

Université de Bourgogne

UFR Sciences Vie, Terre et Environnement / Inserm UMR866

## THESE

En vue d'obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

*Discipline : Sciences de la Vie*

*Spécialité : Physiologie de la Nutrition*

par

**Célia BIDU**

Résistance des souris transgéniques fat-1 à l'obésité :  
Prévention de l'endotoxémie métabolique et  
Modulation du microbiote intestinal  
Par les acides gras polyinsaturés en n-3

Soutenue publiquement le 14 décembre 2015 devant le Jury composé de :

Dr. Laurent Lagrost (Université de Bourgogne - INSERM UMR 866, Dijon)	Président du Jury
Pr. Vincent RIOUX. (Agrocampus Ouest - INRA USC 1378, Rennes)	Rapporteur
Dr. Philippe GERARD (Micalis - INRA UMR 1319, Jouy-en-Josas)	Rapporteur
Dr. Béatrice MORIO (CarMeN - INSERM UMR 1060, Lyon)	Examineur
Pr. Michel NARCE (Université de Bourgogne-INSERM UMR 866, Dijon)	Directeur de thèse
Dr. Jérôme BELLENGER (Université de Bourgogne-INSERM UMR 866, Dijon)	Co-encadrant de thèse

*“ Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries ”*

*Marcel Proust*

A toi qui fais battre mon cœur,

A ma famille,

Ce travail de trois années a été réalisé au sein de l'unité INSERM UMR866 Lipides, Nutrition, Cancer, à la Faculté des Sciences Gabriel de Dijon, au sein de l'équipe LIPNESS (Lipoproteins and lipid transfers in sterile and septic inflammation) et financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et l'Université de Bourgogne, que je remercie vivement.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury. Je tiens à remercier le Docteur Laurent Lagrost, directeur de recherche de l'UMR INSERM 866/UB de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir accordé toute sa confiance. Merci également de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie vivement le Docteur Vincent Rioux et le Docteur Philippe Gérard pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Merci pour vos conseils avisés et remarques constructives. Je remercie également le Docteur Béatrice Morio-Liondore, directrice de recherche de l'UMR INSERM 1060 CarMeN pour sa participation à ce jury en qualité d'examinateur. Merci également d'avoir suivi la progression de mon travail de thèse en tant que membre de mon CST, rôle partagé avec le Docteur Marie-Caroline Michalski, chargée de recherche de l'UMR INSERM 1060 CarMeN. Je leur adresse ma reconnaissance et ma grande considération pour leur sympathie et leurs conseils.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Professeur Michel Narce, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Merci pour vos conseils et votre rigueur scientifique qui ont permis d'aboutir à ce travail de thèse. Je remercie mon co-encadrant de thèse, le Docteur Jérôme Bellenger, pour ces deux années de collaboration.

Je tiens également à remercier chaleureusement toute l'équipe pédagogique. L'enseignement a été pour moi un environnement propice au ressourcement et au partage de ma passion. Je remercie tout particulièrement les Docteurs Claire Sulmont-Rossé, Charles Thomas, Laurent Demizieux, Aziz Hichami, et ma collègue Doctorante Lorène Lebrun pour avoir partagé cette expérience avec moi.

Je remercie vivement Joseph Gresti et Sandrine Bellenger de m'avoir initiée aux techniques d'étude des lipides. Merci de m'avoir fait partager vos connaissances et aussi votre bonne humeur. Mes sincères remerciements vont également à Jean-Paul Pais de Barros pour son expertise dans la lipidomique, André Bouchot et Audrey Geissler pour leur expertise en histologie et Aymé Spor et Maxime Galan pour leur expertise du microbiote. Un grand merci pour vos analyses.

Je remercie vivement toute l'équipe de l'animalerie de l'INRA qui a pris soin, au quotidien, de mes animaux, assurant ainsi la qualité de mes études nutritionnelles. Merci Raymond, Alexia, Laurence et Elise.

Mes pensées et remerciements vont également à mes collègues, sans qui ce parcours n'aurait pas été le même. Emmanuelle et Charlotte, merci pour votre bonne humeur et l'ambiance chaleureuse que vous avez apportée. Je remercie également Tania, Adélie, Danish et vous souhaite une belle réussite pour vos thèses respectives ! Je remercie tout particulièrement Aurélie pour nos discussions et son soutien dans les moments difficiles. Une pensée à tous les étudiants passés, Anne-Sophie, Mathilde, Maria, Nina, Franck, qui ont été des collègues et des amis remarquables. Je leur exprime mon affection et les remercie pour les rires, les discussions de toute sorte, les encouragements et leur profonde humanité.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance et mon profond respect à Aline et Dominique pour leur accompagnement. Aline, un grand merci pour votre bienveillance, votre bonté et votre sagesse. Merci d'avoir été un refuge et de m'avoir donné la force et la foi.

Merci à mes parents de m'avoir accompagnée tout au long du chemin et d'avoir répondu à mes désirs d'émancipation. Merci pour votre grand soutien moral durant toutes ces années, merci d'avoir cru en moi et su me dynamiser lorsque cela était nécessaire.

Je remercie mes amis, qui m'ont toujours soutenu, dans les moments difficiles comme dans les moments agréables. Merci pour toutes ces soirées partagées : les improvisées, les crémaillères, les anniversaires, les réveillons,...

*On se demande parfois si la vie a un sens... et puis l'on rencontre des êtres qui donnent un sens à la vie (Brassai).*

Merci Anthony d'avoir donné un sens à la mienne ! Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenu pendant mes moments de doutes, de stress, de colère mais aussi de gaieté. Merci pour ta tendresse, ta joie de vivre et tes encouragements permanents. Tu as grandement contribué à la réussite de cette thèse, bien plus que tu ne le penses !

Enfin, merci à toute les personnes que j'ai involontairement oubliées. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

## Liste des abréviations

### 0

2-DOG: 2 Deoxy d [3H] glucose

### A

AA: Acide Arachidonique (20:4 n-6)

ACC: Acyl-CoA Carboxylase

ACOX: Acyl-CoA Oxidase

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AG: Acide Gras

AGCC: Acide Gras à Courte Chaîne

AGMI: Acide Gras Monoinsaturé

AGPI ou PUFA: Acide Gras Polyinsaturé

AGS: Acide Gras Saturé

ALA: Acide  $\alpha$ -Linoléique (18:3 n-3)

AMPK: AMP-activated Protein Kinase

AP1: Activator Protein 1

aP2: Protéine adipocytaire 2

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNr: ARN ribosomique

AUC: Aire sous la courbe

### B

BAD: Bcl2-associated agonist of cell death

BCL2: B-Cell Lymphoma 2

BSA: Sérum Albumine Bovine

## C

C/EBPs: CCAAT/enhancer-binding proteins

cADN: ADN complémentaire

CD14: Cluster of Differentiation 14

CETP: Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol

chREBP: Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein

Cidea: Cell Death Activator

COX: Cyclooxygénase

CPT: Carnitine Palmitoyl Transferase

CTL: Contrôle

## D

D6D: Delta 6 Désaturase

DHA: Acide Docosahexaénoïque (22:6 n-3)

DIO: Diet-induced obesity

DPA: Acide Docosapentaénoïque (22:5 n-3)

DSS: Dextran Sulfate de Sodium

DT2: Diabète de Type 2

## E

ELOVL: Elongation of Very Long Chain Fatty Acid

EPA: Acide Eicosapentaénoïque (20:5 n-3)

## F

FAS: Fatty Acid Synthase

FATCD36: Fatty Acid Translocase Cluter of Differentiation 36

Fiaf: Fasting Induce Adipose Factor

FISH: Fluorescence in situ Hybridization

FITC-Dextran 4 kDa: Dextran Fluorescéine Isothiocyanate 4 kDa

## **G**

G6P: Glucose 6 Phosphatase

GLUT: Glucose transporter

GPDH: Glycerol 3 Phosphate Déshydrogénase

GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

GPR: G-Protein Receptor

GSK3: Glycogène Synthetase Kinase 3

## **H**

HDHA: Hydroxy DHA

HDL: Lipoprotéine de haute densité

HEPE: Acide Hydroxy-Eicosa-Penta-Enoïque

HETE: Acide Hydroxyperoxy-Eicosa-Tetra-Enoïque

HFHS: High Fat High Sucrose

HNF4: Hepatic Nuclear Factor 4

## **I**

IAP: Intestinal Alkaline Phosphatase

I-FABP: Intestinal Fatty Acid Binding Protein

IFN: Interféron

I $\kappa$ B: unité Inhibitrice de NF- $\kappa$ B

IKK: I $\kappa$ B Kinase

IL: Interleukine

IMC: Indice de Masse Corporelle

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

IR: Insulino-Résistance

IRAK1: IL-1R Associated Kinase

IRF3: interferon regulatory factor 3

IRS: Insulin Receptor Substrate



## **L**

LA: Acide Linoléique (18:2 n-6)

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein

LDL: Lipoprotéine de basse densité

LOX: Lipoxygénase

LPL: Lipoprotéine Lipase

LPS: Lipopolysaccharides

LT: Leucotriène

## **M**

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MaR: Marésine

MC4R: mélanocortine 4

mCD14: forme membranaire de CD14

MCP: Monocyte chemoattractant Protein

MD2: Myeloid Differentiation protein 2

MetS: Syndrome Metabolique

MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein-1

MSR1: Macrophage Scavenger Receptor 1

MyD88: Myeloid Differentiation factor 88

## **N**

NF-kB: Nuclear Factor-Kappa B

NRF: Nuclear Respiratory Factor

## **O**

OA: Acide Oléique (18:1 n-9)

OCLN: Occludine

OGTT: Test Oral de Tolérance au Glucose

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OTU: Operationnal Taxonomic Units

OXPHOS: Phosphorylation Oxydative

## **P**

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne

PD1: Protectine D1

PDK: Phosphatidylinositol-Dependent Kinase

PDZ: Post synaptic density Disc large ZO

PEPCK: Phosphoénolpyruvate Carboxykinase

PG: Prostaglandine

PGC: Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator

PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase

PK: Protéines Kinase

PL: Phospholipides

PLA2: Phospholipase A2

PLFR: Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction

PLTP: Protéine de Transfert des Phospholipides

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

## **R**

Rev: Résolvine

RT: Transcription Inverse

RXR : Retinoid X Receptor

## **S**

SCD-1: Stearoyl-CoA Desaturase-1

sCD14: forme soluble

SPM: Specialized Proresolving Lipid Mediators

SREBP-1: Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1

SVF ou BFS: sérum de veau fœtal

## **T**

TA: Tissu Adipeux

TAG: Triglycéride

TER: Résistance Electrique Transépithéliale

TGFB: Transforming Growth Factor Beta

THX: Thromboxane

TJ: Jonction serrée

TLR: Toll Like Receptor

TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TRAF6: TNFR Associated Factor 6

TX: Thromboxane

## **U**

UCP: Uncoupling Protein

## **V**

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Lipoprotéine de très basse densité

## **W**

WT: Wild Type

## **Z**

ZO: Zonula Occludens

## Liste des figures

Figure 1 Prévalence de l'obésité chez les Hommes de 18 ans et plus .....	7
Figure 2 Prévalence de l'obésité chez les femmes de 18 ans et plus.....	7
Figure 3 Répartition de la prévalence de l'obésité par tranche d'âge depuis 1997.....	8
Figure 4 Maturation de l'insuline .....	11
Figure 5 Mécanisme de signalisation à l'insuline.....	12
Figure 6 Inflammation du tissu adipeux et recrutement de macrophage.....	16
Figure 7 L'hypothèse du débordement lipidique.....	17
Figure 8 Mise en place du microbiote intestinal humain à travers les différentes étapes de la vie.	20
Figure 9 Arbre phylogénétique des principaux phyla du tractus intestinal humain et leur présence relative.....	21
Figure 10 Les microorganismes intestinaux impliqués dans le métabolisme glucidique. ....	23
Figure 11 Théorie de la rentabilité énergétique.....	27
Figure 12 Structure moléculaire des LPS.....	30
Figure 13 Voies de signalisation cellulaire du complexe LPS/LBP/CD14.....	32
Figure 14 Maintien de l'imperméabilité de la barrière épithéliale intestinale par les jonctions serrées .....	34
Figure 15 Événements intestinaux conduisant à l'apparition d'une inflammation métabolique ....	36
Figure 16 Structure d'un acide gras saturé, monoinsaturé et polyinsaturé.....	38
Figure 17 Structure des acides linoléique n-6 et $\alpha$ -linoléique n-3 .....	39
Figure 18 Biosynthèse des acides gras polyinsaturés chez les mammifères.....	39
Figure 19 Elongases ELOVL chez les mammifères .....	40
Figure 20 Liste non exhaustive des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique et de l'acide eicosapentaénoïque par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes).....	43
Figure 21 Biosynthèse de pro-resolving dérivés de l'EPA et DHA.....	44
Figure 22 Création et caractéristiques du modèle transgénique fat-1 .....	63
Figure 23 Hypothèses de travail proposées quant aux rôles des AGPI en n-3 sur l'obésité.....	66
Figure 24 Effets des AGPI en n-3 au niveau intestinal dans la prévention de l'obésité.....	117

## Figures de l'article

Figure 1 Fat-1 transgenic mice are protected from HFHS-diet-induced obesity. ....	81
Figure 2 Fat-1 transgenic animals are protected against whole body glucose intolerance. ....	83
Figure 3 N-3 fatty acid enrichment protects fat-1 transgenic mice against HFHS-induced hepatic steatosis. ....	85
Figure 4 Jejunum n-3 fatty acid enrichment and total lipid level. ....	87
Figure 5 N-3 PUFAs protect fat-1 mice from intestinal epithelial barrier dysfunction, tight junction protein impairment and reduce metabolic endotoxemia. ....	89
Figure 6 Effects of unsaturated fatty acids Caco-2 enriched cells on barrier integrity and tight junction expression. ....	91
Figure 7 N-3 fatty acid enrichment affects the proportion of different phyla in fat-1 transgenic mice. ....	93
Figure 8 Transplantation of fat-1 microbiota to wild-type animals decreases weight gain, improves whole body glucose tolerance and prevents intestinal permeability under HFHS diet. ....	95
Figure 1S Fat-1 genotyping. ....	98

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Seuils de corpulence en fonction de l'IMC. ....	6
Tableau 2 Teneur énergétique des macronutriments. ....	9

# Table des matières

<b>Préambule .....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
<b>I. L'obésité .....</b>	<b>6</b>
<b>II. Etiologie du surpoids et de l'obésité .....</b>	<b>9</b>
<b>III. Pathologies associées à l'obésité.....</b>	<b>11</b>
III.1. Insulino-résistance et diabète de type 2 .....	11
III.1.1. L'insuline .....	11
III.1.2. L'insulino-résistance .....	12
III.1.3. Le diabète.....	13
III.2. Inflammation du tissu adipeux.....	14
III.2.1. Le tissu adipeux.....	14
III.2.2. Inflammation du tissu adipeux et infiltration de macrophages.....	15
III.3. Atteintes hépatiques.....	17
<b>IV. Le microbiote intestinal.....</b>	<b>19</b>
IV.1. Acquisition du microbiote .....	19
IV.2. Méthodes d'étude du microbiote et composition.....	20
IV.3. Fonctions physiologiques du microbiote.....	22
IV.3.1. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal .....	22
IV.3.2. Fonctions trophiques et protectrices du microbiote intestinal.....	24
<b>V. Microbiote intestinal et maladies métaboliques .....</b>	<b>26</b>
<b>VI. Endotoxémie métabolique .....</b>	<b>29</b>
VI.1. Lipopolysaccharides.....	29
VI.1.1. Structure .....	29
VI.1.2. Transport.....	30
VI.1.3. Signalisation .....	31
VI.1.4. Inflammation .....	32
<b>VII. Perméabilité intestinale.....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. Les acides gras .....</b>	<b>38</b>
<b>IX. Les acides gras polyinsaturés : biosynthèse et rôles .....</b>	<b>39</b>

IX.1. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés .....	39
IX.1.1. L'élongation .....	39
IX.1.2. La désaturation .....	40
IX.2. Rôles des acides gras polyinsaturés.....	41
IX.2.1. Rôle énergétique.....	42
IX.2.2. Rôle structural .....	42
IX.2.3. Régulation génique.....	42
IX.2.4. Rôle fonctionnel.....	43
<b>X. Divers aspects fonctionnels des AGPI en n-3 .....</b>	<b>46</b>
X.1. AGPI en n-3, obésité et insulino-résistance .....	46
X.1.1. AGPI en n-3 et obésité.....	46
X.1.2. AGPI en n-3 et insulino-résistance .....	51
X.2. AGPI en n-3 et inflammation .....	54
X.3. AGPI en n-3 et homéostasie intestinale.....	57
X.3.1. AGPI en n-3, microbiote et perméabilité intestinale .....	57
X.3.2. AGPI en n-3, inflammation et endotoxémie métabolique.....	59
<b>XI. Les limites aux interventions nutritionnelles .....</b>	<b>62</b>
<b>XII. Modèle transgénique murin <i>fat-1</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>65</b>
<b>ARTICLE DE THÈSE.....</b>	<b>68</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>116</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>119</b>
<b>COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS .....</b>	<b>166</b>
<b>I. Présentations issues des travaux de thèse.....</b>	<b>167</b>
I.1. Communications orales .....	167
I.1. Communications affichées.....	168
<b>II. Publication issue des travaux de thèse et collaboration.....</b>	<b>169</b>

## Préambule

L'obésité se définit comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». De nombreuses causes endogènes et environnementales peuvent conduire à cet excès de lipides. Cependant, dans la plupart des cas, l'obésité est la conséquence d'un déséquilibre chronique de la balance énergétique et plus spécifiquement de la balance de répartition des graisses, entre  $\beta$ -oxydation et stockage. L'obésité est étroitement liée à une alimentation déséquilibrée hypercalorique associée à une augmentation de la sédentarité. Il est maintenant clairement établi que l'obésité est associée à une augmentation significative de la morbidité et de la mortalité puisqu'elle constitue à elle seule un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires, de certains cancers, mais aussi de dyslipidémies, d'insulino-résistance et de diabète. Ainsi, l'obésité est le 5<sup>e</sup> facteur de risque de décès au niveau mondial et fait 2,8 millions de victimes chaque année. Considérée comme une véritable pandémie, l'obésité concernait en 2014, au niveau mondial, 600 millions d'adultes et 42 millions d'enfants de moins de 5 ans.

Depuis les années 60, l'alimentation occidentale connaît un déséquilibre croissant des apports entre les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés (AGPI) : les n-6 et les n-3. Cette évolution des habitudes alimentaires provoque une diminution de la disponibilité tissulaire en AGPI en n-3 à longue chaîne, en particulier de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5 n-3) et de l'acide docosapentaénoïque (DHA, 22 :6 n-3). Ce déséquilibre pourrait ainsi avoir contribué à l'augmentation du nombre de cas d'obésité qui s'est étendue dans les pays développés au cours des dernières décennies. De nombreuses anomalies métaboliques peuvent néanmoins survenir avant même que le stade d'obésité critique soit atteint. Parmi les facteurs de risques d'insulino-résistance et de diabète, on retrouve une lipémie élevée et prolongée et une inflammation de faible intensité qui s'installe de manière chronique.

Récemment, l'intérêt porté au microbiote intestinal (majoritairement composé de bactéries, puis de levures et de virus présents au niveau du tractus intestinal) dans diverses maladies intestinales et extra-intestinales a fortement augmenté. Les progrès des techniques moléculaires ainsi que de la bio-informatique ont permis de décrire plus précisément cette communauté bactérienne intestinale et ses modulations, appelées dysbioses, dans des pathologies telles que l'obésité. Une perturbation spécifique au niveau du phylum avec un ratio *Bactéroïdetes/Firmicutes* diminué a d'abord été montrée comme étant associée à l'obésité, et l'analyse plus profonde du genre a montré une augmentation de certains représentants du genre *Lactobacillus* chez les individus



obèses et une diminution du genre *Verrucomicrobia*. Ces données mettent en avant l'implication de nouveaux acteurs dans ces phénomènes à risques, à savoir les endotoxines bactériennes lipopolysaccharides (LPS). En effet, les endotoxines issues des bactéries à Gram négatif du microbiote intestinal, produites de manière continue par la lyse des bactéries, peuvent être co-absorbées avec les acides gras alimentaires puis incorporées aux chylomicrons et véhiculées ainsi vers les tissus cibles. Ayant la capacité d'activer les cellules immunitaires et d'induire alors la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ces endotoxines participeraient à l'établissement et au maintien d'un état inflammatoire chronique. Ces observations soulèvent l'hypothèse d'un lien entre une alimentation trop riche, le microbiote intestinal, l'inflammation de bas bruit (endotoxémie métabolique) et l'obésité.

Un intérêt tout particulier doit donc être porté à la modulation de la lipémie et de l'inflammation métabolique. Des stratégies de prévention nutritionnelle ont alors vu le jour. En effet, de nombreux travaux démontrent que la qualité, la quantité des lipides alimentaires composant nos membranes biologiques peuvent affecter leur absorption intestinale et seraient donc à même de modifier d'autres effets métaboliques associés.

Bien que les données à ce sujet restent incomplètes et font débat actuellement, les AGPI en n-3 (principalement l'EPA et le DHA) semblent jouer un rôle dans les processus de résolution de l'inflammation à bas bruit en lien avec l'obésité. Ainsi, il a été montré une amélioration du statut inflammatoire, de l'obésité et ses complications métaboliques associées chez des animaux supplémentés en AGPI en n-3. De plus, selon des études épidémiologiques et d'intervention chez l'Homme, des apports élevés en AGPI en n-3 pourraient réduire les dyslipidémies et améliorer la tolérance au glucose, et également prévenir l'apparition d'un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Les AGPI en n-3 semblent de plus impliqués dans l'homéostasie intestinale. Une supplémentation en AGPI en n-3 pourrait moduler l'écologie microbienne et atténuer la réponse inflammatoire de l'organisme. Enfin, les AGPI en n-3 semblent capable d'influer sur la fonction barrière de l'intestin, notamment par l'augmentation de l'expression de protéines de jonctions serrées et d'hormones participant au maintien et au renouvellement de l'endothélium intestinal.

Les études montrant les effets potentiellement bénéfiques mais controversés des AGPI en n-3 sur la santé ont été pour la plupart réalisées en utilisant des huiles de poisson, source potentielle de facteurs alimentaires confondants (stérols, vitamines,...) pouvant en partie expliquer l'hétérogénéité des résultats observés.

Mettant en jeu des teneurs tissulaires en AGPI en n-3 augmentées artificiellement par conversion des AGPI en n-6 alimentaires, le modèle transgénique murin fat-1 joue un rôle clé dans l'étude des effets des AGPI en n-3 sur de nombreuses pathologies métaboliques, sans passer par une intervention nutritionnelle d'enrichissement en AGPI en n-3.

Dans ce contexte bibliographique, ma thèse a pour but d'étudier le rôle potentiellement protecteur des AGPI en n-3 endogènes (produits de manière artificielle par conversion des AGPI en n-6 alimentaires) sur le développement d'une obésité et d'une endotoxémie métabolique. Pour cela, nous avons suivi au cours de ce travail plusieurs approches expérimentales :

Une étude *in vivo* chez la souris (transgénique fat-1 et sauvage) nous a permis d'appréhender le rôle joué par les AGPI en n-3 endogènes sur les altérations du métabolisme lipidique et glucidique lors de l'obésité induite par un régime riche en lipides et en glucides. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la prise de poids par des pesées hebdomadaires ; la composition corporelle par des mesures en résonance magnétique de la masse grasse et masse maigre ; le métabolisme glucidique par la réalisation d'un test de tolérance au glucose, la mesure de la glycémie et insulïnémie à jeun, et le transport de glucose ; la manifestation d'une stéatose hépatique par une analyse histologique à l'huile rouge, de la composition en acides gras hépatique et l'expression de marqueurs d'adipogénicité. Ensuite, l'hypothèse que l'endotoxémie métabolique est l'un des facteurs déclencheurs de l'inflammation bas bruit associée à l'obésité a été étudiée. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la composition du microbiote caecal, ainsi qu'à la perméabilité intestinale par l'étude de l'expression de protéines de jonction serrées et à la quantification des LPS plasmatiques.

Une étude *in vitro* sur le modèle cellulaire colique d'adénocarcinome humaine, Caco-2/TC7, pré-traités ou non aux acides gras puis avec ou sans LPS, nous a permis d'analyser plus précisément les effets du DHA au niveau de la barrière épithéliale intestinale.

Enfin, une deuxième étude nutritionnelle nous a permis d'analyser l'impact d'une transplantation réciproque du microbiote provenant de souris donneuses fat-1 ou sauvages, chez des souris receveuses sauvages ou fat-1, sur des paramètres physiologiques (poids, glycémie, stéatose hépatique), de perméabilité intestinale et d'endotoxémie métabolique. Ainsi, les effets des AGPI en n-3 endogènes, combiné au microbiote, sur les manifestations l'obésité et ces complications métaboliques associées, ont été étudiés.

Ce mémoire est constitué tout d'abord d'une étude bibliographique organisée autour de 12 chapitres.

Les chapitres 1 à 3 décrivent l'obésité, son étiologie et les pathologies associées. Le microbiote intestinal, les maladies métaboliques associées, le concept d'endotoxémie métabolique et la perméabilité intestinale sont ensuite détaillés dans les chapitres 4 à 7. Les AGPI, leur biosynthèse et leurs rôles, ainsi que certains aspects fonctionnels sont abordés dans les chapitres 8 et 9. Enfin, les chapitres 10 à 12, qui décrivent les difficultés inhérentes aux études nutritionnelles sur les AGPI en n-3 et de l'intérêt potentiel du modèle transgénique murin fat-1 pour apporter une meilleure compréhension, terminent cette revue bibliographique.

L'énoncé des hypothèses et objectifs fait suite aux données de la littérature, puis les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article (1<sup>er</sup> auteur) soumis, suivi d'une discussion générale. Ce mémoire est enfin conclu et les perspectives sont abordées en trois axes principaux.

Les productions scientifiques issues de ce travail sont indiquées à la fin du mémoire, après les références bibliographiques.

**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. L'obésité

L'obésité est un enjeu majeur de santé publique qui a atteint des proportions pandémiques depuis les années 1980. En dépit des efforts de la communauté scientifique et des professionnels de santé pour la comprendre et la traiter, le nombre de personnes atteintes ne cesse d'augmenter. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est une maladie chronique, présente dans les pays développés comme dans les pays en développement et qui touche les enfants comme les adultes. Elle est souvent définie simplement comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». Elle est la conséquence d'un dérèglement prolongé de la balance énergétique, résultant d'un excès de calories ingérées combiné à un manque de dépenses énergétiques. La dépense énergétique totale se définit en trois compartiments : le métabolisme basal ou dépense énergétique de repos (compte pour 60 % de la dépense totale), la thermogénèse post-prandiale (10 %) et l'activité physique (30 %) qui est la seule part variable.

La répartition anatomique de la masse grasse semble jouer un rôle important dans les risques associés à l'obésité. Ainsi, une localisation abdominale de la masse grasse est un facteur de risque accru de maladie (OMS (2000)). Pour une prise en charge appropriée de l'obésité, il est donc utile de pouvoir distinguer les sujets présentant un risque accru du fait d'une « répartition abdominale de la graisse », connue sous le nom d'« obésité androïde », de ceux qui montrent une répartition « gynoïde » avec moins de retentissements pour la santé, dans laquelle la graisse se répartit plus uniformément et de façon périphérique.

L'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quételet est un indice simple de mesure du poids par rapport à la taille élevée au carré, communément employé pour la classification du déficit pondéral, du surpoids et de l'obésité chez l'adulte. Il y a obésité lorsque l'IMC est  $\geq 30,0$ . Cette classification comprend une subdivision supplémentaire pour les IMC compris entre 35,0 et 39,9 et des options de prise en charge différentes, les risques associés étant plus sévères. Cette classification est principalement basée sur l'association entre IMC et mortalité (tableau 1).

