HW, Baykousheva SP, Luthria DL and Mohammed BS (1995). "Differences in the regulation of biosynthesis of 20- versus 22-carbon polyunsaturated fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **52**(2-3): 99-101.
- Stark KD (2008). "The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues." Lipids **43**(1): 45-53.
- Stillwell W and Wassall SR (2003). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." Chem Phys Lipids **126**(1): 1-27.
- Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE and Hu FB (2007). "Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women." Am J Clin Nutr **86**(1): 74-81.
- Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Muhlhausler BS and Gibson RA (2010). "Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **83**(2): 61-8.
- Uauy R, Hoffman DR, Mena P, Llanos A and Birch EE (2003). "Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials." J Pediatr **143**(4 Suppl): S17-25.
- Uauy R, Mize CE and Castillo-Duran C (2000). "Fat intake during childhood: metabolic responses and effects on growth." Am J Clin Nutr **72**(5 Suppl): 1354S-1360S.
- Verhoeven NM, Kulik W, van den Heuvel CM and Jakobs C (1995). "Pre- and postnatal diagnosis of peroxisomal disorders using stable-isotope dilution gas chromatography--mass spectrometry." J Inher Metab Dis **18 Suppl 1**: 45-60.
- Vermunt SH, Mensink RP, Simonis MM and Hornstra G (2000). "Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of ¹³C-alpha-linolenic acid." Lipids **35**(2): 137-42.

- Voss A, Reinhart M, Sankarappa S and Sprecher H (1991). "The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase." *J Biol Chem* **266**(30): 19995-20000.
- Wahli W and Constantin N (2009). "La nutriginomique, nouvelle aliée de la santé." *Forum Med Suisse* **9-11**: 224-227.
- Wallis JG, Watts JL and Browse J (2002). "Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?" *Trends Biochem Sci* **27**(9): 467.
- Watkins SM, Reifsnnyder PR, Pan HJ, German JB and Leiter EH (2002). "Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone." *J Lipid Res* **43**(11): 1809-17.
- Wenk MR (2005). "The emerging field of lipidomics." *Nat Rev Drug Discov* **4**(7): 594-610.
- Wold S, Kettaneh N and Tjessem K (1996). "Hierarchical multiblock PLS and PC models for easier model interpretation and as an alternative to variable selection." *Journal of Chemometrics* **10**: 463-82.
- Woods AS and Jackson SN (2006). "Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Aaps J* **8**(2): E391-5.
- Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA and Milburn MV (1999). "Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors." *Mol Cell* **3**(3): 397-403.
- Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT and Clarke SD (2001). "Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay." *J Biol Chem* **276**(13): 9800-7.
- Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S and Yamada N (1999). "A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids." *J Biol Chem* **274**(50): 35840-4.
- Yi LZ, He J, Liang YZ, Yuan DL and Chau FT (2006). "Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA." *FEBS Lett* **580**(30): 6837-45.
- Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S and Yamada N (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1240-54.
- Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S and Yamada N (2002). "Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements." *J Biol Chem* **277**(3): 1705-11.
- Yoshikawa T, Toda K, Nemoto Y, Ono M, Iwasaki S, Maeda T, Saibara T, Hayashi Y, Miyazaki E, Hiroi M, Enzan H, Shizuta Y and Onishi S (2002). "Aromatase-deficient (ArKO) mice are protected from severe hepatic steatosis by peroxisome proliferator administration." *Hepatology* **22**(4): 278-287.
- Yuhas R, Pramuk K and Lien EL (2006). "Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA." *Lipids* **41**(9): 851-8.

L'acide docosahexaénoïque (DHA) s'accumule principalement dans les membranes cérébrales humaines durant la période périnatale et les 2 premières années de la vie. Optimiser l'incorporation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) n-3 dans le système nerveux central, notamment le DHA, constitue l'un des objectifs majeurs de la nutrition néonatale et infantile. Ce projet étudie l'effet de régimes à base de matière grasse laitière anhydre (MGLA) afin d'améliorer la bioconversion des AGPI n-3 et l'incorporation du DHA dans le cerveau. L'autre objectif, au-delà des effets sur les acides gras, est d'évaluer si l'impact des apports destinés au jeune n'exerce pas un effet plus large tels qu'appréciés au niveau du lipidome du cerveau.