L'IMC possède cependant ses propres limites et ne permet pas de distinguer le poids associé à la masse musculaire de celui associé au TA. Ainsi, le rapport entre IMC et masse grasse subit des variations en fonction de la corpulence et de la constitution morphologique, et l'on a souvent montré qu'un IMC donné ne correspond pas forcément au même degré d'embonpoint d'une population à l'autre (Swinburn et al., 1996, Forbes and Reina, 1970, Rolland-Cachera et al., 1991,

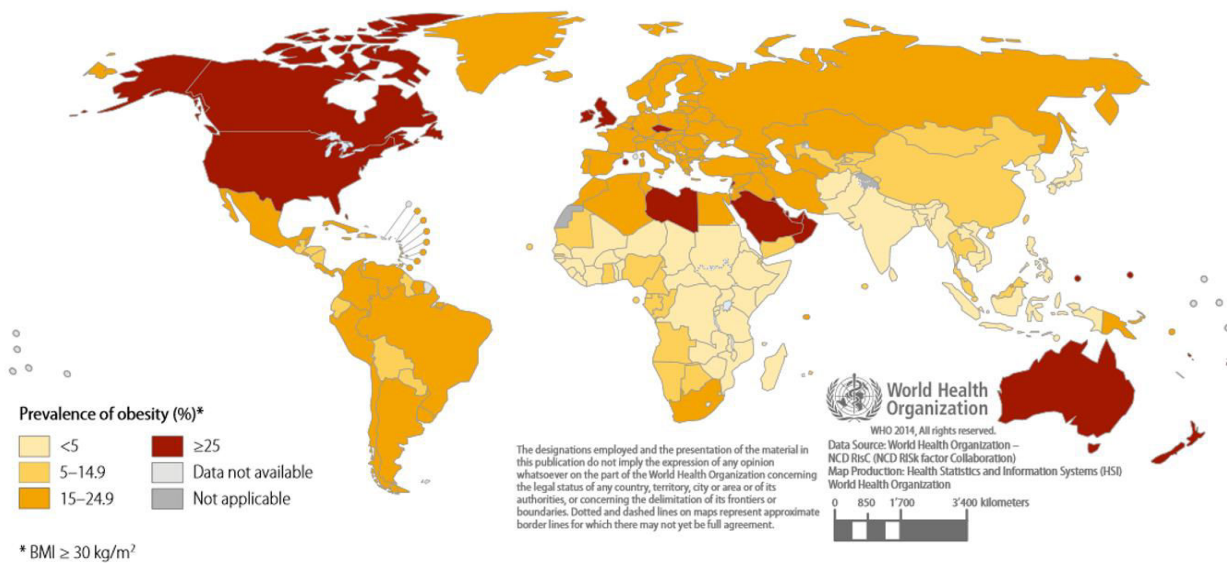
<b>Statut</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Risque</b>
Insuffisance pondérale	< 18,50	Faible
Eventail normal	18,50-24,99	Moyen
Surpoids	25,00-29,99	Modéré
Obésité modérée, catégorie 1	30,00-34,99	Modéré
Obésité sévère, catégorie 2	35,00-39,99	Important
Obésité morbide, catégorie 3	≥ 40,00	Très important

*Tableau 1 : Seuils de corpulence en fonction de l'IMC*

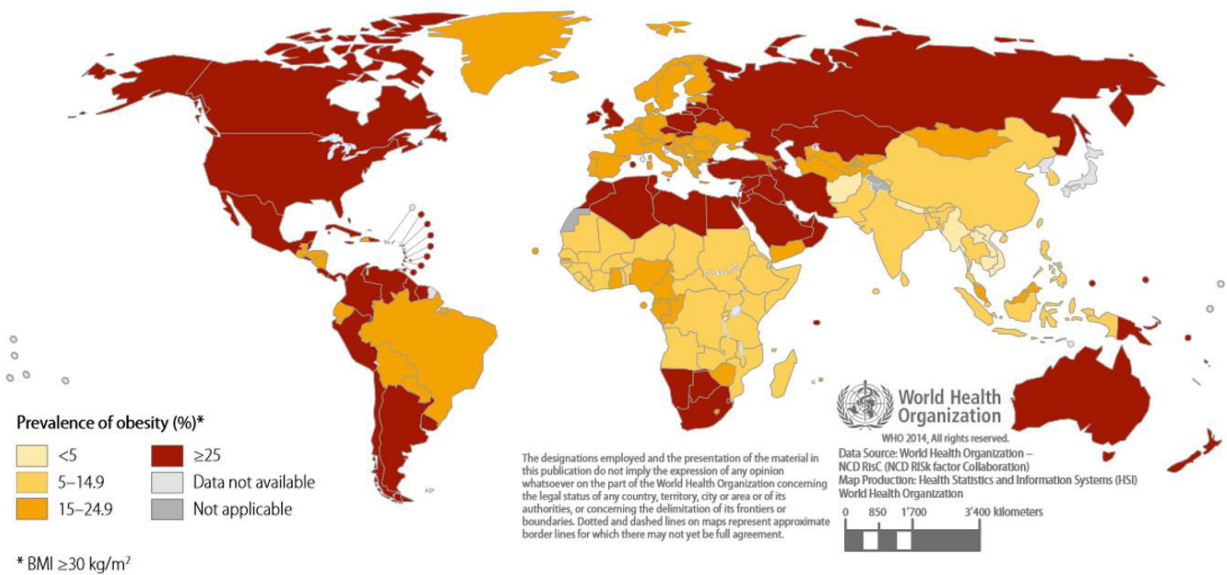
*D'après OMS 2000*

Ross et al., 1994). Il est donc intéressant de disposer de méthodes complémentaires pour identifier les sujets qui présentent un risque accru de maladies liées à l'obésité du fait d'une accumulation abdominale de graisse. Il existe aujourd'hui des calculs basés, par exemple, sur le rapport taille assise/taille debout qui permettent de corriger l'IMC pour tenir compte d'une longueur inhabituelle des jambes (Norgan and Jones, 1995) et la mesure du périmètre abdominal (ou tour de taille) (Han et al., 1997c, Lean et al., 1995) qui constitue un indicateur approximatif de la masse grasse intraabdominale (Pouliot et al., 1994, Ross et al., 1992) et de la masse grasse totale (Han et al., 1997b). D'autres techniques plus précises permettent d'étudier la composition corporelle de l'individu. Cette composition corporelle fait appel à la mesure de la masse et de la proportion de chacun des constituants de l'organisme suivants : eau corporelle totale, la masse maigre, le contenu minéral osseux, la masse grasse segmentaire et totale. Il existe alors trois grands types de techniques permettant d'évaluer la composition corporelle (Lukaski, 1987, Jebb and Elia, 1993). Le premier type quantifie, de manière indirecte, la masse grasse, soit par mesure des plis cutanés (Durnin and Womersley, 1974), soit par calcul de la densité corporelle (Katch et al., 1967). Le second type quantifie le volume d'eau corporelle par impédancemétrie par exemple (Segal et al., 1991). Enfin, le dernier type de techniques permet d'évaluer de façon directe la répartition du tissu adipeux (TA). Il s'agit des techniques de scanner à rayons X (Seidell et al., 1990, Kvist et al., 1986), d'imagerie par résonance magnétique ou IRM (Abate et al., 1994, Barnard et al., 1996, Han et al., 1997a) ou encore d'absorptiométrie biphotonique DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) (Svendsen et al., 1993, Jebb et al., 1995, Fuller et al., 1999, Wang et al., 1999).

La prévalence du surpoids et de l'obésité augmente partout dans le monde à un rythme alarmant, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte et les pays développés comme les pays en développement sont touchés (Figure 1 et 2). De plus, ce problème progresse rapidement. L'obésité est plus fréquente chez la femme que chez l'homme, même si le surpoids est plus fréquent chez ce dernier (OMS (2000)). Aux États-Unis par exemple, 42 % des hommes et 28 % des femmes sont en surpoids, et 21 % des hommes et 27 % des femmes sont obèses (Must et al., 1999). L'OMS estimait en 2008 que 1,5 milliard de personnes de plus de 20 ans étaient en surpoids, parmi lesquelles près de 200 millions d'hommes et 300 millions de femmes étaient obèses. Une étude du National Health and Nutrition Examination Survey en 2008 estime qu'en 2030, près de 86 % de la population pourrait être en surpoids ou obèses et près de 21 % d'adultes pourraient être obèses si aucune évolution dans la prise en charge n'apparaît dans les années à venir. Ainsi, chez l'enfant et l'adolescent, la prévalence du surpoids pourrait augmenter d'un facteur 1,6 pour atteindre 30 % d'ici 2030 (Wang et al., 2008).



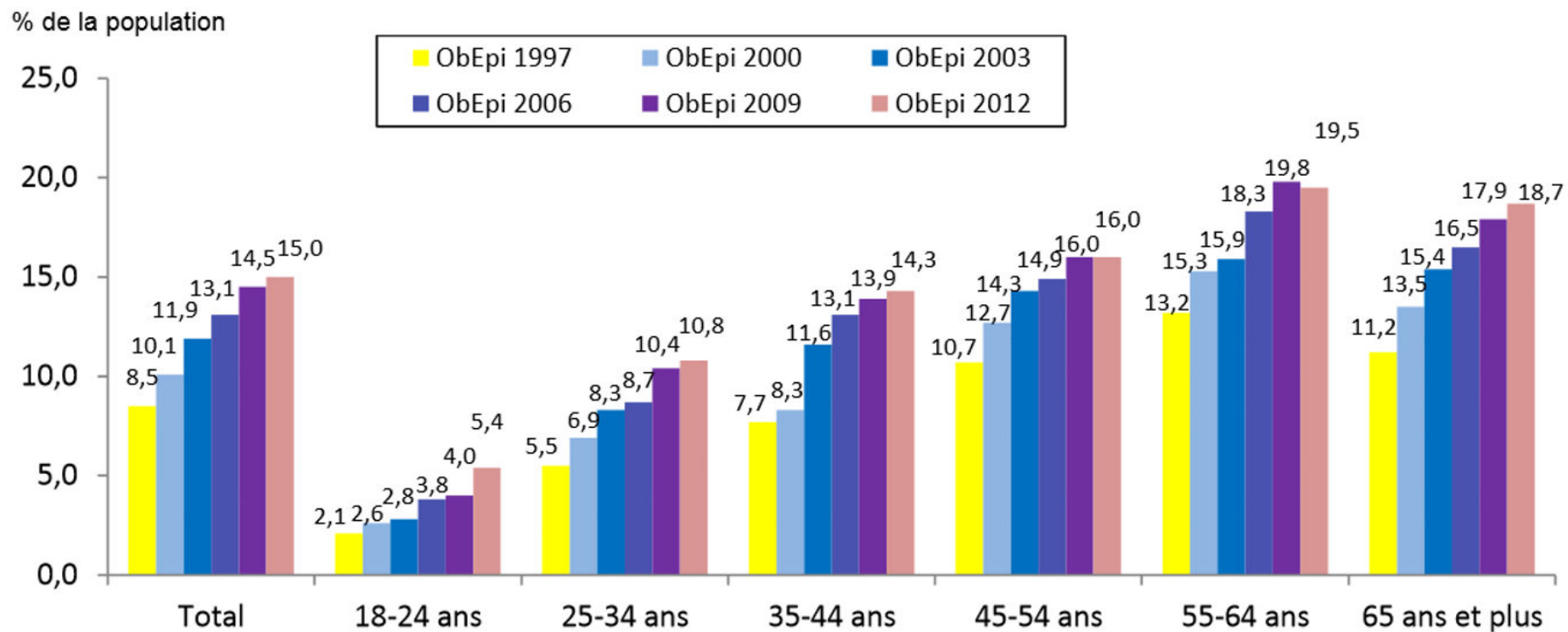
*Figure 1 Prévalence de l'obésité chez les hommes de 18 ans et plus (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), 2014*



*Figure 2 Prévalence de l'obésité chez les femmes de 18 ans et plus (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), 2014*



Enfin, en France, les différentes études ObEpi-Roche réalisées par l'Inserm (entre 1997 et 2012) permettent d'observer une augmentation progressive de la prévalence de l'obésité avec une augmentation relative de l'obésité qui est estimée à 5,9 % par an depuis 1997 (Figure 3).



*Figure 3 Répartition de la prévalence de l'obésité par tranche d'âge depuis 1997*

## **II. Etiologie du surpoids et de l'obésité**

Des changements environnementaux (urbanisation et mécanisation) et comportementaux tels que la proportion croissante de lipides dans les régimes alimentaires, la valeur énergétique accrue (tableau 2) (Drewnowski and Popkin, 1997), la diminution de l'activité physique, l'augmentation des comportements sédentaires (Prentice and Jebb, 1995, Popkin, 2006) sont autant de facteurs qui concourent à l'installation de l'obésité (OMS (2000)). Ces changements, opérés en l'espace de quelques décennies, sont en partie responsables de la rapidité d'apparition de cette pandémie d'obésité dans le monde (Popkin, 2006, Popkin and Nielsen, 2003). Popkin BM apporte le concept de 'transition nutritionnelle', dévoilant une profonde modification des schémas alimentaires (Popkin, 2006), se traduisant par une consommation accrue de produits d'origine animale apportant des lipides partiellement hydrogénés – multiplication par 3 fois ces dernières années dans les pays en voie de développement et développés (Delgado, 2003) -, une diminution de la consommation de fibres, une augmentation de la consommation de sucres raffinés (produits sucrés, boissons type soda) (Popkin and Nielsen, 2003) et enfin une augmentation de la taille des portions et du grignotage. Par exemple, un excès énergétique de 10 kcal par jour équivaut à un excès de poids de 0,45 kg par an, ce qui est alarmant puisque l'apport énergétique en excès se situe plus près des 49 à 133 kcal, ce qui correspondrait à une prise de poids de 0,85 à 3,77 kg par an, respectivement (Nielsen and Popkin, 2003).

La baisse de l'activité physique et/ou l'augmentation des comportements sédentaires jouent un rôle important dans la prise de poids et l'apparition de l'obésité car ils réduisent fortement les besoins énergétiques. Le changement majeur survenu dans ce domaine est lié aux avancées technologiques ; ainsi les individus se dépensent moins pour les activités quotidiennes et loisirs. Levine et collaborateurs ont montré une différence de dépense d'énergie entre individus obèses et minces de 352 kcal par jour en moyenne, principalement due à une différence de posture (assis, debout) et d'activité de marche journalière. Sur une année, une dépense énergétique supplémentaire de 352 kcal pourrait correspondre à une perte de poids de 15 kg si l'apport énergétique restait inchangé. Le fait de se rendre sur son lieu de travail à pied plutôt que par les transports motorisés permettrait de dépenser en moyenne 150 kcal additionnelles par jour (Levine et al., 2005). Une étude a estimé qu'il y a 150 ans, les individus dépensaient en moyenne 2,8 fois plus d'énergie qu'aujourd'hui, cette différence représentant 16 km par jour de marche supplémentaire (Egger et al., 2001). Dietz et Gortmaker ont montré que chez les jeunes enfants le temps passé devant la télévision était un facteur prédictif de l'IMC quelques années plus tard (Dietz and Gortmaker,

Macronutriments	Valeur énergétique	
	(Kcal/g)	(KJ/g)
Lipides	9	37
Alcool	7	29
Protéines	4	17
Glucides	4	16

*Tableau 2 Teneur énergétique des macronutriments*

1985), tandis que Rissanen et collaborateurs ont montré qu'un faible degré d'activité physique pendant les périodes de loisir est, chez l'adulte, un facteur prédictif d'une prise de poids importante ( $\geq 5$  kg) dans les 5 ans qui suivent (Rissanen et al., 1991).

Cependant, l'obésité ne peut se résoudre à simplement le résultat d'un changement dans nos habitudes alimentaires et de notre absence d'activité physique, mais est communément considérée comme une maladie multifactorielle complexe. Ainsi, des prédispositions génétiques peuvent également concourir à l'apparition du surpoids et de l'obésité. Dans les années 1990, la découverte du gène de la leptine a provoqué un regain d'intérêt pour les influences génétiques et métaboliques qui s'exercent lors du développement de l'obésité. En effet, une mutation du gène de cette adipocytokine ou de celui de son récepteur entraîne une obésité constitutive chez les souris présentant ces mutations (Zhang et al., 1994). Chez l'Homme, ces mutations conduisant à une prise de poids excessive et une obésité sévère ne seraient qu'au nombre de 3, ne touchant qu'une dizaine de personnes (Mazen et al., 2009). D'autre part, des mutations sur le gène codant pour l'enzyme impliquée dans la conversion de la pro-insuline en insuline (prohormone convertase 1) conduisent également à une augmentation de la prise de poids. Par ailleurs, des mutations sur le gène codant le récepteur à la mélanocortine 4 (MC4R) représentent une forme assez fréquente d'obésité monogénique touchant 1 à 6 % des individus obèses (Bell et al., 2005).

D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la prise de poids excessive. Selon l'OMS (2000) le fait d'arrêter de fumer, l'apparition d'une maladie, ou les traitements médicamenteux dont l'effet secondaire prédispose à une prise de poids plus importante de l'individu. Les périodes de croissance, de l'enfance (rebond d'adiposité entre 5 et 7 ans) à l'adolescence et les statuts physiologiques particuliers tels que la grossesse ou la ménopause constituent également des périodes à risque pour le développement de l'obésité.

L'obésité augmente fortement les risques de développer certaines maladies et conduit à une diminution générale de la qualité de vie. Elle est en effet un élément majeur du syndrome métabolique (MetS) et un facteur de risque important pour des maladies non transmissibles, telles le diabète de type 2 (DT2), l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, l'apnée du sommeil, la dyslipidémie et certains cancers, mais également à divers problèmes psychosociaux (OMS (2000)).

### **III. Pathologies associées à l'obésité**

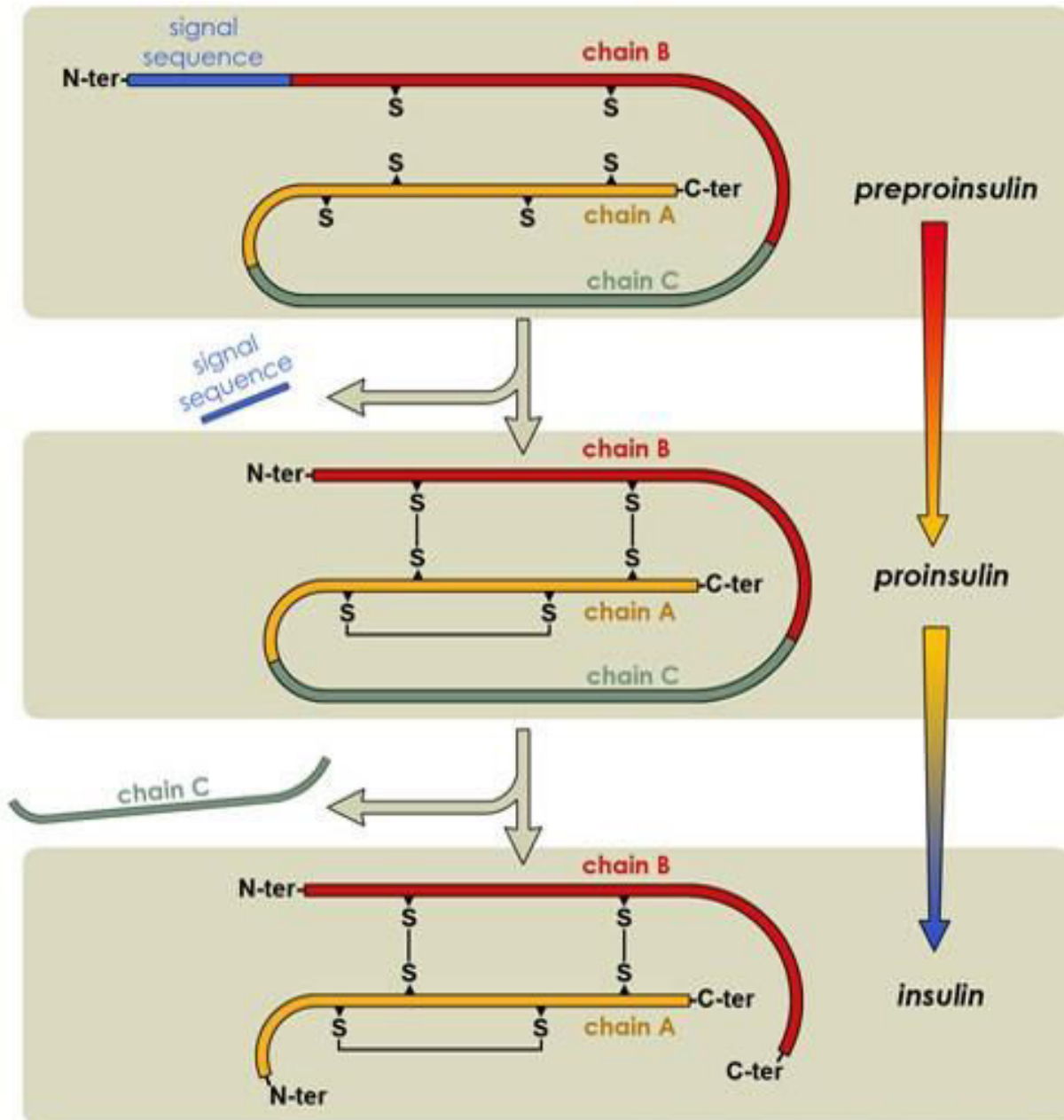
#### **III.1. Insulino-résistance et diabète de type 2**

Le maintien de l'homéostasie glucidique est assuré par l'existence de régulations impliquant différents signaux endocriniens, métaboliques ou nerveux. Le glucagon et l'insuline, deux hormones peptidiques produites respectivement par les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques, sont les principaux acteurs impliqués dans cette régulation. A jeun, l'homéostasie glucidique est maintenue par une action hyperglycémiant de glucagon, et en période prandiale et post-prandiale, par l'action hypoglycémiant de l'insuline. L'insuline joue un rôle anabolique majeur au niveau de l'organisme, dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques, qu'ils soient glucidiques ou lipidiques. Dans le muscle squelettique, l'insuline augmente le transport du glucose et son oxydation, la synthèse de glycogène et de protéines et inhibe la protéolyse et la lipoprotéine lipase (LPL). Dans le TA, l'insuline augmente le transport du glucose et la LPL, et inhibe la lipolyse. Dans le foie, l'insuline inhibe la glycogénolyse, la gluconéogenèse et la sécrétion de lipoprotéine de très basse densité (VLDL) (Eckel, 1992).

##### **III.1.1. L'insuline**

Le gène de l'insuline code pour une chaîne peptidique, nommée pré-pro-insuline, présentant un peptide signal de 24 acides aminés dans sa partie N-terminale et un peptide C au centre de la séquence. La maturation de ce précurseur par clivage de la séquence signal lors de la translocation du peptide dans le réticulum endoplasmique et la mise en place de ponts disulfures donneront alors la pro-insuline. Enfin, le clivage du peptide C finit la maturation de l'insuline, formée alors des chaînes A, comportant 21 acides aminés et B de 30 acides aminés (Figure 4). Le monomère d'insuline est organisé sous forme de structure globulaire dont le centre est constitué d'un noyau hydrophobe. La forme monomérique est la forme active de la protéine, cependant l'insuline est capable de se dimériser spontanément : trois dimères peuvent s'associer entre eux pour former des hexamères qui constituent la principale forme de stockage de l'insuline dans les vésicules de sécrétion (Hua, 2010).

Il existe deux voies majeures d'action de l'insuline, l'une passant par l'activation de la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K) et l'autre par les MAPK (mitogen activated protein kinase). La cascade de signalisation mise en jeu dans le métabolisme glucidique/lipidique et altérée lors de



*Figure 4 Maturation de l'insuline*

*La pré-pro-insuline comporte un peptide signal qui sera clivé pour donner la pro-insuline. Le peptide C présent au centre de la séquence de la pro-insuline sera ensuite éliminé pour donner l'insuline mature, composée de deux chaînes A et B reliées entre elles par des ponts disulfures (D'après Beta Cell Biology Consortium)*

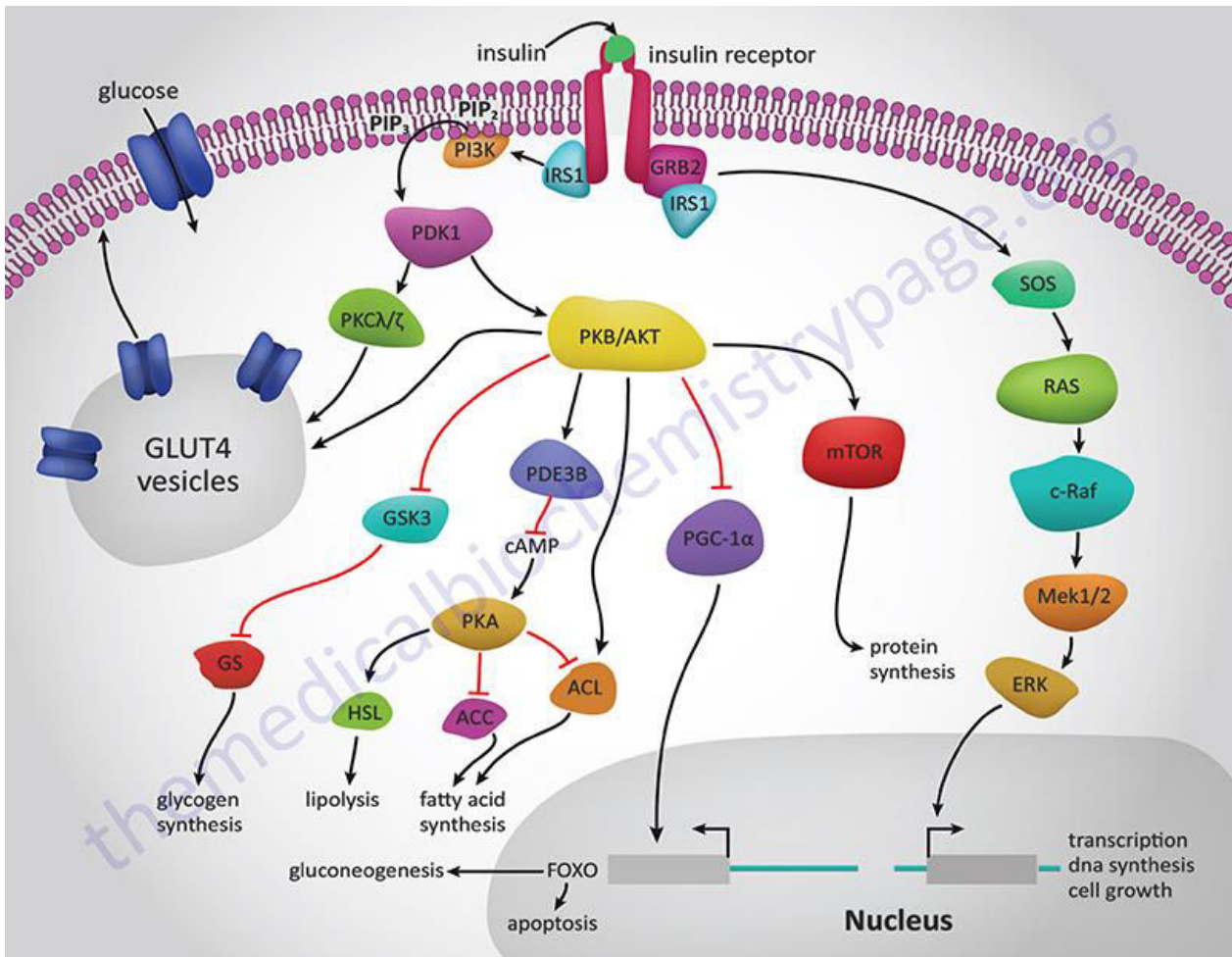
L'IR est la voie passant par PI3K (Figure 5). L'insuline se lie à son récepteur qui active des protéines substrats (insulin receptor substrate, IRS) par phosphorylation des résidus tyrosines, capables de recruter d'autres molécules comme la sous-unité régulatrice p85 de PI3K. Ainsi, l'activité catalytique de la sous-unité p110 de PI3K entraîne la phosphorylation de phosphoinositides, interagissant avec la phosphatidylinositol-dépendent kinase (PDK), qui active à son tour d'autres kinases, la protéine kinase (PK)-B/Akt et PK-C. Ces dernières vont être impliquées dans différentes réponses liées à l'insuline telles que la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique, la synthèse de glycogène *via* la phosphorylation de la Glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3) et la lipogenèse *via* l'activation de la synthèse du gène de la Fatty Acid Synthase (FAS). La fin du signal insulinaire implique une déphosphorylation du récepteur, assurée par des protéines tyrosine phosphatases (Capeau, 2003, Saltiel and Kahn, 2001) et la dégradation de l'insuline par l'internalisation du complexe insuline/récepteur et son transport vers les lysosomes où l'insuline est dégradée et les récepteurs sont recyclés (Carpentier, 1994).

### **III.1.2. L'insulino-résistance**

L'insulino-résistance (IR) est définie comme une réduction de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline. Ceci concerne les tissus cibles de l'insuline qui sont le muscle cardiaque, le muscle squelettique, le TA et le foie. Ce défaut de réponse à l'insuline provoque une hausse de la glycémie qui est compensée par une hypersécrétion d'insuline, se traduisant par une hyperinsulinémie. La capacité insulino-sécrétoire du pancréas diminue progressivement du fait d'une réduction de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques de 50 % environ par un phénomène d'apoptose, interrompant toute production d'insuline (Pick et al., 1998). À terme, cette IR conduit à l'apparition du DT2, qui associe un défaut de sensibilité à l'insuline à un défaut de sécrétion d'insuline (Kahn and Flier, 2000, Wang et al., 2004).

Le principal organe impliqué dans la régulation de l'homéostasie du glucose est le muscle squelettique, responsable de 80 % du captage du glucose (DeFronzo et al., 1985). L'IR au niveau musculaire se traduit par une diminution du transport et du captage du glucose, mais également de la phosphorylation et l'oxydation du glucose. L'intolérance au glucose, un indicateur indirect de l'IR, concernait en 2007 environ 197 millions de personnes dans le monde. Vingt-cinq pourcent de la population aux États-Unis serait insulino-résistante, ce qui représentait environ 60 millions d'individus en 2007. En 2025, on estime à 420 millions le nombre de personnes intolérantes au glucose (Hossain et al., 2007).





*Figure 5 Mécanisme de signalisation à l'insuline*

*La fixation de l'insuline sur son récepteur permet l'activation de plusieurs voies de signalisation : la voie de la PI3K (à gauche sur le schéma), permettant la translocation des transporteurs du glucose GLUT4 vers la membrane plasmique, la synthèse du glycogène et la lipogenèse ; la voie impliquant MAPK (à droite sur le schéma), impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire. (D'après The Chemical Biochemistry)*

L'IR est souvent une conséquence directe de l'obésité et de l'exposition chronique des tissus-cibles à des concentrations élevées en glucose et en acides gras libres (gluco-lipotoxicité). L'accumulation d'acides gras (AG) et triglycérides (TAG) dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans provoque une inhibition de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose mais aussi la destruction des cellules par apoptose, participant alors à l'installation d'un diabète (Girard, 2005, Unger, 1995). L'IR est également le résultat d'altérations moléculaires des principaux acteurs de la voie de signalisation de l'insuline, à un ou plusieurs niveaux de cette voie de transduction. Ce dysfonctionnement est principalement causé par une augmentation de la phosphorylation des résidus sérine ou thréonine du récepteur à l'insuline ou des IRS (Paz et al., 1997), favorisant leur dissociation et provoquant ainsi un arrêt de la transduction du signal insulinique (Zick, 2003). La multiplication des cycles d'internalisation/recyclage du complexe insuline/récepteur lorsque le taux d'insuline est trop important provoque également un déséquilibre entre la dégradation des récepteurs à l'insuline et la création de nouveaux récepteurs, aboutissant à terme à une diminution du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules (Bertacca et al., 2007). Enfin, l'augmentation de la déphosphorylation et l'absence d'interaction entre les différents intermédiaires du signal insulinique participent à la mise en place de l'IR (Goldstein et al., 1998) et à terme d'un diabète.

### **III.1.3. Le diabète**

Le diabète est défini par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 7,0 mmol/L (126 mg/dL). Cette hyperglycémie résulte d'un défaut de sécrétion d'insuline associé à un défaut d'action de cette hormone sur ses tissus cibles (Mendis et al., 2015). Hormis le cas particulier du diabète gestationnel apparaissant pendant la grossesse – avec des valeurs glycémiques supérieures à la normale mais inférieures à celles posant le diagnostic de diabète - il existe deux types de diabète : le diabète de type 1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant, et le diabète de type 2 non insulino-dépendant (DT2). Le diabète de type 1 concerne 10 % des cas de diabètes dans le monde, et est la conséquence d'une destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques des îlots de Langerhans, conduisant à une carence en insuline, le plus souvent totale.

Le DT2 représentant environ 90 à 95 % des cas, ne cesse d'augmenter depuis les vingt dernières années et continue de croître. En 2002, près de 171 millions de personnes dans le monde étaient diabétiques de type 2 (Wild et al., 2004), en 2009 cette prévalence était de 220 millions (Mendis et al., 2015) et pourrait atteindre près de 360 millions en 2030 (Wild et al., 2004). En France, la prévalence du DT2 approchait les 4 % en 2008 soit 4,57 millions d'individus (Bringer et al., 2009). Chez 75 à 80 % des patients, le DT2 est précédé d'une résistance à l'insuline, d'une hyper-

insulinémie, d'une dyslipidémie et d'une obésité (Cornier et al., 2008, Lebovitz, 1999) et la plupart des patients sont atteints d'un MetS avant l'apparition des signes cliniques du diabète (Cornier et al., 2008, Reaven, 2002). La présence conjointe d'un MetS et d'une IR accroît jusqu'à 6 à 7 fois le risque d'apparition d'un DT2 (Cornier et al., 2008). De plus, la prévalence du DT2 augmente parmi les personnes en surpoids et obèses, qu'elles soient jeunes ou âgées (Must et al., 1999, Nkondjock and Reaveur, 2003) et augmente progressivement avec l'IMC. Par exemple, les femmes pesant plus de 70 kg ont 24 fois plus de risque de développer un DT2 que les femmes pesant moins de 55 kg. Ce risque augmente progressivement à partir d'un IMC supérieur à 22 kg/m<sup>2</sup> (Colditz et al., 1990).

## **III.2. Inflammation du tissu adipeux**

### **III.2.1. Le tissu adipeux**

Chez la plupart des mammifères, il existe deux types de tissu adipeux (TA) (Himms-Hagen, 1997) : le TA brun et le TA blanc.

Le TA brun, peu présent chez l'Homme adulte, mais essentiel chez le rongeur, a pour principal rôle de participer à la régulation de la température corporelle par le phénomène de thermogénèse (Nedergaard et al., 2007). Il est également capable de modifier la dépense énergétique de l'organisme en réponse à divers événements tels qu'une diminution de la température corporelle ou la présence d'insuline (Ouellet et al., 2012, Orava et al., 2011).

En 2009 est née le concept d'adipocyte beige, à la suite d'expérimentations sur des adipocytes et pré-adipocytes en culture n'exprimant que certains gènes spécifiques du TA brun, telle que la protéine découplante UCP1 (Petrovic et al., 2010). Ces adipocytes beiges (ou brite, « BRown in whITE ») semblent être induits par le froid (Walden et al., 2012) et impliqués dans la thermogénèse, mais dans une moindre mesure par rapport au TA brun (Nedergaard and Cannon, 2013). L'origine cellulaire du TA beige reste à préciser. Ils pourraient provenir d'adipocytes ou pré-adipocytes blancs, ou alors d'un autre type cellulaire proche des adipocytes bruns (Giralt and Villarroya, 2013).

Le TA blanc est le plus abondant et constitue l'organe premier de stockage des lipides. Il est de plus en plus considéré comme un véritable organe endocrine et participe à la libération de molécules, portant le nom d'adipokines, capables d'agir par voie endocrine pour réguler différents processus physiologiques et pathologiques et maintenir l'homéostasie énergétique au niveau d'autres organes (Rosen and MacDougald, 2006, Frühbeck, 2008). La synthèse et la libération de

la lipoprotéine lipase et de la leptine ont permis au TA blanc d'être considéré comme un véritable tissu sécréteur endocrine (Stephens and Caro, 1998).

La leptine, du grec *leptos* signifiant mince, a été découverte en 1994 chez des souris obèses *ob/ob* (Zhang et al., 1994). Chez les souris, une mutation sur le gène de la leptine (souris *ob/ob*) ou de son récepteur (souris *db/db*) conduit au développement d'une obésité sévère. Un traitement à la leptine chez des souris *ob/ob* permet la réduction de la prise alimentaire, l'augmentation de la dépense énergétique et la diminution de la masse corporelle (Lago et al., 2007). L'adiponectine, découverte en 1995 par Scherer et collaborateur (Scherer et al., 1995), est la seule adipokine dont les taux soient corrélés négativement à l'IMC et positivement avec la sensibilité à l'insuline (Weyer et al., 2001). L'adiponectine a des effets insulino-sensibilisateurs car elle renforce l'inhibition de la production hépatique de glucose, son captage et son utilisation (Schinner et al., 2005). Enfin la résistine présente des propriétés pro-inflammatoires et semble responsable de l'installation de l'IR associée à l'obésité dans des modèles murins de DT2 (Tilg and Moschen, 2008). De plus, chez la souris KO résistine *-/-*, les taux d'enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la G6P (Glucose 6 Phosphatase) et la PEPCK (Phosphoénolpyruvate carboxykinase) sont diminués (Schinner et al., 2005).

### **III.2.2. Inflammation du tissu adipeux et infiltration de macrophages**

Le TA blanc est également le siège et la cible d'une réaction inflammatoire de basse intensité au cours des maladies métaboliques. Des études ont mis en évidence une corrélation positive entre l'incidence du DT2 et l'augmentation du niveau de marqueurs et de médiateurs de l'inflammation adipocytaire (Pickup and Crook, 1998, Pickup, 2004). Dans des modèles d'obésité, de DT2 et d'IR, des niveaux élevés en protéine C-réactive ont été retrouvés (Yudkin et al., 1999) mais également de cytokines inflammatoires comme TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et les interleukines IL6 ou IL1 $\beta$  (Shoelson et al., 2007, de Luca and Olefsky, 2008, Bastard et al., 2002, Spranger et al., 2003) et la chimiokine MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) (Sartipy and Loskutoff, 2003). Cette inflammation décrite au niveau inflammatoire a été suggérée comme étant un événement déterminant dans l'apparition des maladies métaboliques. L'obésité et le DT2 sont en effet liés à un état inflammatoire de faible intensité, touchant plusieurs organes clés de l'homéostasie métabolique, tel que le TA (Shoelson et al., 2006).

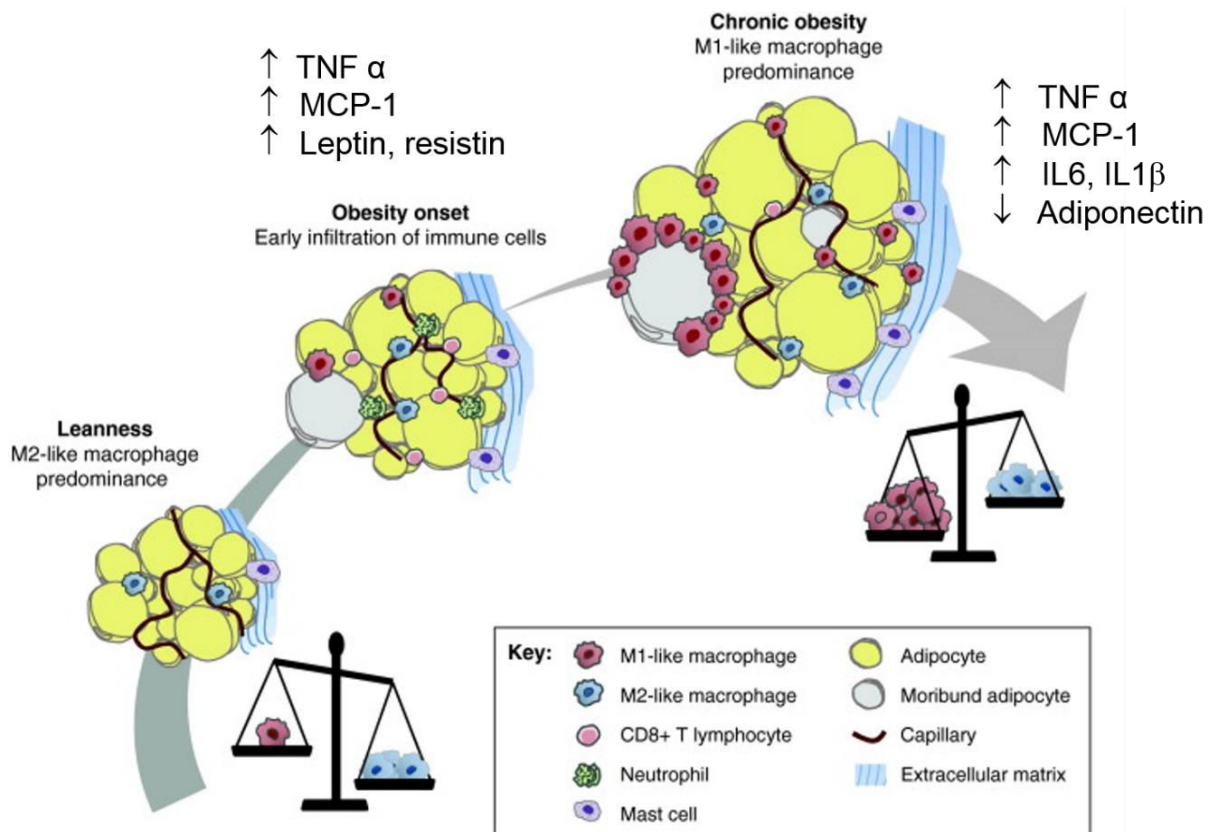
Le TNF $\alpha$  supprime la transcription du gène de l'adiponectine dans les adipocytes, ce qui pourrait expliquer la corrélation entre obésité et faibles taux d'adiponectine (Tilg and Moschen, 2008). En outre, la neutralisation du facteur inflammatoire TNF $\alpha$ , dans des modèles murins d'obésité et de diabète, améliore l'utilisation du glucose en réponse à l'insuline et permet une meilleure sensibilité à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993, Uysal et al., 1997). Au niveau moléculaire, le TNF $\alpha$  altère la signalisation de l'insuline par phosphorylation de résidus serine sur IRS1 (Tilg and Moschen, 2008) et diminue l'expression de GLUT4 (Schinner et al., 2005), faisant du TNF $\alpha$  le médiateur pro-inflammatoire majeur faisant le lien entre inflammation, obésité et IR.

La production d'IL6, aux propriétés pro-inflammatoires, favorise l'apparition d'une IR hépatique, malgré un effet insulino-sensibilisateur au niveau du muscle squelettique (Maury and Brichard, 2010).

L'IL1 $\beta$  peut agir en synergie avec le TNF $\alpha$  et l'IL6 pour altérer le métabolisme des adipocytes. Il s'agit d'un facteur important dans le développement de la résistance à l'insuline (Jager et al., 2007).

Enfin, la protéine MCP-1 est une chimiokine impliquée notamment dans le recrutement des monocytes au sein du TA (Maury and Brichard, 2010, Bruun et al., 2005) et diminue le captage du glucose des adipocytes différenciés sous traitement insulinique (Maury and Brichard, 2010).

Les cellules responsables de cette inflammation au niveau du TA semblent être en grande partie les macrophages. En effet, une accumulation de ces cellules immunitaires dans le TA au cours de l'obésité a été largement observée chez des modèles murins et chez l'Homme (Weisberg et al., 2003, Xu et al., 2003). Ainsi, le TA de souris *ob/ob* présente des amas de macrophages par rapport à celui des souris sauvages C57BL/6J (Shoelson et al., 2007). Cette infiltration macrophagique est corrélée avec l'IMC et avec la taille des adipocytes présents (Weisberg et al., 2003). Cette infiltration résulte du recrutement et de l'activation de monocyte *via* plusieurs facteurs tels que MCP-1, mais aussi la leptine et l'hypoxie. Une fois activés en macrophages, ceux-ci sécrètent plusieurs molécules pro-inflammatoires susceptibles de participer au recrutement de nouveaux monocytes circulants (Figure 6) (Weisberg et al., 2003). Néanmoins, le TA comporte de façon totalement physiologique des macrophages résidents jouant un rôle dans le maintien de l'intégrité du tissu et également sa plasticité (Gordon and Taylor, 2005). Le pourcentage de macrophages dans le TA d'individus sains est d'environ 10 % et il peut atteindre 40 % dans le TA d'individus obèses. Ces macrophages infiltrés sont organisés en agrégats entourant des adipocytes sénescents ou morts (Cinti et al., 2005). Deux types de macrophages peuvent être observés dans le



*Figure 6 Inflammation du tissu adipeux et recrutement de macrophage*

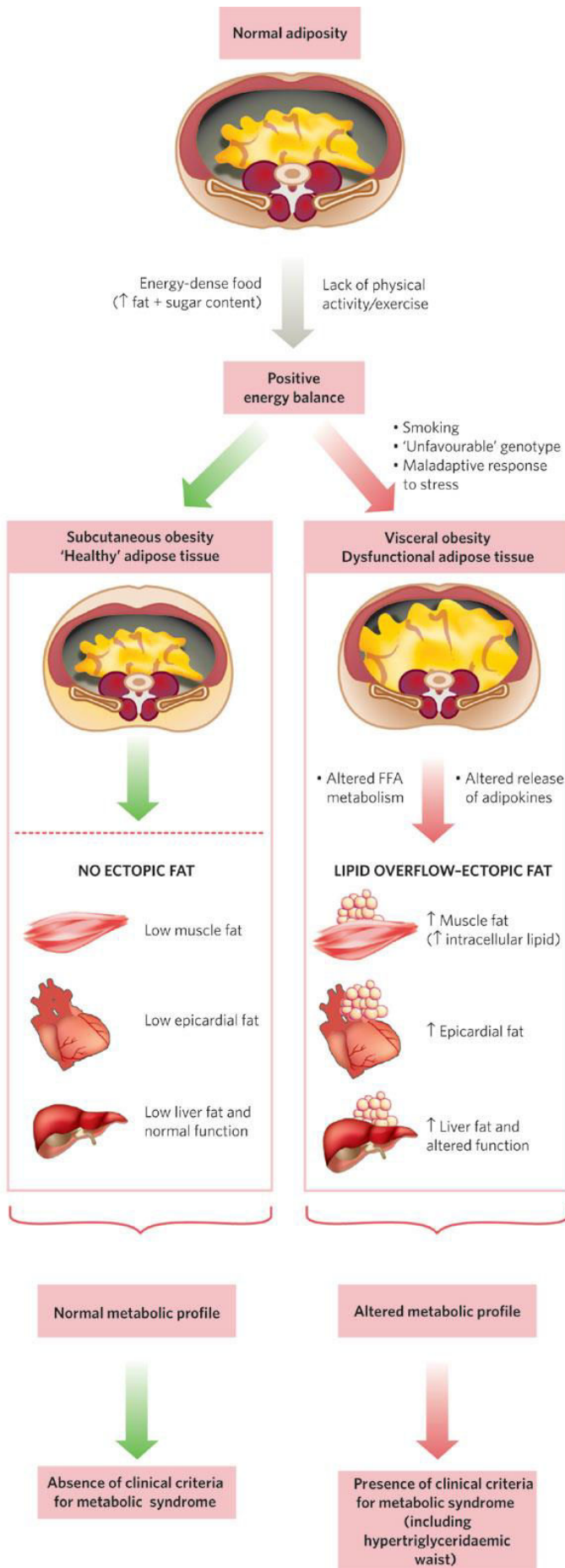
*(Inspiré de Trends in immunology)*

TA : les macrophages M2 présents en faible quantité dans le TA sain et possédant des propriétés anti-inflammatoires (sécrétion par exemple d'IL10) (Maury and Brichard, 2010) et les macrophages M1 activés aux propriétés pro-inflammatoires (expression fortement augmentée de CD14, TNF  $\alpha$  et IL6) (Maus et al., 2001, Lumeng et al., 2007, Hotamisligil et al., 1993). L'activation de type M2 a lieu dans un contexte parasitaire, stimulé par les cytokines IL4 et IL13, avec une activité d'endocytose et également impliqué dans la réparation et le remodelage tissulaire (Gordon, 2003). L'activation de type M1 a lieu en réponse à une stimulation de type bactérienne, pouvant être induite par des LPS (lipopolysaccharide) et stimulée en présence d'IFN $\gamma$ , un produit de la voie de signalisation du TNF $\alpha$ . Le macrophage acquiert alors des propriétés hautement inflammatoires avec une activité phagocytaire et anti-microbienne importante, jouant un rôle dans les dommages tissulaires.

### **III.3. Atteintes hépatiques**

En plus du TA et du muscle, le foie est un organe également touché. En effet, les cytokines produites par le TA blanc peuvent passer dans la circulation sanguine et atteindre le foie (Neyrinck et al., 2009).

Le foie est constitué à près de 5 % de cellules de Kupffer (macrophages résidents) inactives en condition normale, mais qui peuvent s'activer en réponse à des stimuli inflammatoires. Une étude a montré que l'expression des facteurs inflammatoires au niveau hépatique était corrélée à l'importance de la stéatose hépatique non alcoolique, qui est caractérisée par la présence de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (Cai et al., 2005). Chez les individus obèses, 95 % seraient atteints de stéatose hépatique et 70 % chez les diabétiques de type 2 (Cornier et al., 2008). Par conséquent, la stéatose hépatique est corrélée à l'apparition de l'obésité et l'IR (Souza et al., 2012). Cette atteinte hépatique touche 10 % de la population dans les pays en voie de développement contre 30 % dans les pays industrialisés (Smith and Adams, 2011). L'incidence de cette pathologie est augmentée de 11 fois chez les femmes et de 4 fois chez les hommes atteints de MetS, dont la teneur en lipides hépatiques est quatre fois plus élevée (Cornier et al., 2008). La stéatose peut évoluer en inflammation hépatique nommée stéatohépatite souvent accompagnée d'une fibrose, mais également en cirrhose pour parfois aboutir à un hépatocarcinome (Musso et al., 2010). Les interactions délétères entre TA et foie induisent un état de lipotoxicité. En effet, quand les capacités de stockage du TA se trouvent altérées ou dépassées, les lipides peuvent alors se déposer dans des régions ectopiques telles que le foie. On parle alors de « débordement lipidique » (Figure 7) (Despres and Lemieux, 2006) qui participe fortement au développement du MetS.



*Figure 7 L'hypothèse du débordement lipidique*

*Le stockage au niveau du TA blanc de l'énergie a un effet protecteur sur le développement du syndrome métabolique. Lorsque le TA blanc devient déficient ou insulino-résistant, l'excès de lipides est stocké dans des zones ectopiques telles que le foie, le muscle et le cœur. Ce "débordement lipidique" serait responsable d'un profil métabolique altéré conduisant à l'apparition de maladies métaboliques (D'après Despres et Lemieux 2006).*



L'accumulation de lipides dans les hépatocytes pourrait participer à l'augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires, potentialisant les effets de la stéatose hépatique. Un contrôle de cette réponse inflammatoire permettrait d'améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline au niveau du foie, chez des animaux obèses et diabétiques (Neyrinck et al., 2009). En effet, une résistance à l'insuline dans les hépatocytes a pour conséquence un stockage post-prandial diminué sous forme de glycogène et une augmentation de la production de glucose à jeun médiée par une régulation positive des gènes de la néoglucogenèse tels que la PEPCK et la G6P (Capeau, 2008). Des facteurs de transcription tels que SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1) et chREBP (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein) peuvent alors être activés par les taux croissants en insuline et glucose, ce qui peut activer par la suite des enzymes lipogéniques dans le foie (ACC pour Acyl-CoA Carboxylase et FAS) participant à l'apparition d'une stéatose. Le facteur SREBP-1c est impliqué dans la stéatose hépatique (Yahagi et al., 2002), la perte de la fonction sécrétrice  $\beta$  pancréatique par une régulation négative de IRS2 (Takahashi et al., 2005, Shimano, 2009) et sa surexpression chez la souris conduit à une stéatose hépatique. Les facteurs de transcription PPARs (peroxisome proliferator activated receptor) sont également exprimés dans le foie. Ils participent fortement à la régulation de l'oxydation des AG et la différenciation cellulaire (Francis et al., 2003) et dans l'inflammation (Hong and Tontonoz, 2008). Dans le foie, PPAR $\alpha$  conduit à l'expression de gènes d'oxydation de AG (Mandard et al., 2004) et une perte d'expression de ces facteurs conduit à une accumulation de TAG hépatiques et une IR. Les études utilisant les fibrates qui sont des agonistes des PPAR $\alpha$  ont montré une amélioration de la biologie hépatique chez les malades ayant une stéatose hépatique (Basaranoglu et al., 1999).

## **IV. Le microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal regroupe l'ensemble des microorganismes (bactéries principalement, mais aussi levures et virus), dont la majeure partie est présente dans le tractus gastro-intestinal supérieur. De nombreuses découvertes ont montré que cette communauté microbienne de près de  $10^{14}$  bactéries (contre  $10^{13}$  cellules) devait être considérée comme un nouveau partenaire impliqué dans de nombreuses interactions avec nos propres cellules humaines (Savage, 1977, Hooper and Gordon, 2001). Cette communauté bactérienne perdure par la consommation de produits alimentaires ou issus de la desquamation de nos tissus et permet d'exercer les mécanismes physiologiques nécessaires pour assurer la bonne santé de l'hôte. La diversité génétique de ce microbiote est estimée à 300 000 gènes alors que notre organisme n'en comprend que 30 000 et représente environ 500 à 1000 espèces différentes. C'est pourquoi le microbiote intestinal est considéré comme un organe à part entière (Turnbaugh et al., 2007, Walter and Ley, 2011).

### **IV.1. Acquisition du microbiote**

Le microbiote se met en place progressivement chez l'Homme au cours des 2 voire 4 premières années de vie (Koenig et al., 2011, Scholtens et al., 2012), âge où l'individu acquiert un microbiote proche de celui de l'adulte. Durant l'accouchement par voie basse, le tractus digestif du nouveau-né stérile est colonisé par des bactéries anaérobies facultatives telles que les *Entérobactéries*, les *Entérocoques* et les *Staphylocoques*, qui consomment l'oxygène présent dans le tractus (Favier et al., 2002). Ces bactéries proviennent de la flore vaginale et anale de la mère (Fanaro et al., 2003, Palmer et al., 2007). La consommation de l'oxygène du tractus digestif de l'enfant favorise la supplantation progressive de bactéries anaérobies strictes telles que le genre *Firmicutes* (Favier et al., 2002). Ce phénomène de colonisation par les bactéries est influencé par l'entourage de l'enfant mais aussi par des facteurs environnementaux comme le mode d'accouchement (par césarienne ou voie basse), les mesures d'hygiène lors de l'accouchement, le type d'alimentation du nourrisson (allaitement ou lait artificiel) (Dethlefsen et al., 2006). Les enfants nés par césarienne présentent ainsi peu de *Bactéroïdes* et *Bifidobactéries* dans leur tractus digestif, puisqu'ils n'auront pas été exposés à la flore vaginale de la mère tandis que parallèlement la proportion d'*E. coli*, de *Staphylococcus*, de *Streptococcus* et de *Clostridium* sera plus importante. En outre, l'implantation de la flore anaérobie stricte est plus tardive (Biasucci et al., 2008, Penders et al., 2006). Un nouveau-né nourri au lait infantile présentera plus de *Bactéroïdes*, *Clostridium* et *Staphylococcus* qu'un nouveau-né nourri au sein, développant une flore dominée par des *Bifidobactéries*. Sa flore intestinale sera plus complexe et

diversifiée que le nourrisson allaité, mais cette différence en matière de diversification tend à se réduire au moment de l'introduction d'une alimentation mixte dans son régime alimentaire (Di Mauro et al., 2013, Penders et al., 2006). L'équilibre écologique de la flore intestinale de l'adulte peut également être modulé par des changements hormonaux, des habitudes de vie et de soin et le statut sanitaire (Figure 8) (Ottman et al., 2012).

## **IV.2. Méthodes d'étude du microbiote et composition**

Il existe une réelle diversité bactérienne, tant quantitatif que qualitatif, au niveau du système digestif. L'étude de cette diversité n'est pas simple et les premières techniques de mise en culture ne permettent pas la mise en évidence de la totalité des espèces présentes. En effet, ces techniques classiques basées sur des caractéristiques morphologiques et métaboliques telles que la coloration de Gram, la fermentation des sucres ou encore la présence d'enzymes spécifiques n'ont pu mettre en évidence que 5 phyla bactériens dominants cultivables du microbiote fécal à savoir les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Eckburg et al., 2005) contre 30 existants. Cette différence dans la diversité des bactéries détectées a pour principale cause la difficulté de mise en culture des bactéries anaérobies. À partir des années 1980, les nouvelles techniques d'identification basées sur le séquençage des ADN codants pour les ARN ribosomiques ont permis une classification plus fine des familles, genres, et espèces bactériennes qui constituent la flore intestinale (Turnbaugh et al., 2007, Zaneveld et al., 2008, Mahowald et al., 2009). Ces études métagénomiques ont permis l'identification d'un grand nombre de micro-organismes de notre tractus intestinal (De Preter and Verbeke, 2013, Lagier et al., 2012). Elles sont basées sur des critères de proximité génétique par l'étude de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) et de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). La molécule d'ADNr 16S est ubiquiste chez toutes les bactéries et sa région constante définit le phylum, tandis que sa région variable caractérise le genre et l'espèce de la bactérie considérée. La molécule d'ARNr 16S est présente dans toutes les bactéries et sa fonction ne varie pas.

Les méthodes moléculaires quantitatives classiques sont les techniques d'hybridation ponctuelle ou dot plot (semi-quantitative), d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en temps réel, le multiplexage (amplification de plusieurs segments d'ADN distincts) et le pyroséquençage. Ces techniques donnent à la fois des renseignements sur la proportion de bactéries mais également sur sa distribution au sein de l'échantillon considéré. Les méthodes moléculaires qualitatives classiques permettant d'identifier les souches bactériennes et d'analyser leurs liens phylogéniques sont le polymorphisme de longueur

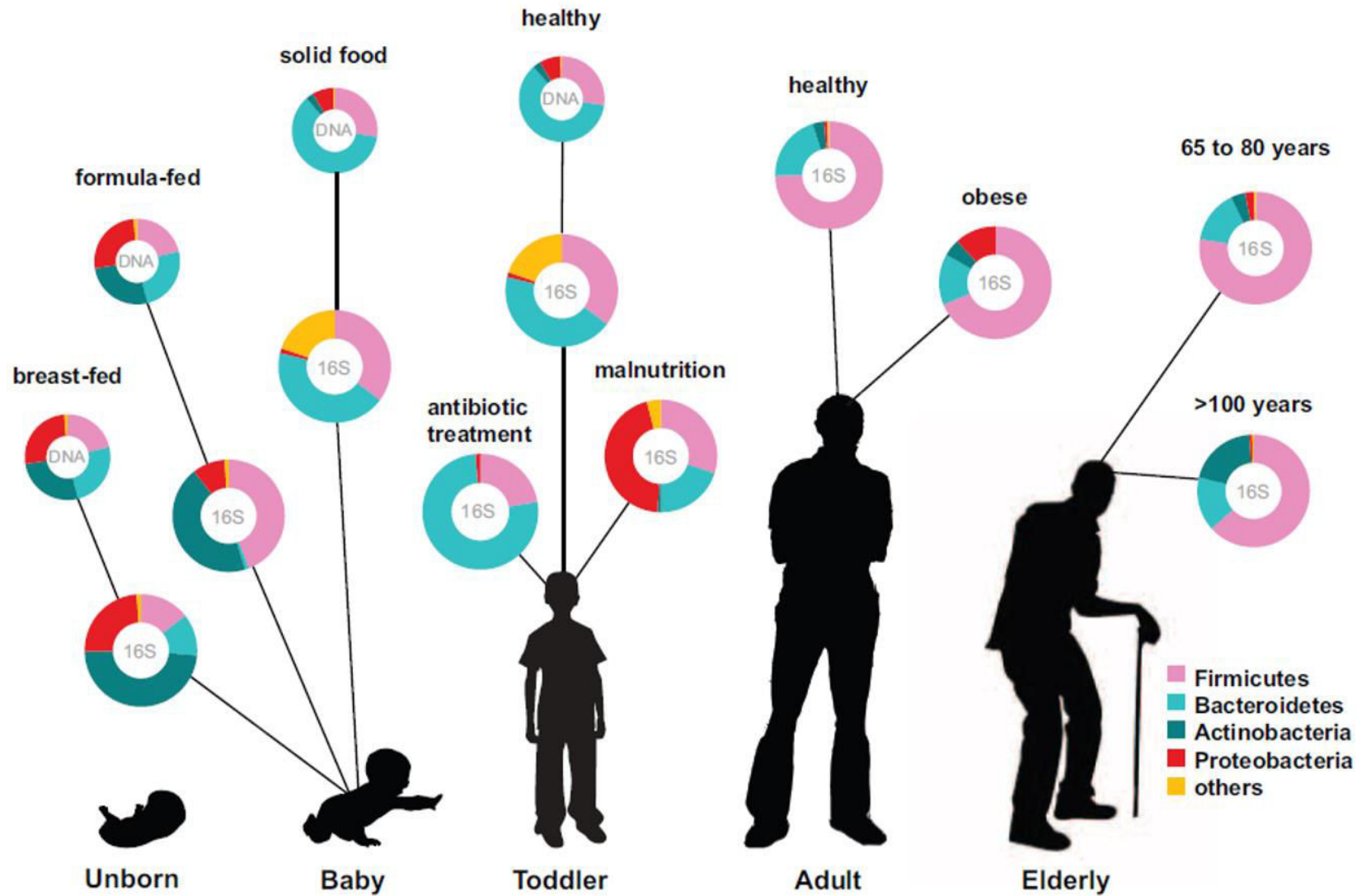


Figure 8 Mise en place du microbiote intestinal humain à travers les différentes étapes de la vie

(d'après Ottman et al., 2012)

des fragments de restriction (PLFR), l'électrophorèse en champ pulsé et l'électrophorèse sur gel dénaturant. Ces techniques demandent une étape préliminaire d'amplification de certaines parties du gène codant l'ARNr 16S par PCR et l'utilisation d'enzymes de restrictions sélectives du genre bactérien étudié.