Nous avons mis au point un modèle d'expérimentation animale permettant d'étudier les effets de mélanges de MGLA et d'huiles végétales. Des mères sont nourries avec un régime déficient en acide α -linoléique (ALA) (0,4% des acides gras totaux (AGT)) pendant 6 semaines avant accouplement et pendant toute la gestation et la lactation. Après sevrage, quatre-vingts petits rats mâles et femelles ainsi carencés en AGPI n-3 sont séparés en 4 groupes et reçoivent des régimes à 10% de lipides pendant 6 semaines, soit à base d'huile de palme mélangée avec des huiles végétales pour un apport à 1,5%ALA (P1), ou 1,5% ALA supplémenté avec 0,12%DHA et 0,4% acide arachidonique (ARA) (P2); soit à base de MGLA et d'huiles végétales apportant 1,5%ALA (B1) ou 2,3%ALA (B2). Les acides gras cérébraux, plasmatiques et érythrocytaires ainsi que le profil lipidomique cérébral sont mesurés, et les résultats sont analysés en statistiques multivariées. Le régime B1 est supérieur aux deux régimes à base d'huile de palme à 1,5 %ALA, pour restaurer la quantité de DHA du cerveau (augmentation de 14.38%, $P < 0.05$) ; le régime (B2) présente un bénéfice supplémentaire sur ce paramètre. Les concentrations cérébrales en DHA chez les rats mâles sont significativement plus faibles que chez les femelles en raison des interactions de l'effet sexe sur l'effet régime, mais cet effet s'atténue avec les régimes MGLA ou l'ajout de DHA préformés dans le régime palme (P2).

Nous avons calculé un nouvel indice à l'aide des profils en acides gras des globules rouges et du plasma pour prédire le contenu en DHA cérébral, et dont la performance est meilleure que celle des indices existants. Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence un effet majeur et inconnu jusqu'alors, des régimes sur le lipidome du cerveau (analyse des espèces moléculaires de lipides), affectant près de 15% des espèces analysées. Ces changements semblent être liés, entre autres, au métabolisme du cholestérol, des acides gras et des messagers lipidiques.

En conclusion, nos données sont susceptibles d'améliorer les formules infantiles. La première utilisation de l'approche de lipidomique sans a priori que nous avons mise en oeuvre ouvre des perspectives nouvelles en nutrition infantile.

The accretion of docosahexaenoic acid (DHA) in brain membranes mainly occurs around delivery and during the first two years of life. One of the main goals of neonatal nutrition is to optimize the incorporation of n-3 long chain polyunsaturate fatty acids (LC-PUFA) into the central nervous system, including DHA. Our goal was to study the impact of several kinds of diets based on dairy-fat to improve the n-3 LC-PUFA bioconversion and DHA accretion into brain. The other endpoint was to assess if beyond the brain fatty acid profiles, the dietary intakes would bring about a wider effect such as the one that can be appreciated through a lipidomic approach.

We compared the nutritional effect of dairy-fat based diets to that of palm-oil based diets in the rat reproductive model. Mother rats were made deficient in α -linoleic acid (ALA) (0.4% of fatty acids (FA) for 6 weeks prior to mating and throughout gestation and lactation. After weaning, the resulting deficient 40 rat pups of either gender were split into 4 groups and received 10% fat diets made with either 1.5%ALA palm oil blend (P1), same added with 0.12% DHA and 0.4% arachidonic acid (ARA) (P2), 1.5% ALA dairy-fat blend (B1) or 2.5% ALA dairy-fat blend (B2). The brain, red blood cell (RBC) and plasma fatty acid profiles were analyzed and treated using multivariate statistics. B1 was superior to both palm-oil based diets to improve the brain DHA contents (14.4% increase, $P < 0.05$). B2 brought an additional benefit for this parameter. The brain DHA contents in males were significantly lower than for the female because of a diet x gender interaction. This effect was smoothed with the dairy-fat diets or the palm-oil based diet augmented with preformed DHA.

We calculated a new fatty acid index to predict the brain DHA contents, based on the fatty acid profiles measured in RBC and plasma, and which demonstrated a better performance than the existing published index. For the first time, we showed a profound and yet unsuspected effect of diets until now on the brain lipidome (lipids molecular species), affecting about 15% of the features detected. These changes were ascribed to the cholesterol and fatty acid metabolism, and to the lipid messengers, among others.

In conclusion, our data appear highly relevant to improve infant formulas. The first use of the lipidomic approach in neonatal nutrition open the paths of new researches in the area of infant nutrition.