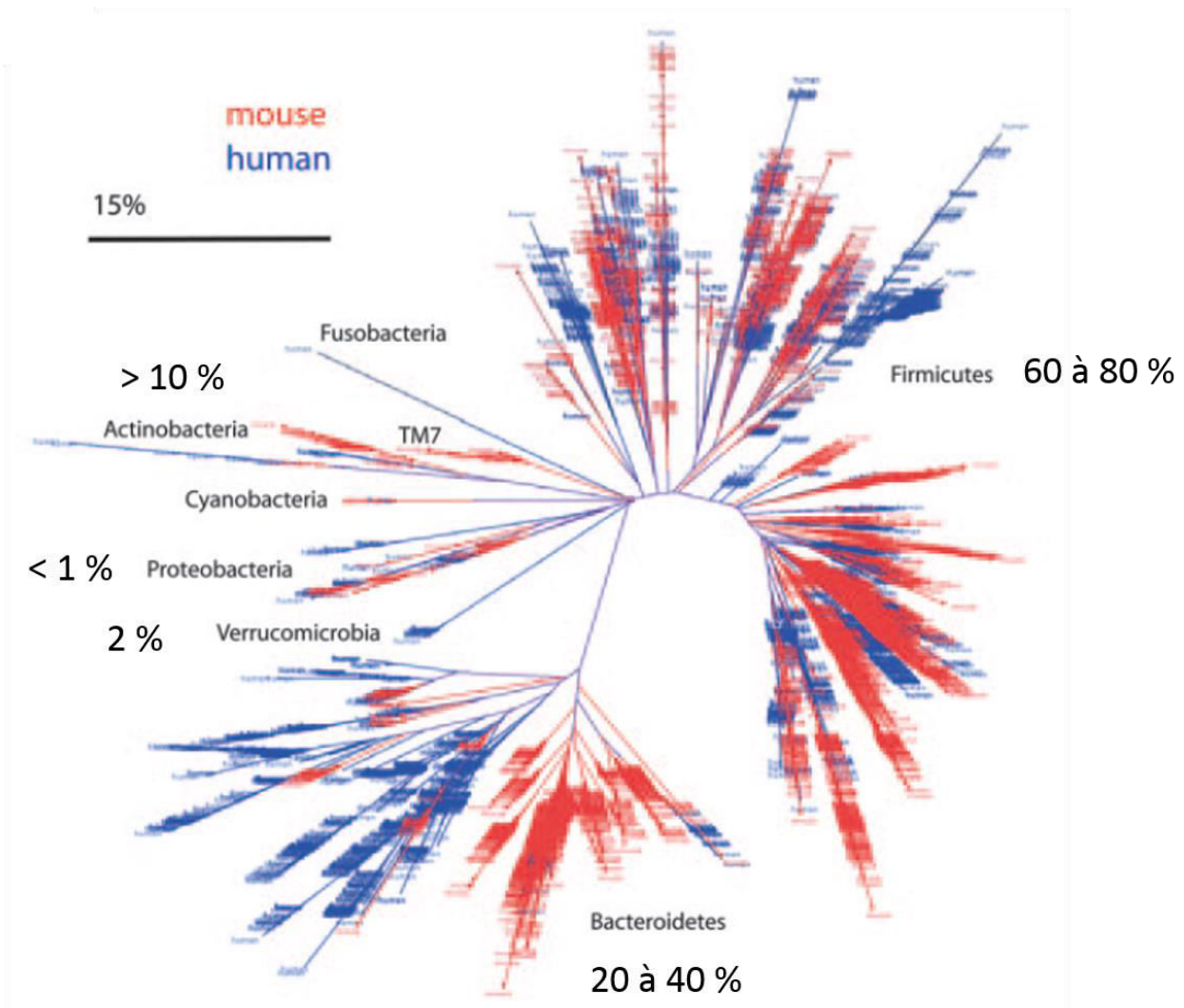
L'analyse du microbiote par ces nouvelles techniques fait ressortir 4 phyla bactériens, communs à l'ensemble des individus et représentatifs de la plus grande part des bactéries intestinales dominantes : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*, et plusieurs mineurs (*Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus–Thermus*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*). Ces espèces très majoritairement commensales ne jouent pas de rôles pathogènes (Ley et al., 2006, Chan et al., 2013). Bien que 85 % des séquences de l'ARN ribosomal 16S retrouvées chez la souris correspondent à un genre bactérien qui n'est pas détecté chez l'Homme, il y a des similitudes considérables entre le microbiote intestinal de l'Homme et celui de la souris. Comme chez l'Homme, les deux principales divisions bactériennes sont les *Firmicutes* (60% à 80 % des séquences) et les *Bactéroïdetes* (20 % à 40 %) (Figure 9) (Ley et al., 2005, Ley et al., 2006).

Les *Firmicutes* sont des bactéries à Gram positif possédant un large éventail d'enzymes pouvant métaboliser les carbohydrates et ainsi former du butyrate et du lactate. Elles présentent des diversités dans leur morphologie (forme spiralée ou coccoïde,...), dans leur rapport à l'oxygène (métabolisme aérobie ou anaérobie) ou dans leur capacité à produire ou non des spores (bactéries résistantes ou non). Le phylum *Firmicutes* est toujours fortement représenté et réunit plus de la moitié des bactéries du microbiote intestinal et se compose de trois classes : *Bacilli*, *Clostridia* et *Mollicutes* (Duncan et al., 2007, Arumugam et al., 2011).

Les *Bactéroïdetes* (également nommées CFB pour *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) partagent la dominance avec les *Firmicutes*. Ce phylum comporte 3 classes : *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* et *Sphingobacteria*. Les espèces apparentées au genre *Bacteroides* permettent principalement l'absorption des nutriments, la maturation et l'intégrité des cellules épithéliales (Qin et al., 2010).

Les *Actinobacteria* sont des bactéries à Gram positif représentant environ 10 % des bactéries totales du microbiote. Les deux genres retrouvés en abondance dans les selles sont *Bifidobacterium* et *Collinsella* (Arumugam et al., 2011).

D'autres phyla sont également représentés mais en faible quantité : il s'agit des *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *TM7* (ce dernier n'ayant pour l'instant aucun représentant cultivable) et *Verrucomicrobia*



*Figure 9* Arbre phylogénétique des principaux phyla du tractus intestinal humain et leur présence relative

*La barre représente une divergence de séquence de 15 % (d'après Ley et al., 2005).*

avec comme espèces *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004) et *Victivallis vadensis* (Zoetendal et al., 2003).

L'étude phylogénétique ne permet cependant pas de comprendre la complexité du rôle joué par le microbiote dans la biologie humaine (Davies, 2001). Une étude métagénomique des communautés bactériennes de la bouche, du tractus intestinal, de l'appareil reproducteur et de la peau a été entreprise en 2002 (Relman, 2002). Les termes « métagénome » et « microbiome » désignent alors l'ensemble du génome de tous les membres de la communauté bactérienne. Le projet de recherche nommé « MetaHIT » pour Metagenomics of the human intestinal Tract ([www.matahit.eu](http://www.matahit.eu)) coordonné par l'institut scientifique de recherche agronomique (INRA) est à l'initiative d'une large investigation sur le microbiome humain (Group et al., 2009) et a permis d'identifier 3 groupes de bactéries intestinales (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*) permettant de différencier les individus. Ces signatures bactériennes sont nommées des entérotypes (Arumugam et al., 2011). La classification en entérotypes a été déterminée par l'abondance de certains types de bactéries mais aussi par le potentiel génétique (fonctions biologiques) de ces bactéries, sur 39 échantillons provenant de 3 continents (Europe, Amérique, Asie).

### **IV.3. Fonctions physiologiques du microbiote**

L'utilisation d'animaux axéniques (dépourvus de microbiote intestinal) dans le cadre d'études combinant microbiologie, physiologie et génomique a notamment permis de révéler l'implication de ce microbiote dans des fonctions biologiques extrêmement diversifiées. Ces fonctions physiologiques spécifiques peuvent être métaboliques, trophiques et protectrices.

#### **IV.3.1. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal**

L'une des fonctions physiologiques principale du microbiote intestinal est la fermentation des résidus alimentaires non digestibles par l'hôte. Les substrats produits sont alors absorbés principalement au niveau du jéjunum, l'iléon et le côlon. Le résultat final est une récupération d'énergie additionnelle et de substrats assimilables pour l'hôte, mais aussi une croissance et une prolifération bactériennes. Cette source d'énergie « additionnelle » représenterait plus de 10 % de l'énergie alimentaire totale apportée à l'Homme (McNeil, 1984).

Le microbiote du tractus intestinal intervient dans le métabolisme des glucides dit complexes ou fermentescibles composant les fibres alimentaires (10 à 60 g par jour en fonction du régime alimentaire). Il s'agit d'une dégradation anaérobie de ces substrats par l'intervention d'une grande variété d'hydrolases (polysaccharidases, glycosidases...), enzymes inexistantes chez l'hôte. Les principales espèces concernées sont des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Bactéroïdes*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* (et quelques espèces des genres *Enterococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium*) (Cummings and Macfarlane, 1991). Cette fermentation des glucides non digestibles (polysaccharides, amidon résistant, cellulose, hémicellulose, pectines, oligosaccharides, sucres-alcools) produit des acides gras à courte chaîne (AGCC), tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, qui pourront servir de substrats glucogéniques ou lipogéniques (Flint et al., 2008, Wong et al., 2006). Ces AGCC sont également les ligands de récepteurs couplés aux protéines G (GPR41 et GPR43) présents sur les entérocytes (Brown et al., 2003). Enfin, la grande quantité de gaz formés (hydrogène) lors de ces processus fermentaires est en majeure partie réutilisée par le microbiote intestinal (Figure 10) (Christl et al., 1992).

Les récepteurs GPR (G protein coupled receptors) sont des molécules de signalisation importantes impliquées dans de plusieurs fonctions cellulaires (signalisation par les MAPK, modulation de l'AMPc) (Ulloa-Aguirre et al., 1999, Gether, 2000). Ils appartiennent à une grande famille et partagent un motif structural commun (sept hélices transmembranaires) et la capacité d'activer des protéines G hétérotrimériques ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha q}$ ). Les ligands interagissent spécifiquement avec les GPRs afin de stimuler et induire des réponses cellulaires diverses *via* de nombreux messagers secondaires (Ulloa-Aguirre et al., 1999, Gether, 2000). Des études ont montré que les GPR orphelins 40, 41, 43, 84 et 120 sont activés par des AG libres. Les AGCC sont des agonistes spécifiques de GPR41 et GPR43 (Brown et al., 2003, Tazoe et al., 2008), et les AG à chaîne moyenne sont spécifiques de GPR84 (Wang et al., 2006a). Les AG à chaîne longue activent quant à eux les GPR40 (Itoh et al., 2003) et GPR120 (Hirasawa et al., 2005). Les GPR120 sont très exprimés dans le TA et dans les macrophages pro-inflammatoires et présentent des propriétés anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes (Oh et al., 2010).

Le microbiote permet également le métabolisme anaérobie des protéines et peptides résiduels dans le côlon, produisant également des AGCC accompagnés cependant de substances potentiellement toxiques pour l'organisme, telles que l'ammoniaque, des phénols, indoles et amines (Macfarlane et al., 1986, Smith and Macfarlane, 1997). Ce métabolisme fait intervenir un nombre important d'interactions bactériennes mais il est quantitativement moins important que celui des



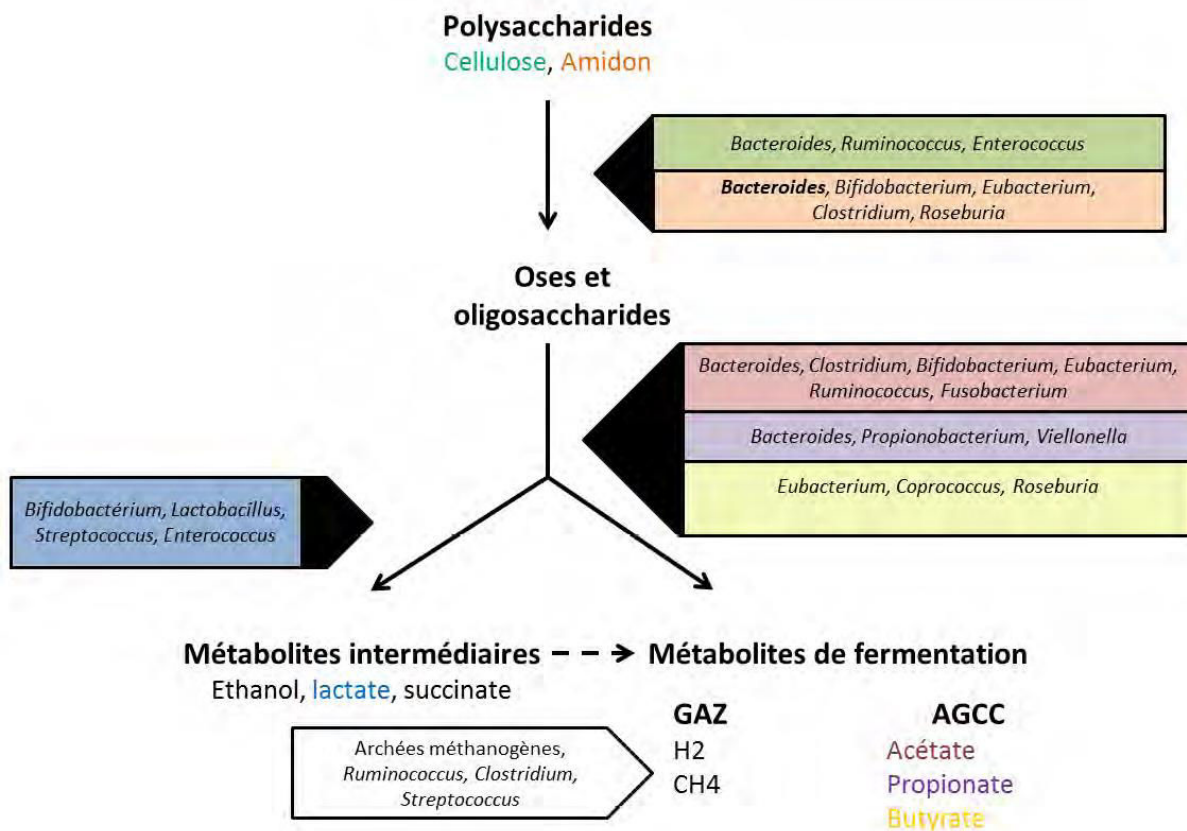


Figure 10 Les microorganismes intestinaux impliqués dans le métabolisme glucidique.

Inspiré de Gérard and Bernalier-Donadille, 2007

glucides, en particulier dans le côlon (6 à 18 g par jour, dont 1 à 2 g proviendraient de l'effluent iléal proximal) (Cummings and Macfarlane, 1991).

Enfin, le microbiote intestinal participe au métabolisme des lipides (AG et TAG) mais également des stérols (cholestérol, acides biliaires, hormones stéroïdiennes), n'ayant pas été absorbés au niveau de l'intestin grêle (Wostmann, 1973, Macdonald et al., 1983, Ridlon et al., 2006, Gerard et al., 2007). Les lipides présents dans le côlon ont plusieurs origines : cycle entéro-hépatique (acides biliaires, hormones stéroïdes), alimentation, desquamation de l'épithélium colique ou bactéries et représentent entre 5 et 8 g par jour. Les acides biliaires permettent leur (ré)absorption par la barrière intestinale grâce à l'acquisition de propriétés hydrophobes. De plus, de nombreuses espèces bactériennes possèdent les lipases nécessaires à l'hydrolyse des TAG à chaînes longues (Jaeger et al., 1994). Les AG insaturés à 18 atomes de carbone sont métabolisés par le microbiote intestinal, tandis que les AG à 20 ou 22 atomes de carbone ne le sont pas (Howard and Henderson, 1999).

#### **IV.3.2. Fonctions trophiques et protectrices du microbiote intestinal**

Les effets trophiques du microbiote intestinal s'exercent sur la muqueuse digestive, par un apport d'éléments assimilables comme les AGCC provenant des différents métabolismes. Ces AGCC stimulent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon (Frankel et al., 1994).

Le microbiote intestinal développe des réponses protectrices cellulaires et humorales envers les virus, bactéries ou parasites entéropathogènes et exerce de nombreux effets structuraux et métaboliques sur l'épithélium colique avec lequel il est en contact (Mowat, 2003). Il exerce ainsi un rôle de protection en empêchant et en prévenant l'implantation de pathogènes et influence le développement et la maturation du système immunitaire de notre intestin. Par exemple, *Bacteroides thetaiotaomicron* est une bactérie commensale qui a montré des propriétés pro-angiogéniques bénéfiques dans le développement des villosités intestinales ; le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* inhibe les lymphocytes Th17 et augmente la production d'IL10 (Stephani et al., 2011). En outre, les bactéries sont en compétition directe pour les sites d'adhérence situés dans la bordure en brosse des cellules épithéliales, ce qui permet un contrôle de l'écologie microbienne (Bernet et al., 1994).

D'autre part, le microbiote intestinal est également impliqué dans le maintien de la fonction barrière de l'intestin. Certaines bactéries permettent une régulation positive des gènes impliqués

dans la translocation de jonctions serrées ou le maintien des desmosomes participant à la fonction barrière de l'épithélium et assurant son intégrité (Di Mauro et al., 2013). De plus, certains *Lactobacilles* stimulent la synthèse de mucines - des glycoprotéines présentes dans la couche de mucus -, ce qui crée un gel visqueux empêchant le contact des bactéries avec les entérocytes et renforce ainsi la barrière protectrice de mucus (Stephani et al., 2011).

## **V. Microbiote intestinal et maladies métaboliques**

Le microbiote intestinal, considéré comme un organe extériorisé, est un facteur clé dans l'homéostasie et la régulation du stockage énergétique de l'hôte, suggérant un rôle dans la mise en place de maladies métaboliques. Des études récentes utilisant des animaux dépourvus de toute flore microbienne (dits axéniques), ont permis de mettre en évidence, lors d'expériences de colonisation par inoculation du tube digestif avec une ou plusieurs espèces bactériennes, l'implication du microbiote intestinal dans l'obésité et l'IR. (Clavel et al., 2014, Backhed et al., 2004)

C'est en 2004 que le lien entre la flore intestinale et l'homéostasie énergétique de l'hôte a été décrit pour la première fois. En effet, il a été montré que des souris axéniques âgées de huit semaines présentaient une masse adipeuse nettement inférieure à celle des souris conventionnelles (normalement pourvues de microorganismes). De plus, ces souris nouvellement colonisées avec une flore microbienne de souris témoins, présentaient une prise de poids (développement de la masse adipeuse de 60 %) et l'émergence d'une IR deux semaines seulement après cette colonisation. Ces modifications métaboliques ont de plus été associées à une diminution de l'expression intestinale du facteur circulant Fiaf (fasting-induced adipose factor, également nommé angiopoietin-like protein 4) (Backhed et al., 2004). Le facteur Fiaf est un inhibiteur de l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL) produite notamment par le foie et le TA, participant au stockage d'AG alimentaires sous forme de TAG dans le TA. Backhed et collaborateurs ont montré que des souris invalidées pour Fiaf présentaient une augmentation de l'activité de la LPL dans les adipocytes, conduisant au captage des AG et à l'accumulation des TAG dans les adipocytes. Il a également été montré, au niveau du foie, une augmentation de l'expression de ChREBP et SREBP-1, deux facteurs de transcription impliqués dans la lipogenèse hépatique (ciblant ACC et FAS) en réponse à l'insuline et au glucose, et agissant de manière synergique. Ceci entraîne une lipotoxicité et l'accumulation de lipides dans les tissus périphériques, favorisant l'augmentation de la masse grasse (Backhed et al., 2004). En 2006, il a été montré que des souris axéniques colonisées avec la flore microbienne de souris obèses (*ob/ob*), présentaient une augmentation rapide de leur poids. Cette prise de poids est plus importante que celle observée pour des souris axéniques colonisées avec le microbiote de souris minces (Turnbaugh et al., 2006). Enfin, des souris invalidées pour GPR41, conventionnelles ou axéniques, prennent moins de poids que des souris sauvages malgré un régime alimentaire similaire. La déficience de GPR41 chez ces souris a pu être associée à une augmentation du transit intestinal, une diminution de l'extraction de l'énergie des aliments et une diminution de la lipogenèse hépatique. En effet, GPR41, stimulé par des AGCC tels que l'acétate et le propionate serait à l'origine d'une augmentation de l'absorption des lipides *via* une motilité intestinale

augmentée et une vitesse de transit réduite. De plus, GPR41 est capable d'inhiber la lipase adipoocytaire, de moduler la production de leptine avec pour conséquence de favoriser le stockage d'énergie dans le TA (Samuel et al., 2008). L'ensemble de ces phénomènes est à l'origine d'une nouvelle théorie, dite de la rentabilité énergétique (Figure 11) expliquant le lien entre le microbiote intestinal et l'apparition de maladies métaboliques (Delzenne and Cani, 2008).

La colonisation de souris sauvages avec une flore de souris minces ou obèses n'induit pas le même phénotype chez l'animal colonisé. Ainsi, la présence du microbiote en lui-même ne semble pas être le seul vecteur d'apparition de maladies métaboliques. La qualité de ce dernier semble affecter directement l'homéostasie énergétique et participer à l'apparition de maladies métaboliques. L'étude et la comparaison des phyla bactériens retrouvés dans le tractus digestif de souris *ob/ob* ou sauvages ont montré des différences. En effet, le microbiote d'animaux obèses possède moitié moins de *Bactéroïdetes* et deux fois plus de *Firmicutes* que celui d'animaux minces (Ley et al., 2005, Backhed et al., 2007). L'étude menée par Turnbaugh et collaborateurs révèle que 75 % des gènes associés à l'obésité proviendraient des *Actinobactéries*, les 25 % restants provenant des *Firmicutes*; alors que 42 % des gènes chez les individus minces proviennent des *Bactéroïdetes* (Turnbaugh et al., 2009). Une diminution du poids corporel induite par un régime hypocalorique permet de restaurer un profil bactérien similaire à celui de sujets minces (Ley et al., 2006). Cela suggérerait que des changements qualitatifs qui ciblent plus spécifiquement certains genres, voire souches de bactéries, peuvent être reliées à l'obésité et que toutes les bactéries ne joueraient pas un rôle identique dans le dialogue métabolique avec l'hôte. Everard et collaborateurs ont également montré, chez des souris obèses et diabétiques, une diminution importante de l'abondance en *Akkermansia muciniphila*, et ce que l'obésité soit génétique ou nutritionnelle (régime riche en lipides). Cette souche bactérienne jouerait un rôle-clé dans la physiopathologie de l'obésité, du DT2 et de l'inflammation métabolique (Everard et al., 2013). L'abondance de cette souche semblerait inversement corrélée aux manifestations du MetS (Everard et al., 2013, Shin et al., 2014, Anhe et al., 2015) et constitue un marqueur de richesse et de diversité microbienne (Belzer and de Vos, 2012). L'administration de la souche vivante *Akkermansia muciniphila*, à des souris rendues obèses et diabétiques par un régime hyperlipidique, renverse le phénotype pathologique des souris. En effet, le gain de poids corporel des souris est deux fois moins important en présence qu'en absence du traitement avec *Akkermansia muciniphila*. Cette protection est reflétée par une diminution de moitié des graisses viscérales et sous-cutanées et par une augmentation des marqueurs d'oxydation des graisses tissulaires. De plus, les animaux recevant *Akkermansia muciniphila* ne présentaient plus

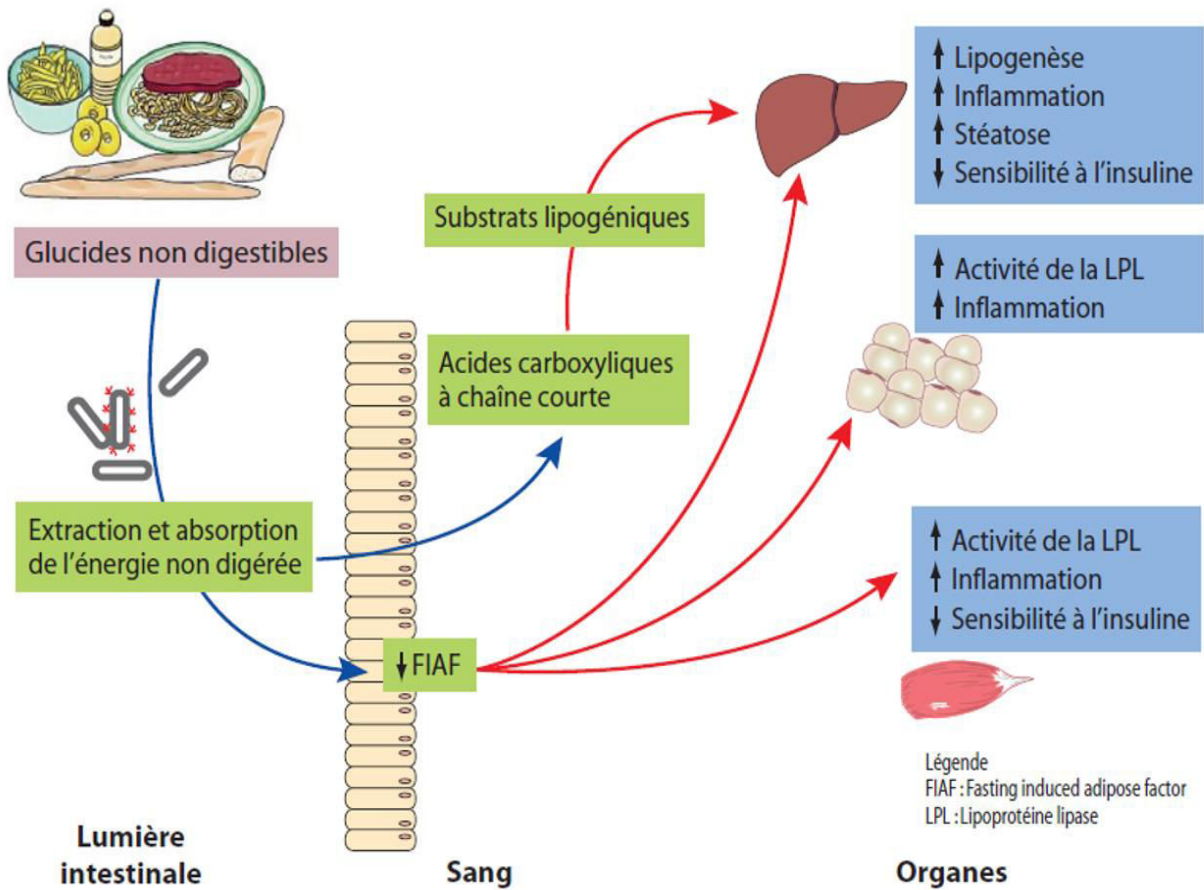


Figure 11 Théorie de la rentabilité énergétique

*L'énergie contenue dans les glucides digestibles (majoritaires) échappant à la digestion par les enzymes du tractus digestif supérieur peut être rendue disponible pour l'hôte à l'intervention des bactéries intestinales, qui les fermentent en acides gras à chaîne courte. Ces derniers peuvent être utilisés comme substrats lipogéniques et gluconogéniques par le foie. Par ailleurs, la flore intestinale régule l'expression de la protéine Fiaf modulant l'activité de la lipoprotéine lipase et permettant aux acides gras d'être captés par les tissus périphériques pour être stockés ou oxydés (D'après (Delzenne and Cani, 2008))*

d'IR, ni d'infiltration de cellules inflammatoires caractéristiques de l'obésité et de l'inflammation de bas grade qui lui est associée (Everard et al., 2013).

## **VI. Endotoxémie métabolique**

Il a été démontré suite à l'ingestion d'une alimentation hyperlipidique, l'implication du microbiote dans le développement d'une inflammation du TA et de désordres métaboliques. Ainsi, la relation entre l'inflammation de bas grade, les désordres métaboliques et le microbiote intestinal semblent être dépendants de l'activité des lipopolysaccharides (LPS), un composant de la paroi des cellules des bactéries à Gram négatif (Cani and Delzenne, 2009, Ley, 2010, Vrieze et al., 2010, Farhadi et al., 2008, Miele et al., 2009).

### **VI.1. Lipopolysaccharides**

#### **VI.1.1. Structure**

Les LPS sont des glycolipides de la paroi des bactéries à Gram négatif, telles que les *Bactéroïdes* (*Salmonella* et *Escherichia*). Les bactéries à Gram négatif présentes dans le tractus gastro-intestinal représentent alors une source majeure de LPS (Ravin et al., 1960, Schweinburg and Fine, 1960, Wiznitzer et al., 1960). Les LPS sont essentiels à la croissance et à la survie de la bactérie. Ils interviennent dans le maintien de l'intégrité de la paroi et la forme de la cellule (Sonesson et al., 1994). Chaque genre et chaque espèce de bactérie produit un LPS spécifique. Le feuillet externe des bactéries contient environ 45 % de LPS qui recouvrent près de 75 % de sa surface. Ainsi, chez *Escherichia coli*, on dénombre environ 3 millions de molécules de LPS par bactérie (Raetz and Whitfield, 2002). Les LPS sont libérés, non seulement lors de la mort des cellules bactériennes, mais aussi durant la croissance et la division bactérienne, faisant des LPS des contaminants ubiquitaires. Ils sont ensuite absorbés et transportés dans l'organisme *via* les lipoprotéines (Petsch and Anspach, 2000, Yaron et al., 2000).

Les LPS se divisent en plusieurs domaines structuraux : le lipide A, la fraction polysaccharidique composée du noyau et du core.

Le lipide A permet l'ancrage à la membrane de par son caractère hydrophobe. Il a la particularité de contenir des AG hydroxylés liés à deux sucres aminés. Le lipide A est responsable du pouvoir toxique inflammatoire des LPS lorsqu'il y a lyse bactérienne. La nature des sucres aminés ainsi que la nature et le nombre des AG sont variables selon les espèces bactériennes.

La fraction noyau interne liée au lipide A.

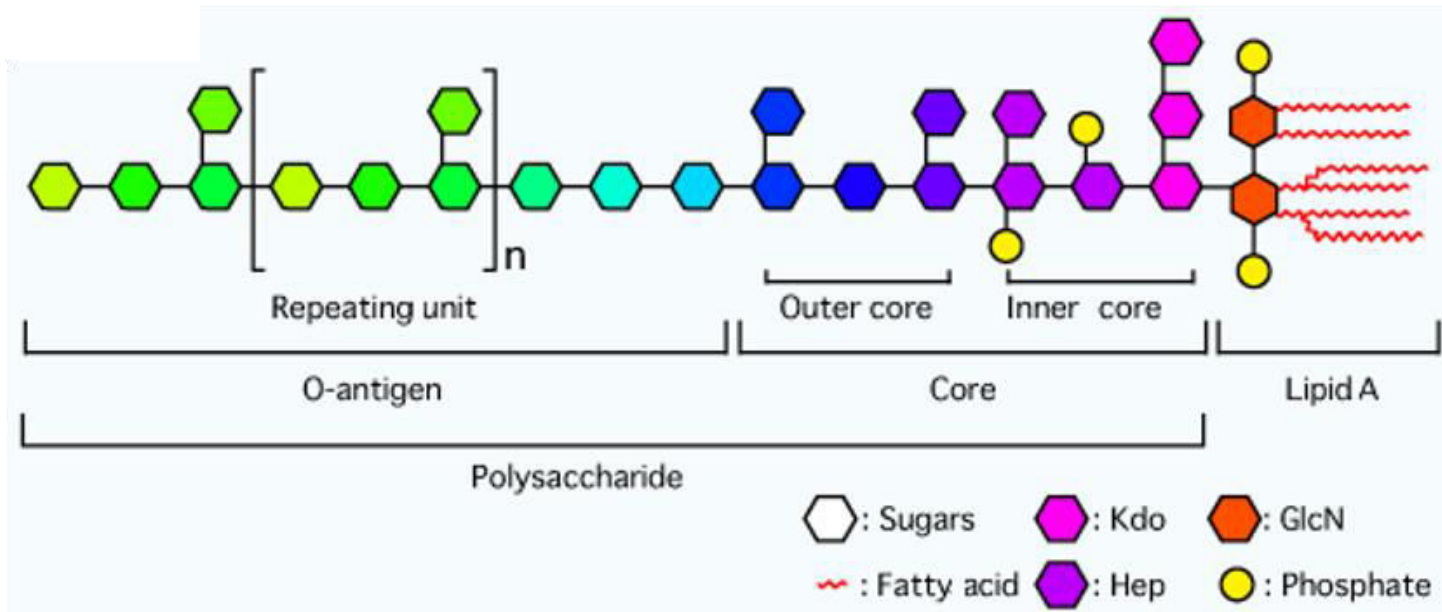


La fraction polysaccharidique est constituée d'un noyau ou core oligosaccharidique interne lié au lipide A et d'un core externe lié à des polysaccharides débordant de la membrane externe également appelé chaîne O. Le core est similaire pour les souches d'une même espèce mais varie entre les espèces. La chaîne O est liée à la partie variable des LPS. Elle est constituée de chaînes répétitives comprenant chacune de 3 à 8 sucres et dont le nombre est variable selon les espèces. (Figure 12) (Elin and Wolff, 1976, Raetz and Whitfield, 2002, Erridge et al., 2002).

### **VI.1.2. Transport**

Les LPS ne sont pas retrouvés libres dans la circulation sanguine, ils sont absorbés et transportés dans l'organisme *via* les lipoprotéines chylomicrons en phase post-prandiale. Ils sont ensuite libérés suite à l'hydrolyse par la LPL et pris en charge par la lipopolysaccharide binding protein (LBP). La LBP est une glycolipoprotéine principalement produite par le foie qui se lie avec une forte affinité au lipide A des LPS (Tobias et al., 1989). Toutes les lipoprotéines sont capables de séquestrer les LPS (Levels et al., 2001) et les véhiculer vers le foie pour leur élimination par les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie) (Toth and Thomas, 1992, Levine et al., 1993). La liaison des LPS aux lipoprotéines est dépendante du nombre de phospholipides à la surface de celles-ci (Manco et al., 2010).

En augmentant et redistribuant le contenu des phospholipides dans les différentes lipoprotéines, l'activité des LPS pourrait alors être atténuée (Levine et al., 1993). En effet, les phospholipides sont capables de lier la LBP qui délivre les LPS qu'elle transporte aux lipoprotéines et permet alors des échanges entre particules circulantes (Manco et al., 2010). En condition physiologique, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont les principaux vecteurs des LPS (Levine et al., 1993, Kitchens et al., 2003) et contribuent ainsi à leur détoxification. Au cours d'inflammation ou d'infection, le taux plasmatique de HDL et de cholestérol est diminué alors que les TAG et chylomicrons sont augmentés, favorisant une liaison des LPS aux lipoprotéines dépendante de leur contenu en phospholipides (Levine et al., 1993). La LBP semble alors délivrer les LPS préférentiellement aux lipoprotéines de faible densité (LDL) (Kitchens et al., 2003, Levels et al., 2001). Ce mécanisme de remodelage des lipoprotéines par des échanges de LPS entre LBP et HDL/LDL est un processus important dans la réponse du système immunitaire (Levine et al., 1993) en participant notamment à l'épuration hépatique des toxines de l'organisme. En cas de choc septique par exemple, les grandes quantités de LBP inhibent ainsi l'activité des LPS (Lamping et al., 1998, Zweigner et al., 2001). De plus, la liaison du LPS avec les lipoprotéines et notamment avec les chylomicrons prévient partiellement l'activation de cellules de l'immunité



*Figure 12 Structure moléculaire des LPS*

*Les LPS sont composés d'un lipide A permettant l'ancrage à la membrane et d'une partie polysaccharidique débordant de la membrane externe. La fraction polysaccharidique est constituée d'un noyau ou core interne lié au lipide A et d'un core externe lié à des polysaccharides également appelés chaîne O.*

(macrophages/monocytes) et la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse à une endotoxémie (Cavaillon et al., 1990, Harris et al., 1993, Vreugdenhil et al., 2003).

### **VI.1.3. Signalisation**

Le complexe LPS/LBP transportés vers les tissus cibles de l'hôte se lie au complexe trimoléculaire CD14 (cluster of differentiation 14)/MD2 (myeloid differentiation protein-2) /TLR4 (toll-like receptor 4) présent à la surface des cellules immunitaires innées (macrophages), stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que  $TNF\alpha$ , IL1, IL6 et IL8, des eicosanoïdes tels que les prostaglandines E2, et d'autres médiateurs impliqués dans le recrutement d'autres cellules immunitaires. Cette communication entre le système immunitaire inné et adaptatif participe ainsi au développement de maladies métaboliques telles que l'obésité et l'IR chroniques (Abreu, 2010, Beutler, 2004, Cani et al., 2007a, Spruss et al., 2009, Neal et al., 2006, Vreugdenhil et al., 2003, Wright et al., 1990, Wolowczuk et al., 2008).

La LBP transfère les LPS vers le récepteur membranaire CD14 ancré par un glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) à la membrane cellules. Le récepteur CD14 est reconnu par la protéine MD2 qui est associée au récepteur TLR4. Le domaine de signalisation intra-cellulaire du récepteur TLR4 activé permet le recrutement de différents adaptateurs aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) et AP1 (Activator protein) (Heumann and Roger, 2002, Rakoff-Nahoum et al., 2004). Le récepteur CD14 peut prendre deux formes distinctes mais néanmoins complémentaires : une forme membranaire (mCD14) et une forme soluble (sCD14). Le mCD14 est généralement exprimé et synthétisé pour répondre à la présence éventuelle de LPS. Le sCD14 quant à lui, est exprimé lors d'un excès de LPS, par clivage de la forme membranaire ou sécrétion directe par les cellules endothéliales majoritairement et permet l'activation de cellules dépourvues de mCD14 (Tomlinson and Blikslager, 2004, Marcos et al., 2010). Le sCD14 peut en effet se lier avec le complexe LPS/LBP qui a son tour est capable de d'interagir avec des cellules n'exprimant pas le CD14 membranaire (Heumann and Roger, 2002). De plus, la prise en charge des LPS par la forme sCD14 permet son adressage aux HDL, l'inhibition de son activité et ainsi sa détoxification (Wurfel et al., 1994). Dans une étude chez l'homme, Laugerette et collaborateurs ont montré que l'apparition d'un état inflammatoire lors de la prise de poids était liée à une variation des teneurs en LBP et sCD14, proposant alors le rapport LBP/sCD14 comme un marqueur d'endotoxémie (Laugerette et al., 2014).

Les effets de TLR4 sont ensuite médiés par la voie de signalisation dépendante de Myd88 (Myeloid Differentiation factor 88)/IRAK (IL-1R Associated Kinase), l'activation (translocation nucléaire) de NF- $\kappa$ B. Une voie alternative indépendante conduit à l'activation de IRF3 (interferon regulatory factor 3) mais également de NF- $\kappa$ B (Figure 13) (Verstrepen et al., 2008). Le facteur NF- $\kappa$ B existe sous forme d'hétérotrimère inactif dans le cytosol des cellules inflammatoires en condition basale, sous l'action de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B. En réponse à un stimulus, une cascade de signalisation active un complexe protéique I $\kappa$ B kinase (IKK). Ce complexe I $\kappa$ B kinase activé phosphoryle I $\kappa$ B, ce qui induit sa dissociation du reste du trimère. L'hétérodimère NF- $\kappa$ B est alors rapidement transloqué au noyau où il se lie à son élément de réponse, régulant ainsi la transcription de ses gènes cibles pro-inflammatoires (Calder, 2002, Cohen, 2002).

#### **VI.1.4. Inflammation**

Des travaux en 2006 (Shi et al., 2006) ont montré que les bactéries intestinales peuvent initier un état d'obésité et d'IR suite à l'activité des endotoxines LPS. Chez des souris obèses et diabétiques, en plus d'une modification de l'écologie microbienne intestinale, il a été montré une augmentation importante des taux circulants en LPS. Cette augmentation des LPS circulants a été qualifiée d'endotoxémie métabolique, par opposition à l'endotoxémie classique associée à un choc septique aux concentrations en endotoxines bien plus élevées (environ 50 fois) (Cani et al., 2007a). Il apparaît alors que la qualité du microbiote intestinal jouerait un rôle sur les variations de l'endotoxémie métabolique et sur le déclenchement des altérations associées.

L'implication de TLR4 dans les maladies métaboliques telles que l'obésité et l'IR a été confirmée chez des souris déplétées en TLR4 (Shi et al., 2006) et invalidées pour le récepteur mCD14 (Cani et al., 2007a) qui ne présentaient pas de gain de poids ou d'IR malgré un régime riche en lipides ou des injections de LPS. De plus, ces souris présentaient aussi une hypersensibilité à l'insuline même lors de régime pauvre en graisse, ce qui suggère que les TLR4 pourraient moduler l'efficacité d'action de l'insuline dans des conditions physiologiques (Cani et al., 2007a). Un régime riche en lipides induit une augmentation significative post-prandiale du taux de LPS, accompagnée d'une augmentation de l'expression des TLR4 et du NF- $\kappa$ B sur les cellules mononuclées (Anderson et al., 2007). Par ailleurs, il a également été décrit une activation des TLR4 dans l'iléon de rats obèses (de La Serre et al., 2010). Une étude récente a également mis en évidence une augmentation de la

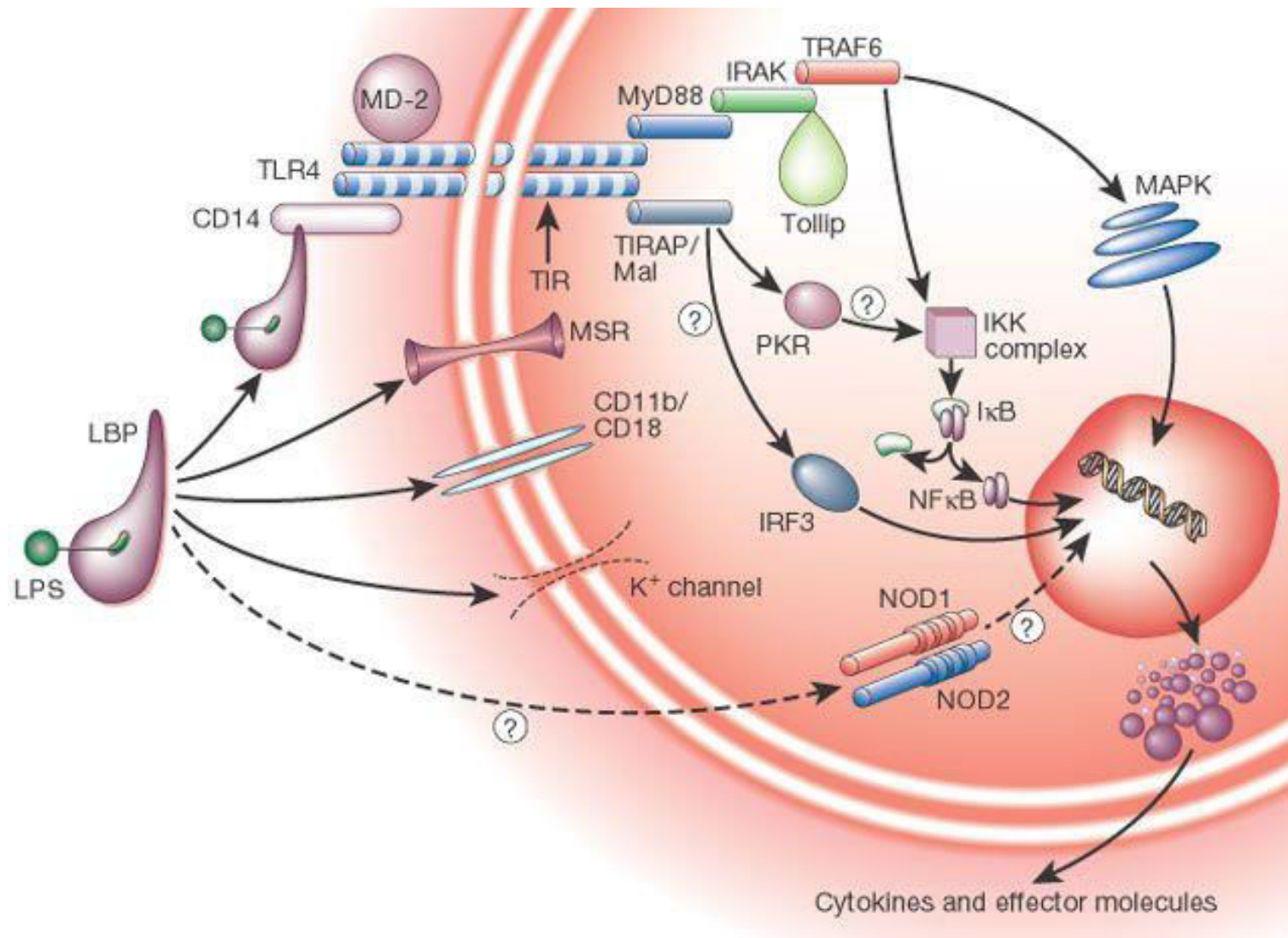


Figure 13 Voies de signalisation cellulaire du complexe LPS/LBP/CD14

(D'après (Cohen, 2002))

régulation des gènes des TLR dans le TA de souris nourries avec un régime induisant l'obésité (Kim et al., 2012). De plus, les concentrations plasmatiques de LPS chez des patients obèses sont plus élevées que leurs contrôles (Burcelin et al., 2011, Troseid et al., 2013). Un autre récepteur Toll-like a récemment été associé à l'inflammation médiée par le microbiote, il s'agit du TLR5 (Vijay-Kumar et al., 2010). En effet, des souris invalidées pour le gène codant pour TLR5 présentent un microbiote intestinal altéré, des signes d'un MetS tels qu'une obésité et une résistance à l'insuline. La colonisation de souris axéniques avec la flore de ces souris déficientes en TLR5 induit un gain de poids et une hyperphagie par rapport aux souris contrôles (Vijay-Kumar et al., 2010).

La composition du microbiote intestinal semble étroitement interconnectée avec la composition du régime alimentaire et le phénotype de l'hôte (Zhang et al., 2010). L'apport de fibres alimentaires par exemple augmente la proportion de *Bifidobactéries* (à Gram positif) dans le tractus intestinal, ce qui a pour effet de normaliser l'endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007b). En revanche, 4 semaines d'une alimentation riche en lipides suffisent à provoquer une altération de la flore intestinale chez des souris obèses et une augmentation de 2 à 3 fois des taux de LPS plasmatiques comparativement à des individus minces. Une implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques délivrant en continu du LPS durant 4 semaines entraîne une augmentation de la masse corporelle et adipeuse, une IR (Cani et al., 2007a) et de l'expression de gènes codants des adipokines inflammatoires chez les souris (Leuwer et al., 2009). De plus, la présence de lipides dans le bol alimentaire facilite le transport des LPS de la lumière intestinale vers la circulation sanguine mais également la translocation active des bactéries vivantes à Gram négatif productrices des LPS, de l'intestin vers le TA mésentérique et vers la circulation sanguine (Cani et al., 2007b, Amar et al., 2008, Laugerette et al., 2012). Chez le rat obèse, les taux en LPS circulants sont également augmentés ce qui a été principalement associé à une diminution de l'activité de l'enzyme IAP (Intestinal Alcalin Phosphatase) intervenant dans la dégradation du LPS (de La Serre et al., 2010). Plusieurs études ont montré qu'un régime riche en lipides se caractérise par le développement d'un DT2 et d'une obésité, eux-mêmes liés à un état inflammatoire de faible intensité et à une augmentation de la perméabilité intestinale aux LPS (Deopurkar et al., 2010, Cani et al., 2008, Hotamisligil, 2006, Creely et al., 2007). Le changement sélectif du microbiote intestinal par un traitement antibiotique réduit l'endotoxémie métabolique et l'inflammation à bas bruit associée et maintient l'intégrité intestinale chez les souris obèses *ob/ob* et chez les souris nourries par un régime riche en lipides (Cani et al., 2008).

## **VII. Perméabilité intestinale**

L'épithélium intestinal présente une perméabilité sélective conférant à la muqueuse intestinale une barrière de protection. Néanmoins, les LPS bactériens du lumen peuvent entrer dans la circulation *via* trois voies principales : 1) une perméabilité transcellulaire impliquant alors une endocytose médiée par des récepteurs des domaines lipidiques membranaires (notamment TLRs) ; 2) une perméabilité facilitée par la production de micelles lors de la digestion des lipides alimentaires dans l'intestin grêle ; 3) une perméabilité paracellulaire non spécifique à travers les cellules épithéliales (Kelly et al., 2012, Tomlinson and Blikslager, 2004). Cette perméabilité paracellulaire est assurée par des jonctions serrées, consolidée par d'autres complexes jonctionnels conférant une résistance mécanique à la monocouche épithéliale : les desmosomes et les jonctions adhérentes (Groschwitz and Hogan, 2009).

Les jonctions serrées sont situées à la frontière avec le pôle apical des entérocytes/colonocytes de l'épithélium intestinal. Il s'agit d'un complexe multiprotéique comportant des protéines transmembranaires de la famille des occludines, claudines et JAM (junctional adhesion molecules) auquel sont reliées des protéines intracellulaires (zonula occludens ou ZO) (Figure 14) (Nusrat et al., 2000, Niessen, 2007, Natividad and Verdu, 2013).

L'occludine (OCLN) est la première à avoir été identifiée dans ce complexe protéique et est une des protéines clé des jonctions serrées qui participe à l'adhésion cellulaire et au passage sélectif des molécules entre le pôle apical et basolatéral. Cette protéine possède quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires et deux domaines terminaux cytoplasmiques possédant des résidus sérine/thréonine sur lesquels peuvent avoir lieu des phosphorylations, ainsi que des motifs permettant la liaison aux protéines OCLN des cellules mitoyennes et le recrutement des protéines adaptatrices au niveau de son domaine cytoplasmique, telles que les ZO-1 à 3. L'occludine permet de renforcer la barrière épithéliale et confère une sélectivité de passage des molécules du pôle apical au pôle basolatéral (Howarth and Stevenson, 1995).

Les claudines possèdent une organisation membranaire similaire à celle de l'OCLN, mais avec un poids moléculaire moins important. Elles sont responsables du scellement des jonctions intercellulaires. Il existe au moins 24 isoformes de claudines (Elkouby-Naor and Ben-Yosef, 2010), parfois 27 membres sont reportés (Mineta et al., 2011). Un même tissu peut exprimer plusieurs isoformes de claudines agissant ainsi sur le renforcement de la barrière épithéliale, mais aussi sur la

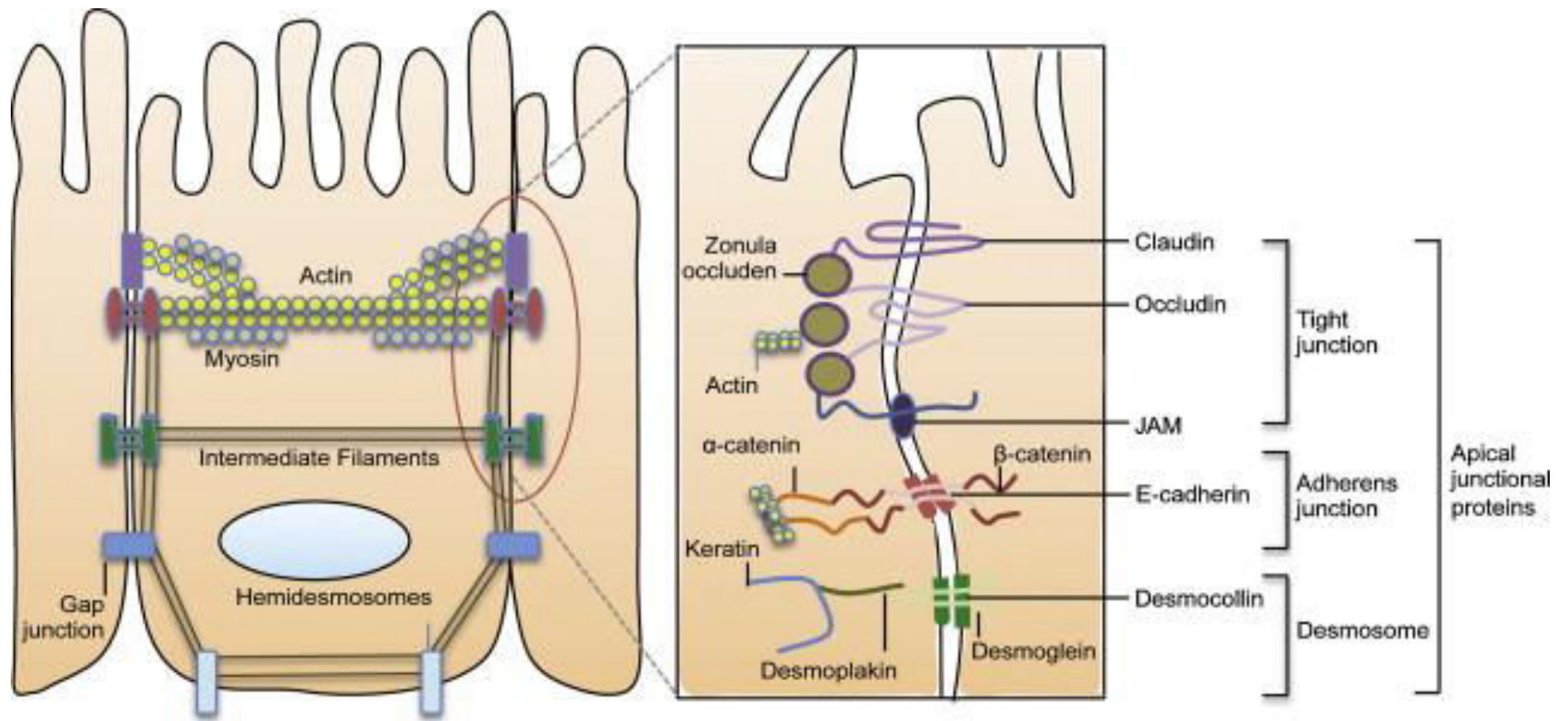


Figure 14 Maintien de l'imperméabilité de la barrière épithéliale intestinale par les jonctions serrées

(D'après (Natividad and Verdu, 2013))



formation de pores qui permettent une diffusion sélective des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire (Amasheh et al., 2011), et des modifications dans l'expression des divers isoformes conduisent à des modulations de la perméabilité épithéliale (Balkovetz, 2006).

Les JAM sont une superfamille d'immunoglobulines transmembranaire, constituée de 5 membres : JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4 et JAM-*like*. La JAM-A, qui est la protéine majoritaire, est constituée d'un peptide signal N-terminal, de deux domaines Ig-*like* extracellulaires, d'un domaine unique intra-membranaire et d'une courte queue cytoplasmique (40 acides aminés). Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière en contrôlant la perméabilité intestinale *via* des interactions avec les autres membres de cette superfamille ou aux autres complexes formés par les OCLN et les claudines mais également à la protéine adaptatrice ZO-1 (Laukoetter et al., 2007, Severson et al., 2008, Nava et al., 2011, Monteiro et al., 2013).

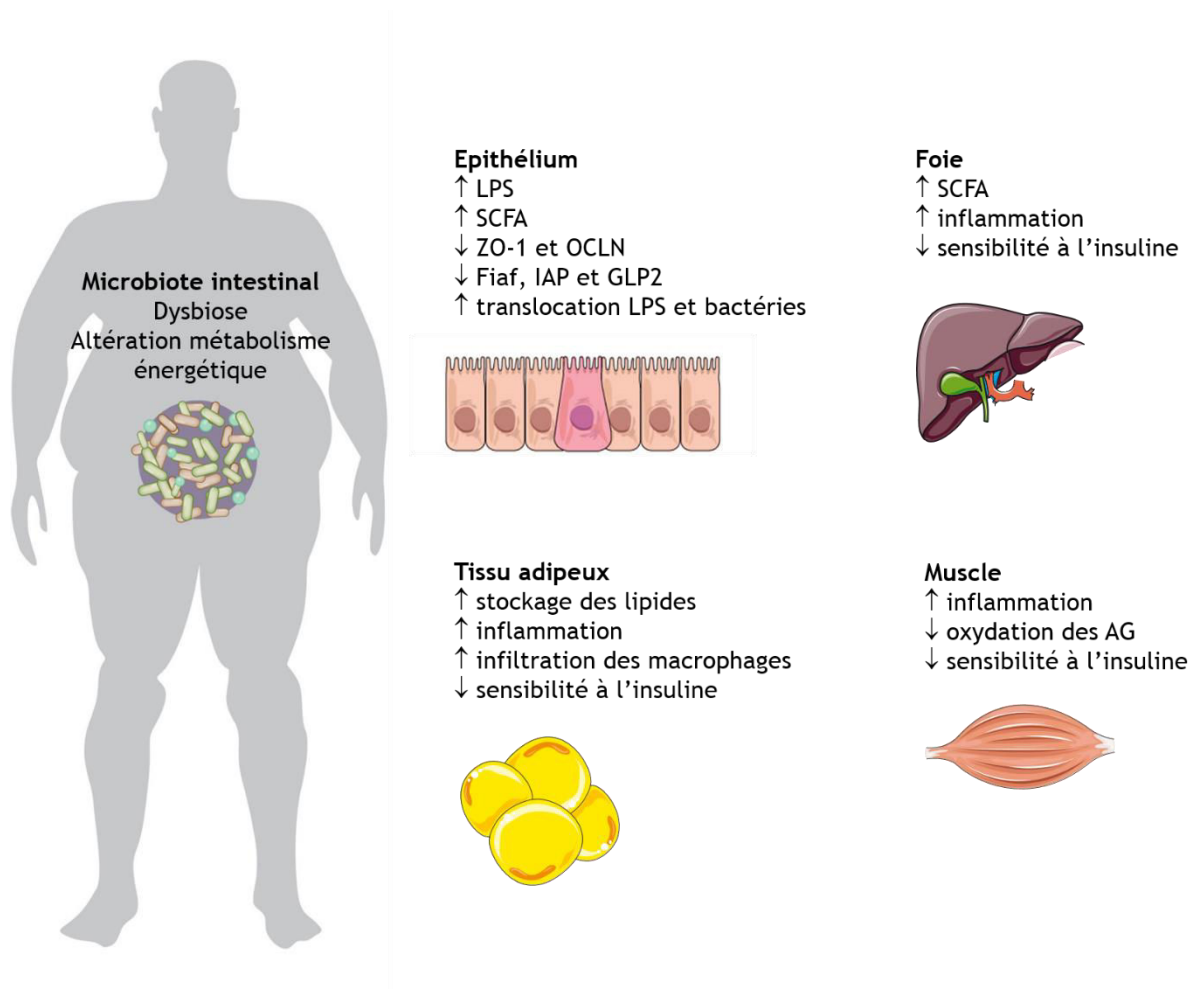
Le recrutement des ZO (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) cytoplasmiques et leur interaction avec les protéines transmembranaires repose sur la présence de multiples domaines PDZ (PDS 95 : Post Synaptic Density 95, Dig : disc large, ZO). Ces domaines sont des modules se liant aux protéines qui reconnaissent une séquence cible à l'extrémité carboxy-terminale des protéines transmembranaire. La structure des protéines ZO se caractérise par trois domaines PDZ, un domaine SH-3 (sequence homology 3) et un domaine GUK (guanylate kinase-*like*) (Furuse et al., 1994, Morita et al., 1999). Les ZO sont également capables de se lier aux protéines du cytosquelette d'actine et de myosine. Ainsi, les protéines ZO jouent donc un rôle d'adaptateur permettant la liaison des jonctions serrées à de multiples protéines régulatrices, mais également au cytosquelette d'actine (Guillemot et al., 2008, Howarth and Stevenson, 1995).

Lorsque la barrière intestinale est rompue, on parle d'hyperperméabilité intestinale. Cette hyperperméabilité intestinale permet le passage d'éléments pathogènes, d'allergènes et de toxiques (dont les endotoxines LPS), entraînant une inflammation qui va entretenir les lésions de la barrière intestinale et participe à l'apparition de maladies métaboliques telles que l'obésité, l'IR, le diabète mais aussi des atteintes hépatiques. Des régimes hypercaloriques, notamment par l'apport de lipides en excès, sont capables de perturber l'intégrité de la barrière intestinale et ainsi moduler la perméabilité des LPS du contenu intestinal (Amar et al., 2008, Erridge et al., 2007, Brun et al., 2007). Il a en effet été montré qu'un régime riche en lipides altère le profil du microbiote intestinal et augmente la perméabilité intestinale notamment *via* la diminution de l'expression et de la distribution de protéines participant à l'établissement des jonctions serrées telles que ZO-1 (zona occludens 1) et l'OCLN (Cani et al., 2009, Lam et al., 2012, Laugerette et al., 2012). Les bactéries

intestinales semblent fortement impliquées dans ce mécanisme puisque des souris rendues obèses – *via* une alimentation hyperlipidique ou une altération génétique (*ob/ob*) – traitées avec des antibiotiques récupéraient une intégrité de l'épithélium (Cani and Delzenne, 2007, Cani et al., 2008). L'administration de la souche vivante *Akkermansia muciniphila*, à des souris obèses et diabétiques, empêche totalement le développement d'une endotoxémie métabolique en réponse à l'ingestion d'un régime riche en lipides. De plus, cette souche bactérienne permet d'augmenter l'épaisseur de la couche de mucus (réduite lors de l'obésité et du DT2), contribue à restaurer totalement la fonction barrière de l'intestin et réduit ainsi l'endotoxémie et l'inflammation métabolique. Cette souche bactérienne rétablit également la production endogène de peptides antimicrobiens, ce qui contribuerait à une meilleure réponse du système immunitaire de l'hôte et donc au maintien des bactéries à distance des cellules épithéliales de l'intestin (Cani et al., 2013, Everard et al., 2013, Zhang et al., 2013). Cette souche *Akkermansia muciniphila* semble donc impliquée dans le maintien de l'homéostasie de l'hôte et la prévention de l'apparition de maladies métaboliques en lien avec l'inflammation et l'obésité.

De la Serre et collaborateurs ont alors suggéré ce schéma d'apparition des événements intestinaux conduisant à l'apparition d'une endotoxémie métabolique (Figure 15). (1) libération importante des LPS dans la lumière intestinale résultant d'une altération du microbiote intestinal, (2) diminution de l'activité de IAP (alcaline phosphatase intestinale) - une enzyme impliquée dans l'inactivation des LPS (Bates et al., 2007, Goldberg et al., 2008) - et une augmentation de l'activation de TLR4 au niveau de l'épithélium, (3) portant atteinte aux jonctions serrées de l'épithélium et provoquant une augmentation de la perméabilité et de l'inflammation intestinale. Il a été montré qu'une augmentation de la perméabilité intestinale entraîne le passage des LPS de la lumière intestinale à la *lamina propria*, augmentant les teneurs en LPS plasmatiques, mais également la translocation bactérienne à travers la muqueuse intestinale et le développement d'une endotoxémie métabolique (de La Serre et al., 2010).

Il a été mis en évidence une modification de la flore intestinale lors de régimes riches en lipides, augmentant la perméabilité intestinale aux LPS à l'origine de l'endotoxémie métabolique, qui est reconnue comme une composante inflammatoire importante de l'obésité et du MetS (Cani et al., 2008). Du fait que le régime alimentaire occidental actuel, principalement composé d'acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) en n-6, est corrélé à des maladies inflammatoires (Maslowski and Mackay, 2011, Calder, 2006), le rôle des AGPI mérite



**Figure 15** Événements intestinaux conduisant à l'apparition d'une inflammation métabolique

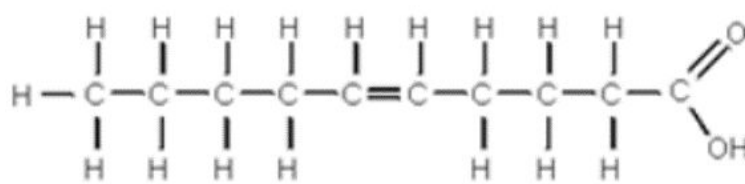
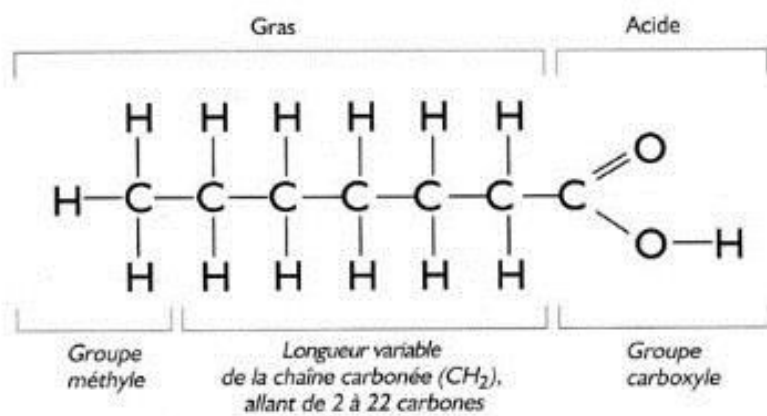
Un régime déséquilibré entraîne des modifications profondes de la population microbienne intestinale, augmentant les teneurs en LPS dans la lumière intestinale ainsi que la production d'AGCC (SCFA) et conduisant à une diminution de la production de facteurs tels que Fiaf, IAP et GLP-2. Ces événements conduisent à une perte d'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1 et OCLN, favorisant la translocation des LPS et bactéries vers la circulation sanguine, à l'origine de l'apparition d'une inflammation métabolique, dont le foie, le muscle et le tissu adipeux sont les principaux organes touchés, développant une insulino-résistance et initiant l'installation d'un syndrome métabolique et d'une obésité.

d'être étudié. Un des mécanismes expliquant ces désordres inflammatoires serait une consommation excessive d'AGPI en n-6 aux effets plutôt pro-inflammatoires (Calder, 2010) comparativement aux AGPI en n-3 aux effets plutôt anti-inflammatoires (Calder, 2009, Weylandt et al., 2012).

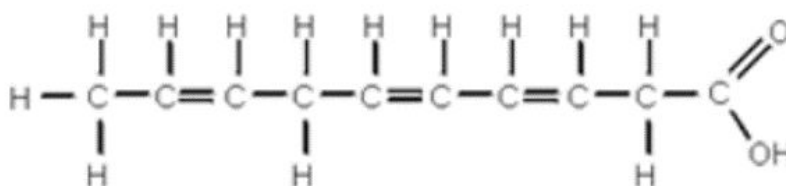
## VIII. Les acides gras

Les acides gras sont constitués d'un groupement carboxyle  $-\text{COOH}$ , responsable du caractère acide et polaire au pH de la cellule, et d'une chaîne linéaire hydrocarbonée de 2 à 22 atomes de carbone à caractère hydrophobe. La chaîne hydrocarbonée peut être saturée, monoinsaturée ou polyinsaturée lorsqu'elle possède au moins une double liaison (Figure 16).

Dans la suite de ce mémoire ne seront décrits que les acides gras polyinsaturés.



Acide gras monoinsaturé



Acide gras polyinsaturé

Figure 16 Structure d'un acide gras saturé, monoinsaturé et polyinsaturé

## **IX. Les acides gras polyinsaturés : biosynthèse et rôles**

Chez les mammifères, les deux familles d'AGPI essentiels en n-6 et en n-3 sont classées selon la position du premier carbone portant une double liaison à partir du groupe méthyl terminal de la chaîne carbonée (Calder, 2008, Tvrzicka et al., 2011). L'acide linoléique (LA ; 18 :2 n-6) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA ; 18 :3 n-3), précurseurs respectifs de la famille en n-6 et en n-3 (Figure 17), sont qualifiés d'indispensables chez les mammifères, car l'organisme ne peut pas les synthétiser *de novo* du fait de l'absence des enzymes  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  et  $\Delta 15$  désaturase nécessaires à leur synthèse (Hornstra et al., 1995). Par conséquent, ils doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation (Simopoulos, 1991). Les AGPI en n-3 et n-6 sont également dits essentiels puisqu'ils peuvent prévenir ou guérir les symptômes de carence (lésions cutanées, chute de poils, perte de poids, altérations rénales) (Burr and Burr, 1973, Holman et al., 1982).

### **IX.1. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés**

Malgré l'incapacité des mammifères à synthétiser LA et ALA, ils peuvent cependant bioconvertir ces AG en AG plus longs et plus insaturés, principalement au niveau hépatique, par une succession de réactions de désaturation, d'élongation et de rétroconversion peroxysonale, par des enzymes du réticulum endoplasmique, des désaturases et des élongases (Lauritzen et al., 2001) (Figure 18). Ainsi, LA est principalement converti en acide arachidonique (AA, 20 :4 n-6) et ALA est converti - par les mêmes enzymes - principalement en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22 :6 n-3) (Calder, 2012). Il existe donc une compétition entre substrats pour ces enzymes de biosynthèse (Lauritzen et al., 2001). De plus, les AGPI sont capables d'un rétro-contrôle négatif de leur propre voie de biosynthèse en exerçant des régulations sur les désaturases (Nakamura and Nara, 2004).

#### **IX.1.1. L'élongation**

L'élongation est l'ajout à la chaîne acyl des AG, de deux carbones, par condensation avec un malonyl-CoA. Cette étape est médiée par des élongases (ELOVL, Elongation of Very Long Chain Fatty Acid) présentes au niveau du réticulum endoplasmique. Elles contiennent plusieurs séquences d'acides aminés conservées chez le rongeur et l'humain (Jakobsson et al., 2006). Chez les mammifères, il semblerait qu'il existe sept enzymes ELOVL (ELOVL1 à 7) (Guillou et al., 2010). L'homologie de séquence entre les différentes ELOVL, et inter-espèces, est d'environ 30 %

Réticulum endoplasmique

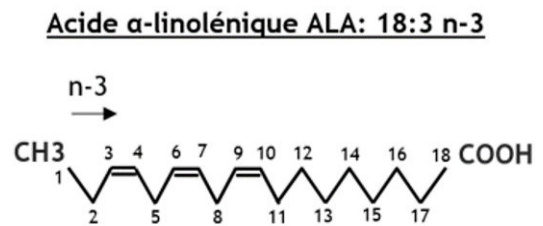
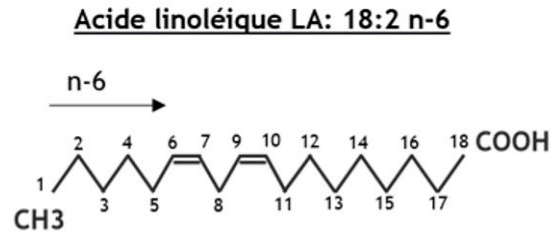
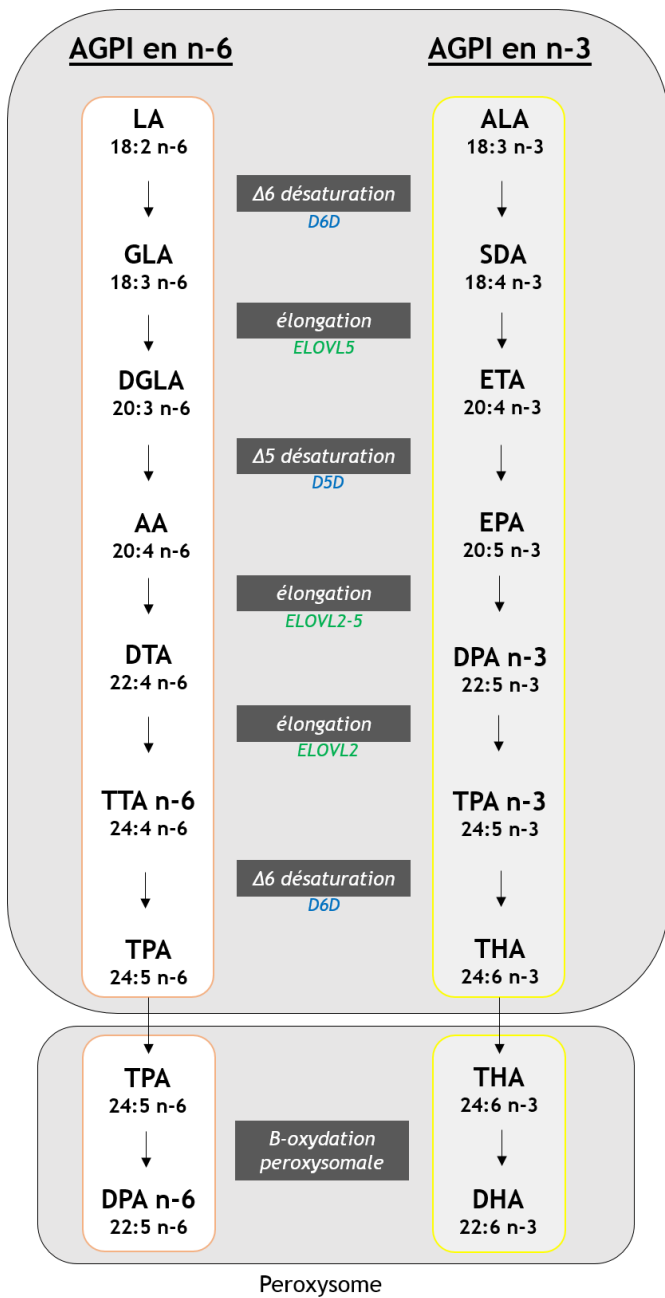


Figure 17 Structure des acides linoléique n-6 et  $\alpha$ -linoléique n-3

Figure 18 Biosynthèse des acides gras polyinsaturés chez les mammifères

LA : acide linoléique ; GLA : acide  $\gamma$ -linoléique ; DGLA : acide di homo  $\gamma$ -linoléique ; AA : acide arachidonique ; DTA : acide docosatétraoïques (ou adrénique) ; TTA : acide tétracasatétraoïque ; TPA : acide tétracosapentaénoïque ; ALA : acide  $\alpha$ -linoléique ; SDA : acide stéaridonique ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; THA : acide tétracosahéxaénoïque ; DHA : acide docosahéxaénoïque



(Leonard et al., 2004). Toutes les ELOVL n'ont pas la même spécificité de substrats, ainsi, ELOVL1, 3, 6 et 7 sont spécifiques de l'élongation des AGS et AGMI, alors que ELOVL2, 4 et 5 ont pour substrats préférentiels les AGPI (Guillou et al., 2010). Les gènes Elov11, 5 et 6 sont exprimés de façon ubiquitaire tandis que Elov12, 3, 4 et 7 sont spécifiques de certains tissus ou organes (Figure 19) (Guillou et al., 2010). Des facteurs géniques ou nutritionnels sont capables de moduler l'expression et l'activité de ces enzymes ELOVL, en particulier durant les maladies métaboliques telles que le diabète ou l'obésité. Par exemple, la surexpression de SREBP-1c impliquée dans le développement de la masse adipeuse, induit l'expression du gène Elov12 (Wang et al., 2006b). L'enzyme ELOVL6 est également régulée par des acteurs géniques ou nutritionnels tels que SREBP-1, ChREBP, PPAR $\alpha$  ou encore l'insuline (Wang et al., 2006b). Il a également été montré une augmentation de l'expression d'ELOVL5 régulée par PPAR $\alpha$  et lors de l'obésité, et une diminution de son expression par les régimes riches en lipides et les AGPI en n-3 (Wang et al., 2005b, Wang et al., 2006b).

### **IX.1.2. La désaturation**

Chez les mammifères, trois principaux types de désaturation sont effectués dans la voie de biosynthèse des AGPI : il s'agit des  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  et  $\Delta 4$  désaturations. La  $\Delta 6$  désaturation est médiée par la  $\Delta 6$  désaturase (D6D), qui introduit une double liaison entre les carbones 6 et 7 de LA et ALA. La  $\Delta 5$  désaturation est médiée par la  $\Delta 5$  désaturase (D5D), qui introduit une double liaison entre les carbones 5 et 6 de l'acide DGLA 20 :3 n-6 et du 20 :4 n-3. Quant à la  $\Delta 4$  désaturation, elle s'effectue par un mécanisme de désaturation/rétroconversion peroxysomale (Voss et al., 1991). Les AGPI tels que l'AA et l'EPA peuvent subir deux étapes d'élongations successives, pour être ensuite  $\Delta 6$ -désaturés. Ce mécanisme permet l'obtention d'AG à 24 atomes de carbone et 5 ou 6 doubles liaisons. Ces AGPI à très longues chaînes vont donner l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22 :5 n-6) et le DHA par  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Voss et al., 1991).

La D6D convertit LA en acide  $\gamma$ -linoléinique (GLA, 18 :3 n-6) et ALA en acide stéaridonique (18 :4 n-3). Chez les mammifères, D6D est la première enzyme de la biosynthèse des AGPI, et représente l'étape limitante de l'ensemble des réactions conduisant à la formation de DGLA, AA et EPA, précurseurs respectifs des eicosanoïdes des séries 1, 2 et 3 (Brenner, 1971). La D6D est également impliquée dans les mécanismes permettant la synthèse des AGPI à 22 atomes de carbone et à 6 doubles liaisons issus de la désaturation/rétroconversion peroxysomale (Voss et al., 1991).

<u>Enzyme</u>	<u>Expression</u>	<u>Substrats préférentiels</u>
<b>ELOVL1</b>	Ubiquitaire	AGS et AGMI
<b>ELOVL2</b>	Foie, Testicules Rein, Cerveau, Poumons, Tissu adipeux blanc	AGPI C20 – C22
<b>ELOVL3</b>	Tissu adipeux brun, Peau, Tissu adipeux blanc, Foie	AGS et AGMI
<b>ELOVL4</b>	Rétine, Cerveau, Testicules	AGS et AGPI C24 – C30
<b>ELOVL5</b>	Ubiquitaire	AGPI C18 – C20
<b>ELOVL6</b>	Ubiquitaire	AGS et AGMI C12 – C16
<b>ELOVL7</b>	Rein, Pancréas, Surrénales, Prostate	AGS et AGMI

*Figure 19 Elongases ELOVL chez les mammifères*

*D'après (Jakobsson et al., 2006, Guillou et al., 2010)*

La D5D convertit le DGLA en AA et l'acide eicosatétraénoïque (20 :4 n-3) en EPA. Il s'agit de la deuxième désaturase de la cascade de biosynthèse des AGPI intervenant après les premières étapes de désaturation et d'élongation par la D6D et ELOVL5. La D5D ne semble exister que sous une seule isoforme. Elle est cependant capable de convertir les AGPI en n-6 et en n-3, avec une préférence de substrat pour les AGPI en n-3 (Ninno et al., 1974, Jeffcoat et al., 1978). La D5D est quantitativement moins abondante que la D6D (Cho et al., 1999a, Cho et al., 1999b).

Les expressions et activités des D6D et D5D peuvent être modulées par certaines conditions physiologiques. Ainsi, l'hypercholestérolémie (Garg et al., 1988), l'hyperglycémie (Das, 2005), l'hypoinsulinémie (Brenner, 2003, Das, 2005), les AGPI (Brenner, 2003), l'hypertension artérielle (Narce and Poisson, 1995, Bellenger et al., 2004) diminuent les activités désaturantes hépatiques, et l'hyperinsulinémie, le DT2 (Brenner, 2003, Montanaro et al., 2003, Wang et al., 2005a) et les AGS (Jan et al., 2004) permettent de les activer. Les AGPI régulent également les désaturases permettant leur biosynthèse et exercent ainsi un rétrocontrôle négatif sur leur propre voie de biosynthèse (Nakamura and Nara, 2004). Cette régulation est principalement médiée par la diminution de la forme active de SREBP1c (Nara et al., 2002) *via* son clivage de SREBP-1c (Hannah et al., 2001) et l'inhibition de l'expression génique de SREBP-1 (Yoshikawa et al., 2002). L'expression des gènes codants D6D et D5D est aussi augmentée par PPAR $\alpha$ , qui tient une place importante dans l'activation des gènes d'oxydation des AG au niveau hépatique (Gulick et al., 1994, Kroetz et al., 1998). Il existe donc une dualité de régulation des désaturases par SREBP-1c et PPAR $\alpha$ , car les voies métaboliques impliquant ces facteurs de transcription sont opposées : SREBP-1c induit les gènes de la synthèse des AG, alors que PPAR $\alpha$  induit ceux de l'oxydation (Nakamura and Nara, 2004).

## **IX.2. Rôles des acides gras polyinsaturés**

Les AGPI peuvent jouer un rôle énergétique en tant que nutriments et un rôle structural en tant que constituant membranaire majeur, mais ils peuvent également intervenir en tant que régulateurs de l'expression génique et exercer un rôle fonctionnel comme précurseurs de seconds messagers (Browning, 2007).

### **IX.2.1. Rôle énergétique**

Les AG sont une source d'énergie pour l'organisme des mammifères. Les lipides représentant environ 35 % de l'apport calorique journalier chez l'Homme. Les AGPI sont principalement estérifiés en position sn-2 des TAG, et constituent alors un réservoir énergétique à l'organisme (Novikov et al., 1999). Cependant, la  $\beta$ -oxydation des AGPI est plus coûteuse en énergie comparativement à la  $\beta$ -oxydation des AGS, en raison de la présence de doubles liaisons, obligeant l'activité de deux enzymes supplémentaires pour supprimer chaque double liaison et permettre l'oxydation complète de ces AGPI (Novikov et al., 1999). La  $\beta$ -oxydation des AGPI semblerait destinée au recyclage des atomes de carbone pour la synthèse *de novo* d'AGS et AGMI (à partir de l'acétate), plutôt que la production d'énergie (Cunnane et al., 2003, Brenna, 2002).

### **IX.2.2. Rôle structural**

Les lipides membranaires constituent 20 à 40 % des membranes biologiques. Il existe trois classes de lipides membranaires : les stérols (majoritairement le cholestérol), les sphingolipides, et les phospholipides (PL). Le LA, l'AA et le DHA sont les principaux constituants des PL membranaires, créant un microenvironnement flexible, ce qui facilite les changements de conformation nécessaires à l'activité de protéines intrinsèques (Shaikh et al., 2003, Wassall et al., 2004, Ikeda et al., 2006) et agit sur l'intégrité, la perméabilité et la fluidité membranaire (Quinn et al., 1989, Stubbs and Smith, 1990). Les PL sont constitués d'un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés deux AG à longues chaînes en position sn-1 et sn-2 et d'un phosphate en position sn-3 rattaché au groupement hydrophile constituant la tête du PL. Les AGPI contenant 1 à 5 doubles liaisons sont généralement estérifiés en sn-2 (Capper and Marshall, 2001). Au sein des PL, dont la phosphatidylcholine est la plus abondante (environ 50 % des PL), les AGPI induisent aussi la ségrégation de domaines membranaires complexes - les rafts - auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (Shaikh et al., 2003, Wassall et al., 2004, Ikeda et al., 2006).

### **IX.2.3. Régulation génique**

Les AG régulent l'expression d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription, tels que les PPARs, SREBP-1c, les facteurs nucléaires hépatiques (HNF4, hepatic nuclear factor 4), le récepteur aux rétinoïdes (RXR, retinoid X receptor) et le récepteur hépatique X (LXR, liver X receptor) (Spector, 1999, Clarke, 2001, Guesnet et al., 2005)

Une modification de la composition en AGPI membranaire peut moduler l'activité des enzymes liées à la membrane (Stubbs and Smith, 1990, Spector and Yorek, 1985). Le rôle des AGPI en tant que régulateur génique a principalement été étudié au niveau des métabolismes lipidiques et glucidiques. Chez la souris maintenue sous un régime alipidique et supplémentée en LA, l'activité d'enzymes de la lipogénèse telles que l'enzyme malique et la FAS est diminuée (Allmann and Gibson, 1965, Muto et al., 1975). Les AGPI exercent un effet inhibiteur sur d'autres gènes lipogéniques tels que l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Salati and Clarke, 1986), et la stéaroyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) (Jones et al., 1996) et activent l'expression des gènes d'oxydation des AG, tels que l'acyl-CoA oxydase ou la carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) (Clarke and Jump, 1997) *via* PPAR $\alpha$  (Clarke, 2001). Les AGPI peuvent également agir sur la différenciation des adipocytes, inhiber NF- $\kappa$ B et certaines cytokines par le biais de PPAR $\gamma$  (Desvergne and Wahli, 1999). Les AGPI interviennent aussi dans la glycolyse en régulant GLUT4 (Tebbey et al., 1994) ou la glucokinase (Jump et al., 1994).

#### **IX.2.4. Rôle fonctionnel**

Les AGPI tels que l'acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (DGLA), l'AA et l'EPA sont les précurseurs de médiateurs lipidiques biologiquement actifs, tels que les eicosanoïdes, *via* leur mobilisation par des enzymes phospholipases, principalement par la PLA2 (phospholipase A2) et leur métabolisme par les enzymes oxygénases qui leur confèrent un rôle métabolique et fonctionnel (Calder, 2002, Lauritzen et al., 2001, Sprecher, 2000, Tapiero et al., 2002). Parmi les eicosanoïdes se trouvent les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et d'autres dérivés oxygénés des AGPI, produits principalement par trois classes d'enzymes : les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases et les cytochromes P450 époxygénases (Figure 20) (Tapiero et al., 2002). Les enzymes COX existent sous deux isoformes : COX-1 constitutive et ubiquitaire produisant des prostaglandines à des fins homéostatiques, et COX-2 hautement inductible par des cytokines pro-inflammatoires et responsable de la production de prostaglandines impliquées dans la douleur, l'inflammation (Rouzer and Marnett, 2009). La voie de la 5-LOX (lipoxygénase) produit des leucotriènes des séries 3,4 et 5, respectivement à partir de DGLA, AA et EPA (Tapiero et al., 2002).

Les eicosanoïdes issus du métabolisme de l'AA sont les prostanoides, principalement les prostaglandines PGE2, PGI2 et le thromboxane A2 (TXA2). Les prostaglandines exercent des effets par voies autocrines ou paracrines. La majorité des prostaglandines agissent sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPR), intermédiaires pour des voies de

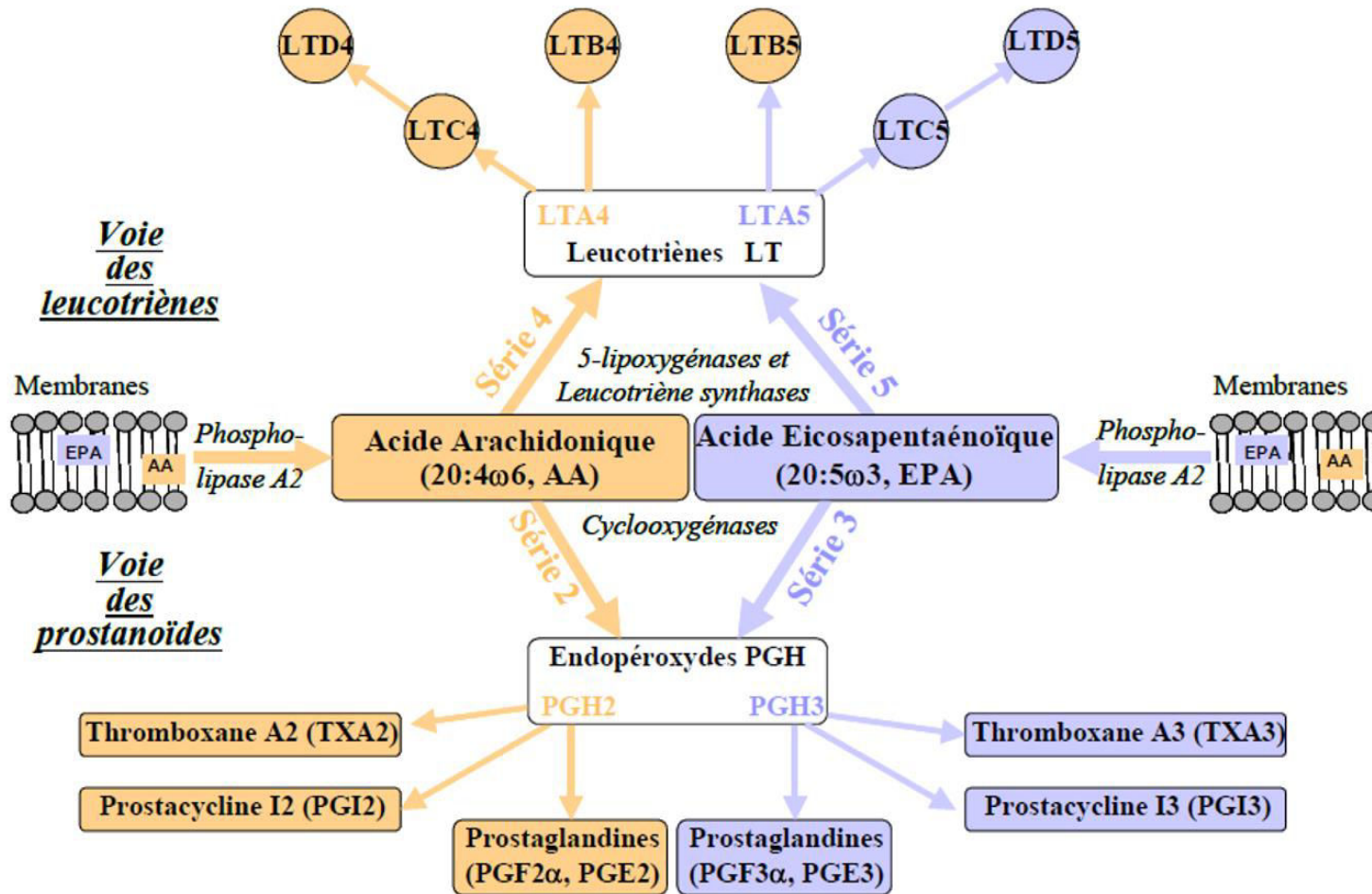


Figure 20 Liste non exhaustive des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique et de l'acide eicosapentaénoïque par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes)

D'après (Guesnet et al., 2005).

signalisation cytosolique impliquées dans de nombreux processus physiologiques (angiogénèse, agrégation plaquettaire, perméabilité vasculaire) (Ben-Av et al., 1995). D'autres prostaglandines agissent dans la cellule sur des récepteurs nucléaires tels que PPARs pour induire des réponses transcriptionnelles spécifiques (Jiang et al., 1998a, Tontonoz et al., 1998). Enfin, les autres eicosanoïdes issues du métabolisme de l'AA 20 :4 n-6 sont produits sous l'action d'enzyme lipooxygénase (LOX), il s'agit des leucotriènes de la série 4 (majoritairement LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>) aux propriétés pro-inflammatoires. Les 12/15-LOX sont responsables de la production d'acides hydroxyperoxy-eicosa-tetra-énoïques (12-HETE et 15-HETE) *via* l'AA, au rôle délétère dans les pathologies cardiovasculaires (Feinmark and Cornicelli, 1997). En outre, le précurseur de l'AA, le DGLA, est également le précurseur des prostaglandines de la série 1 et des leucotriènes de la série 3 (Lee et al., 2006). Le métabolisme de l'AA résulte donc en la sécrétion de prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes jouant un rôle important dans la signalisation de l'inflammation (Fetterman and Zdanowicz, 2009, Kremmyda et al., 2011).

Les eicosanoïdes issus du métabolisme de l'EPA sont analogues à ceux qui sont issus de l'AA mais en conservant la double liaison supplémentaire en n-3 (Endres et al., 1989, Lowry and Thompson, 1994, Yerram et al., 1989). Il s'agit de prostanoides de la série 3 (majoritairement PGE<sub>3</sub>, PGI<sub>3</sub> et TXA<sub>3</sub>) et les leucotriènes de la série 5 (majoritairement LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub>, LTE<sub>5</sub>) (Lee et al., 2006). Ces derniers contribuent à la protection des artères et du cœur et ont des effets anti-inflammatoires (Endres et al., 1989, Lowry and Thompson, 1994). De plus, l'EPA entre en compétition avec l'AA pour les deux enzymes COX et LOX. Cette compétition de substrats conduit à la sécrétion d'eicosanoïdes aux propriétés 10 à 100 fois moins pro-inflammatoires réduisant les réactions pro-inflammatoires (Chapkin et al., 2008, Kremmyda et al., 2011, Schmitz and Ecker, 2008).

Il a récemment été mis en évidence que les AGPI en n-3 (notamment l'EPA et le DHA) sont les précurseurs de nouveaux médiateurs lipidiques aux propriétés anti-inflammatoires « pro-resolving ». Trois familles correspondent à ces médiateurs lipidiques : les résolvines, les protectines et les marésines (Figure 21) (Rius et al., 2012).

Les résolvines (ou « resolution-phase interaction products ») sont principalement produits à partir de l'EPA et du DHA. Il existe donc des résolvines de la série E (RevE) et de la série D (RevD) (Serhan et al., 2002). Les résolvines de la série E (RevE1 et RevE2), synthétisés à partir de

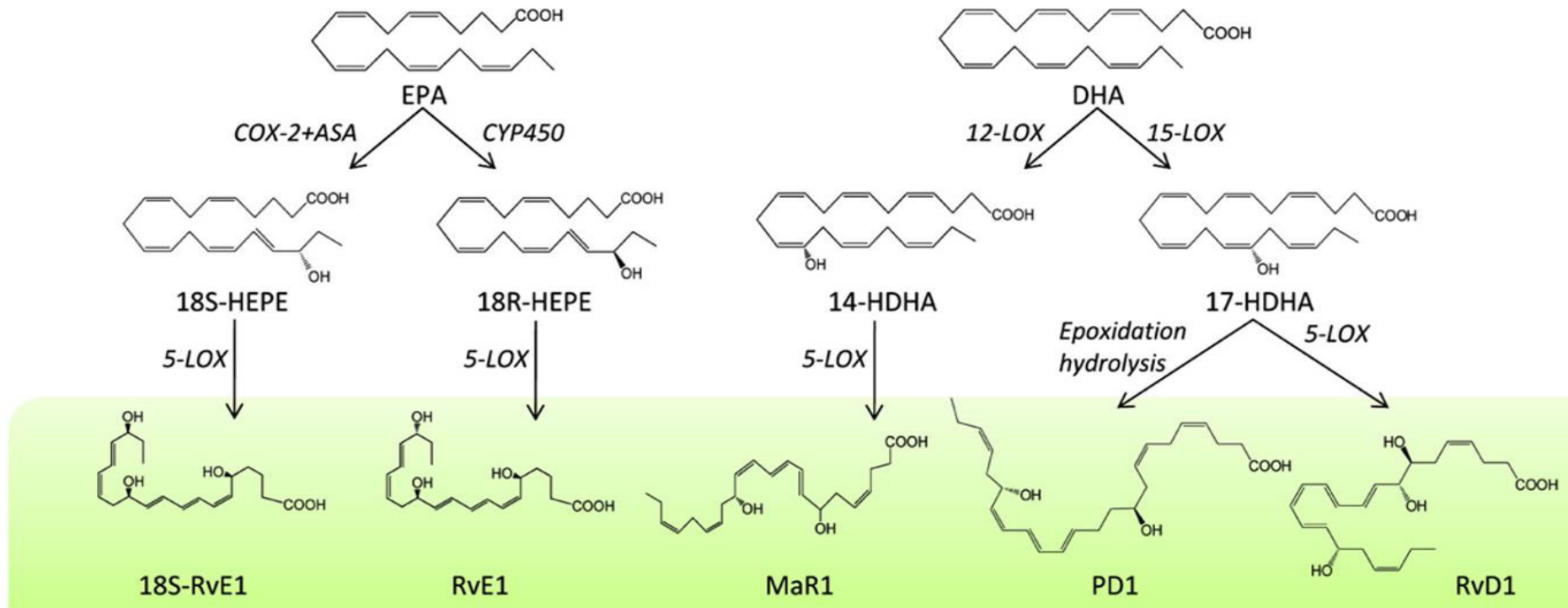


Figure 21 Biosynthèse de pro-resolving dérivés de l'EPA et DHA.

L'EPA est converti en 18-hydroxy-EPE (18-HEPE) soit par la cytochrome P450 soit par la COX-2 en présence d'aspirine. Cet intermédiaire est transformé par la 5-LOX en Résolvine RvE1. Le DHA est converti en 17-hydroxy-DHA (17-HDHA) par une 15-LOX, puis transformé en Protectine PD1 via une époxyde intermédiaire et en Résolvine RvD1 par une 5-LOX. Le DHA est également converti par une 12/15-LOX en 14-hydropéroxy-DHA (14-HDHA) puis en Marésine MaR1 via un époxyde intermédiaire. D'après (Rius et al., 2012)



l'EPA, sont issues d'une série de réactions faisant intervenir COX-2 agissant en présence d'aspirine, et 5-LOX. Ces médiateurs semblent exercer de puissants effets anti-inflammatoires en réduisant l'infiltration par les leucocytes (Serhan et al., 2008). Le RevE1 est spontanément produit chez les sujets sains et sa concentration est augmentée chez les individus prenant de l'aspirine et/ou de l'EPA (Arita et al., 2005). Le RevE2 est synthétisé dans des proportions plus importantes que le RevE1 et possède également des propriétés anti-inflammatoires. Les résolvines de la série D, dérivés du DHA, sont produits par une série de réactions similaires, ou par une voie faisant intervenir les enzymes LOX et d'autres réactions, et ont elles aussi des propriétés anti-inflammatoires, notamment au niveau cérébral (Serhan et al., 2008, Levy, 2010). Il existe plusieurs RevD, tels que les AT-RevD1-4 (aspirin-triggered Rev), les RevD1-4, le RevD1, tous de puissants régulateurs limitant l'inflammation (Serhan et al., 2002, Marcheselli et al., 2003, Hong et al., 2003).

Les protectines possèdent dans leur structure un triène conjugué (Serhan et al., 2002, Hong et al., 2003). Leur biosynthèse est médiée par une enzyme lipoxigénase-*like* qui converti les DHA en un intermédiaire rapidement converti en protectine D1 ou PD1. Cette molécule possède en effet des propriétés de protection de l'inflammation (Serhan et al., 2006, Marcheselli et al., 2003, Lukiw et al., 2005, Mukherjee et al., 2004). On peut trouver le terme neuroprotectine lorsque sa biosynthèse s'effectue dans les tissus neuronaux (Serhan et al., 2006, Mukherjee et al., 2004). Ces médiateurs inhibent également l'infiltration par les leucocytes (Serhan et al., 2006, Hong et al., 2003).

Les marésines sont issus d'une nouvelle voie de biosynthèse du DHA, mises en évidence dans les macrophage (Serhan et al., 2008). Le terme marésine désigne « macrophage mediator in resolving inflammation ». Le produit principal est le MaR1 qui est capable d'inhiber l'infiltration par les leucocytes et de stimuler l'élimination des macrophages par phagocytose. Il possède également des propriétés anti-inflammatoires et protectrices « pro-resolving » au même titre que le RevE1 et le PD1 (Serhan et al., 2008).

## **X. Divers aspects fonctionnels des AGPI en n-3**

L'intérêt des AGPI en n-3 en tant que molécules bénéfiques sur certaines physiopathologies est survenu suite aux observations faites par Dyerberg et collaborateurs. En effet, ces auteurs ont étudié une population d'Esquimo du Groenland et ont constaté que le risque de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires était fortement diminué. Ils ont pu associer cette observation principalement à une consommation d'une alimentation riche en AGPI en n-3 (Dyerberg and Jorgensen, 1982, Dyerberg, 1986). Par la suite, il a été montré des rôles bénéfiques des AGPI en n-3 dans la prévention et le traitement des maladies métaboliques telles que l'obésité, l'IR ou encore l'intolérance au glucose. Les AGPI en n-3 réduisent les teneurs plasmatiques en TAG en diminuant la sécrétion hépatique des lipoprotéines riches en TAG et augmentent les HDL-cholestérol, chez des patients diabétiques. Ils exercent également des propriétés anti-inflammatoires variées chez l'Homme (Ruxton et al., 2004, Calder, 2006, Singer et al., 2008).

### **X.1. AGPI en n-3, obésité et insulino-résistance**

#### **X.1.1. AGPI en n-3 et obésité**

Diverses études sur des modèles animaux mettent en évidence des effets bénéfiques des AGPI en n-3 sur l'obésité et les pathologies associées telles que le syndrome métabolique et le DT2. Cependant, les effets d'une supplémentation en AGPI en n-3 sur la prévention d'une prise de poids restent encore controversés. Ainsi, des études soutiennent que ces AG peuvent diminuer significativement le poids corporel et la masse adipeuse (Pighin et al., 2005, Kasbi Chadli et al., 2012, Bertrand et al., 2013, Sato et al., 2010) alors que d'autres études ne trouvent aucun effet significatif sur la perte de poids corporel mais une diminution significative de dépôts adipeux a été observée chez des animaux supplémentés en AGPI en n-3 (Kuda et al., 2009, Perez-Matute et al., 2007, Raclot et al., 1997). Au contraire, certains auteurs ne rapportent aucun changement ni de poids corporel ni de masse adipeuse à l'issue d'une supplémentation alimentaire en AGPI en n-3 (Todoric et al., 2006, Gillam et al., 2009, Figueras et al., 2011, Gonzalez-Periz et al., 2009). En ce qui concerne le métabolisme lipidique, de nombreuses études s'accordent à dire qu'une supplémentation en AGPI en n-3 d'origine marine possède des propriétés hypotriglycéridémiantes (Rossmeisl et al., 2012, Todoric et al., 2006, Pighin et al., 2005, Kasbi Chadli et al., 2012, Sato et al., 2010).

Complémentairement, la plupart des études chez des rongeurs décrivent également des effets bénéfiques d'une supplémentation en AGPI en n-3 d'origine marine sur le métabolisme du

glucose et la sensibilité à l'insuline. Ainsi, bien que des travaux ne montrent pas de résultats concluants (Gillam et al., 2009, Raclot et al., 1997, Todoric et al., 2006), de nombreuses études rapportent des améliorations de la glycémie et de l'insulinémie à jeun (Bertrand et al., 2013, Rossmeisl et al., 2012, Sato et al., 2010). De plus, des auteurs ont rapporté une amélioration de la tolérance au glucose ou à l'insuline (Bertrand et al., 2013, Kasbi Chadli et al., 2012, Kuda et al., 2009, Rossmeisl et al., 2012, Janovska et al., 2013) dans des modèles murins traités avec de l'EPA ou du DHA ou bien un mélange des deux ou encore en combinaison avec de la Rosiglitazone. En revanche, d'autres travaux n'ont montré aucune différence significative en termes de tolérance au glucose chez des animaux dont le régime alimentaire était supplémenté en AGPI en n-3 (Figueras et al., 2011, Gillam et al., 2009).

Les résultats apparemment controversés concernant les effets des AGPI en n-3 sur le poids corporel, les métabolismes glucidique et lipidique pourraient être dû à des différences de modèles animaux d'obésité utilisés (génétique par rapport à l'obésité induite par un régime alimentaire), ainsi que le type et la formulation d'AGPI en n-3 (EPA ou DHA ou une combinaison des deux sous forme de TAG ou bien d'esters éthyliques), les doses utilisées et le temps de traitement.

Bien que certaines études suggèrent que l'augmentation des teneurs en AGPI en n-3 aux dépens des AGPI en n-6 dans le modèle de souris transgéniques fat-1 n'a aucun effet sur la réduction du poids des animaux en régime iso-calorique (Belchior et al., 2015, Bhattacharya et al., 2006) plusieurs études ont montré que ces souris étaient protégées de l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Belchior et al., 2015, Lopez-Vicario et al., 2015). Les effets d'une synthèse endogène d'AGPI en n-3 sur le métabolisme lipidique de souris fat-1 n'a été analysé que dans très peu d'études. Cependant, bien que Belchior et collaborateurs n'observent aucun effet sur quelques paramètres lipidiques sanguins mesurés (Belchior et al., 2015), Romanatto et collaborateurs ont montré que des souris fat-1 âgées de 8 mois présentaient des teneurs en TAG et cholestérol plus faibles que celles de leurs témoins de type sauvage (Romanatto et al., 2014). Concernant des marqueurs de l'homéostasie glucidique des souris fat-1, des résultats légèrement différents ont été obtenus. En effet, alors que des études montrent une faible glycémie à jeun et une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des souris fat-1 mâles nourries avec un régime hyperlipidique (Belchior et al., 2015, White et al., 2010), d'autres études n'observent pas de différences significatives (Ji et al., 2009). Malgré tout, l'augmentation de production endogène d'AGPI en n-3 chez ces souris a tout de même globalement présenté un impact bénéfique sur la tolérance au glucose (Belchior et al., 2015, Ji et al., 2009, White et al., 2010, White et al., 2015), d'autant plus que notre équipe a montré que les souris fat-1 étaient protégées des dommages au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques

et des altérations du métabolisme du glucose causés par les effets toxiques d'un agent diabéto-gène qu'est la streptozotocine (Bellenger et al., 2011).

Conformément aux résultats obtenus avec des modèles animaux, la plupart des études cliniques chez l'Homme soutiennent les effets hypotriglycéridémiants d'une supplémentation en AGPI en n-3. Sur la base de ces observations, plusieurs agences et associations ont recommandé des apports de 2 à 4 g par jour comme dose efficace thérapeutique contre l'hypertriglycéridémie (Kris-Etherton et al., 2003, Weintraub, 2013). Toutefois, les effets des AGPI en n-3 d'origine marine sur le poids corporel, la composition corporelle et le métabolisme du cholestérol chez des patients présentant un syndrome métabolique restent peu clairs. Par ailleurs, au contraire des observations faites sur des modèles murins suggérant qu'une supplémentation alimentaire en AGPI en n-3 pourrait promouvoir l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, la plupart des essais cliniques chez des patients atteints de syndrome métabolique suggère que les AGPI en n-3 ne sont pas efficaces pour diminuer les paramètres du métabolisme du glucose ou améliorer la sensibilité à l'insuline (Flachs et al., 2014). De plus vastes études cliniques sont sans doute nécessaires afin de mieux comprendre l'efficacité des AGPI en n-3 sur les caractéristiques du syndrome métabolique.

L'adipogenèse est un processus de différenciation de pré-adipocytes en adipocytes matures. La différenciation adipocytaire est un processus complexe principalement régulé par deux familles de facteurs de transcription que sont CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) et le peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Ainsi, C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont impliqués dans les étapes précoces de l'adipogenèse. Une fois activé, C/EBP $\beta$  trans-active l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , les deux principaux facteurs impliqués dans le maintien de la différenciation terminale de l'adipocyte, qui de manière coordonnée active des gènes dont l'expression produit le phénotype adipocyte (Tang and Lane, 2012). Dans ce contexte, les effets des AGPI en n-3 sur la différenciation adipocytaire restent encore controversés. Ainsi, des études rapportent une augmentation de l'adipogenèse lorsque des AGPI en n-3 sont ajoutés à des milieux de culture (Hanada et al., 2011, Murali et al., 2014). De plus, il a été montré que le DHA (50  $\mu$ M) plus que l'EPA induisait la différenciation d'adipocytes en surexprimant le taux d'ARNm codant pour C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et la protéine adipocytaire 2 (aP2) dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (Murali et al., 2014). Par ailleurs, il a été décrit une augmentation des taux protéiques de PPAR $\gamma$ , suite à une accumulation de gouttelettes lipidiques lorsque de l'EPA (250  $\mu$ M) était ajouté (Hanada et al., 2011).

Au contraire, d'autres études montrent clairement la capacité des AGPI en n-3 à inhiber la prolifération et la différenciation des adipocytes en réprimant les principaux facteurs de

transcription impliqués dans l'adipogenèse (Kim et al., 2006, Tanabe et al., 2008, Manickam et al., 2010, Barber et al., 2013). Ainsi, Kim et collaborateurs ont montré qu'un traitement au DHA (25-200  $\mu\text{M}$ ) conduisait à une inhibition dose-dépendante de la différenciation adipocytaire, réduisant le nombre de gouttelettes lipidiques (Kim et al., 2006). D'autres études ont révélées que le DHA (100  $\mu\text{M}$ ), ainsi que l'EPA, réduisait l'accumulation de lipides et conduisait à diminuer l'expression de PPAR $\gamma$  durant la différenciation. De plus, l'EPA est également capable d'inhiber le taux d'expression de C/EBP $\alpha$  dans des cellules 3T3-L1 (Tanabe et al., 2008, Manickam et al., 2010). En plus de leurs effets sur la différenciation adipocytaire, des études ont également montré que les AGPI en n-3 pouvaient aussi réguler l'apoptose des adipocytes. Ainsi, Kim et collaborateurs ont montré que le DHA (100-200  $\mu\text{M}$ ) induisait l'apoptose des adipocytes 3T3-L1 (Kim et al., 2006). D'autres études ont montré que l'EPA (250  $\mu\text{M}$ ) réduisait les taux de pAKT, BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) et de NF- $\kappa\text{B}$ , alors qu'il augmentait les taux de AKT, BAD (Bcl2-associated agonist of cell death) et PPAR $\gamma$ , suggérant que les AGPI en n-3 promeuvent la différenciation, inhibent la prolifération et induisent l'apoptose de cette lignée cellulaire pré-adipocytaire (Hanada et al., 2011).

Par ailleurs, il a été montré que les AGPI en n-3 pouvaient moduler la cellularité du TA. Ainsi, Tekeleslassie et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation du nombre d'adipocytes au niveau de dépôts adipeux inguinaux de rats supplémentés avec des AGPI en n-3 durant 22 semaines (Tekeleslassie et al., 2013). Par conséquent, White et collaborateurs ont observé une augmentation du taux d'expression du facteur de transcription pro-angiogénique PPAR $\gamma$  et une diminution du gène Gata3, un inhibiteur de la transition de l'adipocyte en adipocytes totalement différencié au niveau du TA épидidymal de souris transgéniques fat-1, suggérant que l'enrichissement transgénique de ces souris en AGPI en n-3 promeuve l'adipogenèse (White et al., 2015). Au contraire, d'autres travaux chez la souris ont montré que l'ajout de faibles teneurs d'AGPI en n-3 dans le régime alimentaire conduisait à une diminution du nombre de cellules, à l'origine de la diminution de masse du TA (Ruzickova et al., 2004).

Les AGPI en n-3 peuvent également influencer le stockage et la mobilisation des lipides du TA. L'accumulation de TAG dans les adipocytes semble être la résultante de la captation d'AG alimentaires et/ou d'une biosynthèse *de novo* d'AG. Bien que cette dernière se produise principalement au niveau hépatique, il a récemment été montré l'importance d'une lipogenèse du TA comme cible potentielle dans le combat de l'obésité (Lodhi et al., 2012). Concernant cette régulation de la lipogenèse du TA, les AGPI en n-3 sont d'importants modulateurs des enzymes de la lipogenèse. Ainsi, le DHA mais également l'EPA (100  $\mu\text{M}$ ) diminuent l'expression génique et

protéique de la SCD1 dans des cellules 3T3-L1 (Manickam et al., 2010) ainsi que de la GPDH (glycerol-3 phosphate déshydrogénase) (Kalupahana et al., 2010). En revanche, Guo et collaborateurs n'ont trouvé aucune modification de la lipogenèse lors d'un traitement de cette même lignée cellulaire avec de l'EPA à 100  $\mu$ M durant 24 heures (Guo et al., 2005). Ces différences de résultats entre études peuvent en partie être dues aux doses d'AGPI en n-3 testées ainsi que la durée des traitements. Au-delà de ces études *in vitro*, il a également été montré des aspects importants des AGPI en n-3 sur des modèles animaux. Ainsi, une étude réalisée avec des rats nourris avec un régime riche en sucre a montré qu'une supplémentation en huile de poisson pendant 2 semaines diminuait le taux d'expression génique de FAS au niveau du TA brun (Sebokova et al., 1996). De plus, l'inactivation spécifique de PPAR $\gamma$  au niveau du TA de souris a montré une diminution de l'expression génique de SCD-1 lorsqu'un concentré d'AGPI en n-3 (contenant 45 % de DHA et 14 % d'EPA, en remplacement de 15 % des lipides alimentaires) était ajouté à leur régime alimentaire durant 42 jours (Hensler et al., 2011). Ces études animales montrent donc l'importance des AGPI en n-3 dans la répression des gènes d'enzymes lipogéniques diminuant ainsi la lipogenèse et l'accumulation de masse grasse.

Il semble que les AGPI en n-3 pourraient non seulement diminuer la lipogenèse mais également favoriser la lipolyse (notamment au niveau des cellules endothéliales des capillaires du TA) et ainsi réguler la captation d'AG des lipoprotéines riches en TAG par les adipocytes. En effet, Baltzell et collaborateurs ont montré une diminution de la LPL du TA ainsi que du poids de ce tissu parallèlement à une augmentation de l'activité de la LPL dans le muscle soleus ainsi qu'une diminution des TAG plasmatiques chez des rats nourris avec de l'huile de poisson, suggérant un changement depuis le stockage vers l'oxydation des lipides (Baltzell et al., 1991).

Concernant l'oxydation, plusieurs études ont suggéré que les AGPI en n-3 pourraient augmenter l'oxydation des AG au niveau mitochondrial et peroxisomal. En effet, des cellules 3T3-L1 traitées avec de l'EPA à 100  $\mu$ M durant 24 heures présentent une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des AG parallèlement à une augmentation de l'activité de la carnitine palmitoyltransferase (CPT) -1A (Guo et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles animaux. Flachs et collaborateurs ont montré, chez des souris mâles C57BL/6J, que l'ajout de 51 % de DHA et 6 % d'EPA (en remplacement de 44 % des lipides alimentaires) pendant 4 semaines augmentait le taux d'expression génique de CPT1a au niveau du TA péri-épididymaire et de l'acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) au niveau des TA péri-épididymaire et dorso-lombaire suggérant une stimulation de l'oxydation des AG dans ces dépôts adipeux.

Des études ont suggéré la capacité des AGPI en n-3 à réguler de façon positive la biogenèse mitochondriale au sein du TA blanc. Ainsi, il a été montré que des AGPI en n-3 tels que le DHA et l'ALA à 200 µM durant 24 heures augmentaient les taux d'ARNm codant pour le peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) et le nuclear respiratory factor 1 (NRF1), qui sont deux facteurs de transcription particulièrement impliqués dans la biogenèse mitochondriale d'adipocytes 3T3-L1 en culture (Flachs et al., 2005). De plus, une étude récente a montré la capacité de l'EPA (à une concentration de 200 mM) à non seulement augmenter le contenu en ADN mitochondrial et l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (PGC1a, NRF1 et COXiv), mais aussi à augmenter le taux d'ARNm codant pour Ucp1, Ucp2, Ucp3 et Cidea (Cell Death Activator) durant la différenciation d'adipocytes du TA inguinal, suggérant que l'EPA semble pouvoir promouvoir le « brunissement » d'adipocytes du TA inguinal. De façon tout aussi importante, cet effet n'a pas été retrouvé lorsque 200 µM d'EPA ont été ajoutés durant 24 heures à des adipocytes inguinaux matures, suggérant que l'EPA exerce ces effets de « brunissement » *via* le recrutement d'adipocytes beiges dits « brite » (Zhao and Chen, 2014). D'autre part, il a été montré qu'un traitement combinant à la fois des AGPI en n-3 (EPA et DHA) et une légère restriction calorique pendant 5 semaines avait une action synergique sur la prévention de l'obésité et des perturbations métaboliques associées telles que l'inflammation et la résistance à l'insuline et ce de façon parallèle à une induction synergique de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) et une oxydation des AG particulièrement au niveau du TA blanc. Ces résultats sont observés sans augmentation d'UCP1 (Flachs et al., 2005). De même, Janovska et collaborateurs ont montré que les effets anti-obésité des AGPI en n-3 chez des souris nourries avec un régime obésogène durant 7 mois étaient indépendants de la thermogénèse induite par le froid (Janovska et al., 2013).

### **X.1.2. AGPI en n-3 et insulino-résistance**

Lors de l'obésité, l'expansion du TA concomitant avec la mobilisation de cellules immunitaires, conduit à une activation des cascades inflammatoires qui impactent la voie de signalisation de l'insuline et la captation du glucose, favorisant ainsi le développement de l'IR (McArdle et al., 2013). Bien que plusieurs études chez l'animal suggèrent que les AGPI en n-3 aient des propriétés insulino-sensibilisantes, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore totalement compris. Il semblerait que les AGPI en n-3 puissent améliorer la transduction du signal de l'insuline (cf figure 5 p 12) au niveau des adipocytes, affectant de fait, la captation du glucose insulino-stimulée *via* la régulation de l'expression ou de la translocation du transporteur au glucose insulino-

dépendant GLUT1 (Gonzalez-Periz et al., 2009, Taouis et al., 2002)). Il a été montré que des adipocytes de rats déplétés en AGPI en n-3 présentaient une plus faible incorporation du glucose à la fois à l'état basal et insulino-stimulé (Oguzhan et al., 2006) suggérant un rôle des AGPI en n-3 dans la captation du glucose par les adipocytes. De plus, des adipocytes en culture de rats supplémentés en huile de poisson durant une semaine présentaient une augmentation des teneurs en GLUT4 et GLUT1 couplée à l'augmentation de la captation du glucose insulino-stimulée (Ezaki et al., 1992). Une surexpression du transporteur GLUT4 a été observée dans du TA de rats rendus insulino-résistants par un régime riche en sucres supplémenté en huile de poisson durant 3 semaines (Peyron-Caso et al., 2002). Il a également été montré que la supplémentation durant 5 semaines du régime alimentaire par des AGPI en n-3 (6 % du contenu lipidique total) améliorait la résistance à l'insuline en lien avec une augmentation de l'expression des messagers de IRS1 et GLUT4 au niveau du TA de souris génétiquement obèses *ob/ob* (Gonzalez-Periz et al., 2009). Cependant, d'autres auteurs ne montraient que de faibles effets sur l'expression adipocytaire de GLUT4 (alors qu'une augmentation significative était observée dans le muscle squelettique) après 9 semaines de traitement avec de l'EPA à raison de 0,5 g/kg de poids corporel, en association avec une plus forte tolérance au glucose et une plus faible insulïnémie chez des rats spontanément diabétiques (Gonzalez-Periz et al., 2009). Au contraire, Gillam et collaborateurs (Gillam et al., 2009) n'ont trouvé aucun effet d'une supplémentation en huile de poisson (menhaden) durant 8 semaines et demi (10 % de l'apport lipidique) sur les taux d'ARNm codant pour GLUT4 et IR (récepteur à l'insuline).

Il apparait donc que, collectivement, ces données suggèrent que les AGPI en n-3 d'origine marine peuvent moduler la captation du glucose et la réponse à l'insuline au niveau du TA *via* divers mécanismes. Les AGPI en n-3 peuvent également changer le contenu en AG des phospholipides membranaires, augmentant ainsi leur insaturation (Lombardo and Chicco, 2006, Zambo et al., 2013), ce qui pourrait également médier leurs effets sur la voie de signalisation à l'insuline (Lombardo and Chicco, 2006). De plus, les AGPI en n-3 peuvent également influencer la libération d'adipokines par le TA qui a un impact sur le statut inflammatoire et la sensibilité à l'insuline dans les pathologies liées à l'obésité (Moreno-Aliaga et al., 2010).

En effet, il a récemment été montré qu'un traitement de 48 heures avec de l'EPA (10 mM) et du DHA (50 mM) augmentait la libération d'adiponectine (une adipokine insulino-sensibilisante régulant les métabolismes du glucose et des lipides en limitant la lipogenèse et en stimulant l'oxydation des lipides) uniquement sur des adipocytes 3T3-L1 à un stade de maturation précoce (8 jours après l'induction de la différenciation), alors qu'aucun effet significatif n'a été observé



lorsque des adipocytes étaient traités avec ces AG à des stades plus tardifs (12 et 16 jours) après l'induction de la différenciation (Prostek et al., 2014). Ces données suggèrent donc que la régulation de l'adiponectine par les AGPI en n-3 est dose et temps-dépendante et peut être modifiée par la maturation des adipocytes. Des données de la littérature montrent également que des traitements *in vivo* avec des AGPI en n-3 conduisent à une augmentation des teneurs circulantes ou une surexpression des messagers codant pour l'adiponectine, à la fois chez des rongeurs (Flachs et al., 2006, Flachs et al., 2009) et des humains (Itoh et al., 2007, Gammelmarm et al., 2012).

D'autre part, il a également été montré que les AGPI en n-3 pouvaient aussi moduler la libération d'une autre adipokine qu'est la leptine. Cette adipokine joue un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire et de l'appétit, la dépense énergétique et la signalisation de l'insuline. De plus, la leptine est connue pour avoir des effets pro-inflammatoires du fait de sa capacité à activer la réponse immunitaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF $\alpha$  et IL6 (Shen et al., 2005). Cependant, au regard des études sur des modèles animaux d'obésité traités avec des AGPI en n-3, les résultats concernant la leptine restent apparemment controversés. Il a en effet récemment été montré que la surexpression adipocytaire de la leptine par un régime hyperlipidique était inversée par une administration par gavage d'AGPI en n-3 (1 g/jour pendant 20 semaines) bien que les teneurs sériques n'atteignaient pas la significativité statistique (Ding et al., 2014). Au contraire, Peyron-Caso et collaborateurs et Rossi et collaborateurs ont montré une augmentation des teneurs circulantes en leptine suite à une supplémentation alimentaire en AGPI en n-3 (en remplaçant 14 % des lipides avec de l'huile de poisson durant 3 semaines ou en remplaçant l'apport en lipides par 7 % d'huile de foie de morue/100 g de poids corporel pendant 2 mois, respectivement) (Peyron-Caso et al., 2002, Rossi et al., 2005).

L'apeline, une adipokine aux propriétés anti-diabétiques, anti-obésité et cardioprotectrices, peut également être modulée par les AGPI en n-3. Effectivement, il a été montré qu'un traitement avec de l'EPA (100  $\mu$ M durant 24 heures) stimulait la production d'apeline dans des adipocytes (Lorente-Cebrian et al., 2010) et des myocytes (Bertrand et al., 2013) en culture. Une autre étude, *in vivo* cette fois, a montré que la supplémentation en EPA (1 g/jour pendant 35 jours) de rats nourris avec un régime hyperlipidique augmentait le taux d'ARNm adipocytaires de l'apeline et suggérait ainsi que les effets insulino-sensibilisants de l'EPA chez les rongeurs pouvaient être associés aux effets stimulateurs de l'apeline (Perez-Echarri et al., 2009).

En résumé, ces données de la littérature mettent en lumière le rôle modulateur des AGPI en n-3 sur l'IR ainsi que sur la production d'adipokines par le TA, qui peuvent expliquer en partie les effets bénéfiques de ces AG sur les métabolismes du glucose et des lipides et contribuer à contrôler le statut inflammatoire du TA.

## **X.2. AGPI en n-3 et inflammation**

De nombreuses études s'accordent à montrer que les AGPI en n-3 peuvent améliorer l'inflammation du TA à la fois chez des modèles de rongeurs obèses et chez l'Homme (Kalupahana et al., 2010, Gonzalez-Periz and Claria, 2010, Titos and Claria, 2013). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire les effets anti-inflammatoires des AGPI en n-3 au niveau du TA blanc par exemple : (1) diminuer la production d'adipokines pro-inflammatoires et augmenter la libération d'adipokines anti-inflammatoires du TA ; (2) diminuer l'infiltration adipocytaire de macrophages; (3) réduire la formation de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires dérivant des AGPI en n-6 ; (4) être des substrats pour la formation de médiateurs lipidiques pro-résolutifs.

Des travaux sur des cultures adipocytaires montrent la capacité des AGPI en n-3 à diminuer la libération de cytokines pro-inflammatoires. Il a par exemple été montré qu'un ajout d'EPA à 150  $\mu$ M à des adipocytes 3T3-L1 diminuait significativement la sécrétion d'IL6 et augmentait les teneurs en adiponectine à l'issue de 48 heures de traitement (Kalupahana et al., 2010). De tels effets ont également été observés sur des modèles animaux. Ainsi, Rossmeisl et collaborateurs ont mis en évidence une diminution de MCP-1 ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'adiponectine dans le TA blanc de souris nourries durant 4 mois avec un régime hyperlipidique suivi par une supplémentation durant 9 semaines avec de l'EPA et du DHA à raison de 30 g/kg de régime alimentaire (Rossmeisl et al., 2012). Il a récemment été montré qu'une administration d'AGPI en n-3 par gavage (1 g/jour pendant 20 semaines) à des animaux diminuait les teneurs protéiques adipocytaires de résistine et de leptine et augmentait les teneurs en adiponectine (Ding et al., 2014). Cependant, Gonzalez-Periz et collaborateurs n'ont observé aucun effet sur le taux d'expression des messagers codant pour MCP-1, IL6 ou TNF $\alpha$  au niveau du TA de souris *ob/ob* pour lesquelles 6 % de leur ration alimentaire était supplémentée avec des AGPI en n-3 durant 5 semaines, alors que l'expression tissulaire de l'adiponectine était également significativement augmentée (Gonzalez-Periz et al., 2009). Lors d'un régime induisant une obésité, il a été montré que le remplacement de 5 % de l'apport lipidique alimentaire par de l'EPA diminuait l'expression génique de MCP-1 au niveau du TA ainsi que les teneurs circulantes en leptine alors que l'adiponectine plasmatique était

augmentée (Sato et al., 2010). Par ailleurs, au niveau du TA de souris transgéniques *fat-1* mâles, il a été observé une diminution de teneurs de certaines cytokines pro-inflammatoires (MCP-1, RANTES, IL $\beta$ , IL2 et IL6), parallèlement à une diminution du pourcentage de cellules F4/80 positives (White et al., 2010).

Tel que mentionné auparavant, l'obésité se manifeste par une augmentation des taux d'infiltration de macrophages au sein du TA. Diverses études ont montré que les AGPI en n-3 pouvaient diminuer cette infiltration et promouvoir le changement de ces macrophages de leur phénotype M1 à M2. Ainsi, un enrichissement du milieu de culture en DHA (200  $\mu$ M durant 9 heures) augmentait l'expression des ARNm des principaux marqueurs du phénotype M2 tels que CD36, IL10 et TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta) de cellules RAW264.7 (Chang et al., 2015). De plus, Todoric et collaborateurs avaient également observé une diminution de l'expression de MCP-1 et de marqueurs liés à l'infiltration de macrophages tels que MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1), IL1 $\alpha$  et CD14 dans le TA blanc de souris *db/db* nourries avec un régime hyperlipidique et supplémenté avec des AGPI en n-3 (Todoric et al., 2006). Il est également important de mentionner qu'une étude de Oh et collaborateurs ont identifié que GPR120 était un récepteur au AGPI en n-3 jouant un rôle important dans leurs effets anti-inflammatoires et insulino-sensibilisants (Oh et al., 2010). Les AGPI en n-3 n'étaient pas capables de diminuer ni l'inflammation ni l'infiltration de macrophages lorsqu'ils étaient administrés à des souris invalidées pour la protéine GPR120, cependant, ces données suggèrent tout de même un rôle clé de ce récepteur comme un médiateur potentiel des effets anti-inflammatoires des AGPI en n-3. Des études chez des souris transgéniques *fat-1* ont renforcé ces données, puisqu'une diminution des marqueurs de la migration des macrophages a été observée dans le TA de ces souris comparativement à leurs témoins sauvages nourries avec un régime hyperlipidique (Li et al., 2015). L'induction d'un changement phénotypique de macrophages de type M1 en macrophage de type M2 a également été récemment observé chez ces souris transgéniques *fat-1* (Belchior et al., 2015).

Au sein du TA, d'autres modifications se produisent lorsque sa teneur en AGPI en n-3 est augmentée. Un traitement en ces AG peut diminuer la formation de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires dérivés des AGPI en n-6 tels que les leucotriènes et les prostaglandines dérivés de l'AA. Il a en effet été montré que le DHA et l'EPA modulaient l'utilisation de l'AA (Needleman et al., 1979), et une inhibition compétitive de la production de médiateurs lipidiques des AGPI en n-6 par les AGPI en n-3 semblait se mettre en place (Lee et al., 1984, Needleman et al., 1979). Le DHA est également capable d'inhiber la production de prostaglandines par une forte compétition

avec la prostaglandine synthétase, impliquée dans la synthèse des prostaglandines (Corey et al., 1983). Il a été montré qu'un enrichissement en AGPI en n-3 alimentaires diminuait la formation de médiateurs pro-inflammatoires dérivés des AGPI en n-6 tels que PGE2, PGF2a, TXB2, 5-HETE, 12-HETE et 15-HETE dans le TA de souris *ob/ob* (Gonzalez-Periz et al., 2009). Ce mécanisme compétitif entre les AGPI en n-3 et les AGPI en n-6 vis-à-vis de la formation de seconds messagers lipidiques pourrait ainsi diminuer l'inflammation du TA et aider à limiter l'inflammation de bas grade observée lors de l'obésité et des complications métaboliques.

Serhan et collaborateurs ont découvert que les AGPI en n-3 servaient également de substrats à la formation de médiateurs lipidiques résolvant particuliers - les SPM (Specialized Proresolving lipid Mediators) – (Serhan, 2007, Serhan, 2009). Les SPM dérivés de l'EPA sont les résolvines de la série E (RevE1 à 3) et les médiateurs lipidiques dérivant du DHA sont ceux de la série D tels que les résolvines D1 à 6, les neuroprotectines (NPD1) et les marésines (MaR1 et 2) (Serhan, 2014). Ces nouveaux composés exercent, à des doses allant du pico au nano molaire, des actions anti-inflammatoires et pro-résolutives lors de l'inflammation chronique et aiguë afin d'aider à récupérer une homéostasie tissulaire (Serhan, 2014, Qu et al., 2015). Claria et collaborateurs ont détectés une gamme de ces SPM dans du TA sous-cutané humain, tels que RevD1, RevD2, PD1, lipoxine A4 ainsi que des précurseurs de la voie de biosynthèse de RevD1, PD1, RevE1 et marésine 1 qui sont les 17-HDHA (hydroxy DHA), 18-HEPE (acide Hydroxy-Eicosa-Penta-Enoïque), 14-HDHA respectivement (Claria et al., 2012). Il a été montré, lors de l'obésité, une diminution de la production de certains de ces médiateurs lipidiques (Claria et al., 2012, Neuhofer et al., 2013). Neuhofer et collaborateurs ont également montré que la diminution de teneur de 17-HDHA et PD1 au niveau du TA représentait une des premières altérations observées lors d'une inflammation induite par un régime alimentaire (Neuhofer et al., 2013). Plusieurs études ont montré qu'une supplémentation en AGPI en n-3 favorisait une augmentation de la biosynthèse des SPM dérivés des AGPI en n-3 ainsi que de leurs précurseurs au niveau du TA de souris obèses (Gonzalez-Periz et al., 2009, Neuhofer et al., 2013). Enfin, un traitement de patients présentant une obésité sévère mais non diabétiques avec des AGPI en n-3 purifiés à raison de 3,36 g/jour pendant 8 semaines, augmentait significativement la production de RevE1, 17-HDHA, PD1 et RevD1 au niveau du TA viscéral. Ces auteurs ont également observé une diminution de la masse de TA ainsi que de l'inflammation systémique (Itariu et al., 2012).

De récents travaux ont été menés afin d'étudier la capacité de ces SPM à améliorer l'inflammation du TA lors de l'obésité et des complications métaboliques qui lui sont associées. Ainsi, Gonzalez-Periz et collaborateurs ont montré que le traitement de souris *ob/ob* avec de la RevE1 et de la PD1 mimait les effets bénéfiques d'une supplémentation en AGPI en n-3 (Gonzalez-Periz et al., 2009). Ils ont en effet observé que RevE1 atténuait la stéatose hépatique en surexprimant les messagers de l'adiponectine, GLUT4, IRS1, PPAR $\gamma$  ainsi que de la phosphorylation de l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase) dans le TA. Cette expression d'adiponectine était également augmentée par PD1 sur des explants de TA de ces souris génétiquement obèses. Il a été montré que RevD1 améliorait la tolérance au glucose, diminuait la glycémie à jeun, augmentait l'adiponectine et, au niveau du TA, favorisait l'activation d'AKT et AMPK, alors qu'elle diminuait l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 (Hellmann et al., 2011). De plus, Titos et collaborateurs ont montré que le traitement de macrophages avec de la RevD1 diminuait l'expression de cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant des marqueurs M2 tels que Ym1 et arginase-1 (Titos et al., 2011). Ce groupe de recherche a également montré qu'un traitement *ex vivo* d'explants de TA inflammés d'obèses avec RevD1 et RevD2 atténuait de façon dose-dépendante l'altération d'expression et de sécrétion d'adiponectine et diminuait également les teneurs en adipokines pro-inflammatoires telles que la leptine, TNF $\alpha$ , IL6 et IL1 $\beta$ . De plus, RevD1 et RevD2 réduisaient l'adhésion aux adipocytes de monocytes stimulés par MCP-1 et le leucotriène B4 (Claria et al., 2012). Pour finir, il a été montré que le traitement de souris *db/db* avec du 17-HDHA réduisait l'expression adipocytaire de cytokines pro-inflammatoires telles que MCP-1, TNF $\alpha$ , IL6 et ostéopontine, et augmentait les teneurs en adiponectine. En parallèle, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose ont également été observées (Neuhofner et al., 2013).

### **X.3. AGPI en n-3 et homéostasie intestinale**

#### **X.3.1. AGPI en n-3, microbiote et perméabilité intestinale**

Des études chez l'enfant ont montré que les AGPI en n-3 étaient impliqués dans la prévention du MetS en modulant le microbiote intestinal vers une population microbienne favorable (Andersen et al., 2011, Brandtzaeg, 2001, Nielsen et al., 2007). Une étude prospective a montré qu'une supplémentation en huile de poisson retardait l'augmentation de *Bacteroidetes* associée à l'âge parmi des enfants âgés de 9 à 18 mois, avec des changements plus prononcés chez des enfants qui ont cessé le lait maternel avant de débiter l'intervention. Les *Bifidobactéries* étaient plus nombreuses chez des enfants nourris au lait maternel riche en AGPI en n-3 par rapport à ceux

nourris au lait maternisé, suggérant que les AGPI en n-3 peuvent influencer très précocement la colonisation intestinale (Andersen et al., 2011). Chez l'animal, il a été montré qu'une supplémentation en AGPI en n-3 (huile de lin) atténuait la diminution du rapport *Bactéroidetes/Firmicutes* chez des souris nourries avec un régime riche en lipides par rapport aux souris nourries avec un régime contrôle (Liu et al., 2012a). Une supplémentation en huile de poisson inhibait également la croissance des bactéries *Helicobacter*, *Clostridiales*, *Firmicutes* et *Pseudomonas sp* chez des souris ICR (Yu et al., 2014). Il a été montré que les bactéries *Helicobacter* et *Firmicutes* jouaient un rôle dans l'apparition d'ulcères et de l'obésité respectivement (Correia et al., 2012, Das, 2010). Gosh et collaborateurs ont montré que les AGPI en n-3 étaient capables de renverser les effets négatifs des régimes riches en AG en n-6 en augmentant les proportions en *Bacteroides spp* associés à un phénotype mince et les *Lactobacillus spp* et *Bifidobacteria spp*, connues pour avoir des effets anti-inflammatoires (Ghosh et al., 2013). Ces résultats ont également été observés chez des souris transgéniques fat-1, où Kaliannan et collaborateurs ont montré une réduction des phyla pro-inflammatoires *Proteobacteria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, et *Clostridium* cluster XI, comparativement aux souris sauvages. À l'inverse, les bactéries aux propriétés anti-inflammatoires, telles que *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus*, *Clostridium* clusters IV et XIVa et *Enterococcus faecium*, étaient fortement présentes chez les souris transgéniques fat-1 par rapport aux souris sauvages. Ces auteurs ont montré les souris transgéniques fat-1 avaient des teneurs augmentées en facteur IAP (Intestinal Alkaline Phosphatase), pouvant en partie expliquer cette modulation de microbiote (Kaliannan et al., 2015). L'IAP, une enzyme présente dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinal, serait impliquée dans la régulation du microbiote intestinal et le maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal (Malo et al., 2010). Il a été montré que les souris déficientes en IAP présentaient une population microbienne intestinale réduite en termes de diversité et de quantité comparativement aux souris sauvages (Malo et al., 2010). Cette enzyme supprime par exemple la croissance d'*E.coli*, une bactérie membre du phylum *Proteobacteria* pro-inflammatoire (Campbell et al., 2010, Koyama et al., 2002). Chez des souris, une supplémentation orale d'IAP restaure sous 7 jours la perte du microbiote intestinal induite par un traitement antibiotique (eau de boisson contenant 5 mg/ml de streptomycine) sur 3 jours (Malo et al., 2010). Il a été montré que l'IAP inhibait la translocation des bactéries dans la circulation sanguine à travers l'épithélium intestinal par une répression du facteur de croissance VEGF (Wang et al., 2015). Ce facteur VEGF est un polypeptide qui diminue notamment l'expression de protéines de jonctions serrées et participe aux perturbations de la perméabilité intestinale (Koutroubakis et al., 2004).

Certaines études avaient déjà montré que l'enrichissement membranaire en EPA et en DHA atténuait les perturbations de structure des jonctions serrées par l'augmentation de l'expression et la prévention de la redistribution des protéines de jonctions serrées comme OCLN, ZO-1 et claudines, dans un modèle de colites chez le rat (Li et al., 2008c) et dans un modèle cellulaire endothélial (Jiang et al., 1998b). Une étude chez le porc a montré qu'un régime alimentaire (5 % d'huile de poisson) enrichissait la muqueuse intestinale en EPA, ce qui améliorait le profil inflammatoire des animaux et les protégeaient des perturbations de la barrière intestinale. L'huile de poisson augmentait la taille des villosités au niveau du jéjunum et de l'iléon et augmentait l'expression de la protéine de jonction serrée OCLN au niveau du jéjunum (Liu et al., 2012b). Jiang et collaborateurs ont suggéré que la formation des jonctions serrées était régulée par la phosphorylation de ZO-1 et OCLN (Jiang et al., 1998b). Cette phosphorylation permet à ZO-1 d'interagir avec l'OCLN et les filaments d'actine intra-cytosoliques (Itoh et al., 1997). De plus il a récemment été montré que les AGPI en n-3 prévenaient des modifications morphologiques du jéjunum induites lors de l'ischémie/reperfusion (I/R) chez des rats (Li et al., 2014b). Li et collaborateurs ont montré que les AGPI en n-3 atténuaient les altérations des protéines de jonctions serrées dans la muqueuse intestinale en partie par une prévention de la perte d'expression d'OCLN. Ces auteurs ont suggéré que cette prévention passait par la répression de l'expression de I-FABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) dans le plasma des animaux (Li et al., 2014b). I-FABP est une protéine produite par les entérocytes et ne se retrouve normalement pas dans la circulation sanguine. Ces auteurs ont montré que l'I-FABP participait à l'activation de la voie de signalisation par PPARs, impliquée dans l'inhibition de la destruction des jonctions serrées et dans la réduction de l'inflammation systémique (Wang et al., 2012). Il a également été montré que l'EPA et le DHA préservaient l'intégrité de la barrière épithéliale, par une réduction de la perméabilité induite par des cytokines inflammatoires telles que  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$  et IL4 (Li et al., 2008b, Willemsen et al., 2008).

### **X.3.2. AGPI en n-3, inflammation et endotoxémie métabolique**

Il a été montré chez des souris transgéniques fat-1 que la régulation positive de facteurs muco-protecteurs et protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 et OCLN, au niveau de l'intestin, s'accompagnait également d'une augmentation de la formation de dérivés anti-inflammatoires d'AG en n-3 (RevE1, RevD et PD1) et d'une régulation négative de cytokines et facteurs pro-inflammatoires ( $NF-\kappa B$ ,  $TNF\alpha$ , iNOS et  $IL1\beta$ ) (Kang, 2007, Nowak et al., 2007). La consommation de régimes enrichis en huile de poisson contenant 25 à 30 % d'EPA et DHA ou en

huile de perilla contenant 55 à 60 % d'ALA réduisait l'iléite chronique de souris présentant une sénescence accélérée P1/Yit en inhibant le recrutement des monocytes dans le tissu intestinal inflammé (Matsunaga et al., 2009). De plus, il a été montré qu'une supplémentation en AGPI en n-3 protégeait d'une colite chimiquement induite au trinitrobenzène sulphonique chez des rats mâles Wistar (Kono et al., 2010) et au DSS chez des rats mâles Sprague-Dawley (Tyagi et al., 2012). Gravaghi et collaborateurs ont montré que la réduction des marqueurs inflammatoires observée chez des souris traitées au DSS et supplémentées en AGPI en n-3 pouvait être médiée par une action sur les enzymes PLA2 et COX-2. Ces auteurs ont également observé que les AGPI en n-3 diminuaient de façon marquée la production de protéines pro-inflammatoires (MCP-1, 3 et 5 et MIP-1 pour Macrophage Inflammatory Protein-1), interleukines pro-inflammatoires (IL-1, IL- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-18) dans l'intestin des souris (Gravaghi et al., 2011). Il a également été proposé que les AGPI en n-3 réduisaient le stress oxydatif et l'inflammation médiée par NF- $\kappa$ B (Hassan et al., 2010, Ishida et al., 2010). Les AGPI en n-3 inhibaient la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la production de monoxyde d'azote (NO) dans les macrophages transformés RAW264.7 (Aldridge et al., 2008) et macrophages péritonéaux de souris (Meijerink et al., 2011). Il a été montré que PPAR $\gamma$  était impliqué dans ce mécanisme de contrôle de l'inflammation. Dans le modèle cellulaire C2C12 de myoblastes de souris, la répression de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B induite par un traitement à l'EPA, s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  (Huang et al., 2011). Hudert et collaborateurs ont montré que des souris transgéniques fat-1 traitées au DSS présentaient une réduction des symptômes de colite et une diminution de l'activité colique de NF- $\kappa$ B, des teneurs en TNF $\alpha$  et du stress oxydatif, ainsi qu'une amélioration de la fonction barrière de la muqueuse colique comparativement aux souris contrôles traitées au DSS. Ces auteurs attribuent ces effets protecteurs des AGPI en n-3 aux augmentations dans le côlon des souris, des taux de médiateurs anti-inflammatoires dérivés des AGPI en n-3 (résolvines E1 et D3, neuroprotectine D1, prostaglandine E3 et leukotriène B5) (Hudert et al., 2006). Il a été montré que la 17(R)-Resolvine D1 aidait à résoudre l'inflammation en réduisant la réponse pro-inflammatoire de macrophages traités au LPS *E. coli* (Palmer et al., 2011).

Peu d'études sont disponibles sur les AGPI en n-3 et l'endotoxémie métabolique provoquée par les LPS (Kaliannan et al., 2015, Liu et al., 2012b, Mani et al., 2013). Il a été montré que la composition en AG des régimes modulait l'endotoxémie post-prandiale dans un modèle porcin (Mani et al., 2013). L'huile de poisson, riche en AGPI en n-3 à très longues chaînes tels que l'EPA et le DHA réduisait le transport post prandial des endotoxines alors que l'huile de noix de coco (riche en AGS) augmentait le passage des endotoxines, et l'huile d'olive (riche en AGMI) n'avait aucun effet sur la perméabilité aux LPS (Mani et al., 2013). Suite à des injections intraveineuses de



LPS *E. coli* à des modèles animaux, il a été montré qu'une supplémentation alimentaire en DHA diminuait l'expression intestinale de messagers codant pour TLR4, des facteurs de sa voie de signalisation, tels que Myd88, IRAK1 et Traf6, et les concentrations en TNF $\alpha$ , ceci en lien avec une réduction de l'endotoxémie métabolique (Liu et al., 2012b). De plus, Kaliannan et collaborateurs ont montré que les AGPI en n-3 réduisaient l'inflammation et l'endotoxémie induite par un régime riche en AGPI en n-6, chez des souris transgéniques fat-1, en partie par l'augmentation de l'activité intestinale d'IAP (Kaliannan et al., 2015), réprimant la croissance de bactéries à Gram négatif porteuse des LPS (Malo et al., 2010). Il a été reporté que la production d'IAP pouvait être induite les résolvines E1, des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'EPA (Campbell et al., 2010).

Collectivement, ces données indiquent que les acides gras polyinsaturés en n-3 peuvent prévenir de la prévalence de l'obésité et des désordres métaboliques associés en modulant la population microbienne intestinale, maintenant l'intégrité de la barrière intestinale, et en diminuant l'inflammation systémique associée aux LPS. Néanmoins, des résultats discordants persistent sur l'impact d'une supplémentation en AGPI en n-3 puisque des études lui attribuent des effets bénéfiques au niveau intestinal (Investigators et al., 2009, Uchiyama et al., 2010), alors que d'autres montrent qu'elle exacerbe les atteintes aiguës de la muqueuse colique et l'inflammation induite par le DSS (Matsunaga et al., 2008, Innis et al., 2010, Zarepoor et al., 2014). De plus, Mujico et collaborateurs n'ont pas retrouvé d'effet d'un traitement avec de l'EPA et du DHA dans la prévention de la perturbation du microbiote intestinal de souris nourries avec un régime hyperlipidique (Mujico et al., 2013).

## **XI. Les limites aux interventions nutritionnelles**

Bien que les suppléments nutritionnelles en AGPI en n-3 ne semblent pas représenter de danger particulier, elles sont sources de discordes et présentent de multiples limites, principalement dues aux apports journaliers, à la durée des études, et aux sources en AG en n-3...

Par exemple, les apports en huile de poisson peuvent varier de 1,6 g/j jusqu'à plus de 100 g/j, ceux en AG en n-3 de 0,5 à 25 g/j et la durée des études de 2 semaines à 2 ans. Les études sont réalisées chez des sujets sains et/ou des patients présentant des troubles métaboliques comme par exemple des dyslipidémies (Fedor and Kelley, 2009, Shanab et al., 2011, Harris, 1989). Plusieurs variables provenant du régime ou de la procédure expérimentale, incluant la pureté ou la présence de composants indésirables dans les huiles comme les arômes, la sensibilité à l'oxydation, le stockage ou la durée du régime, peuvent apporter des effets confondants (Hudert et al., 2006, Kang, 2007, Hildebrandt et al., 2009). De plus, pour atteindre une augmentation significative *in vivo* des concentrations tissulaires en AGPI en n-3, des prises répétées de fortes doses d'AGPI en n-3 sont nécessaires sur une période de plusieurs mois. La biodisponibilité cellulaire en AG d'origine alimentaire implique de nombreux processus physiologiques, comme la digestion, l'absorption, le transport et le métabolisme de ces AG, qui peuvent être perturbés lors de situations physiopathologiques telles que l'obésité.

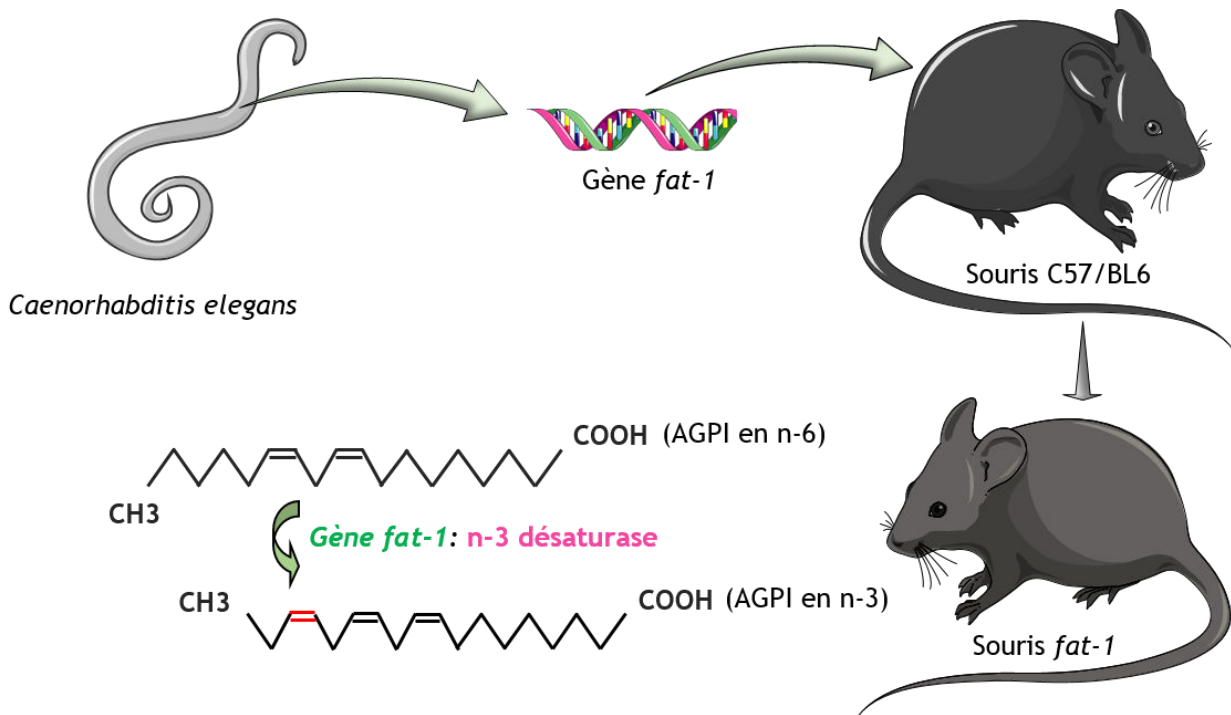
L'ensemble de ces facteurs confondants sont autant de biais possibles lors d'études nutritionnelles rendant difficile l'établissement de liens clairs entre la consommation d'AGPI en n-3 et leurs effets. Par conséquent, des modèles permettant de s'affranchir de ces interventions nutritionnelles sont nécessaires, afin de clarifier l'impact des AGPI en n-3 sur les physiopathologies inflammatoires en lien avec l'obésité.

## **XII. Modèle transgénique murin *fat-1***

En 1997, Spsychalla et collaborateurs ont isolé et caractérisé l'ADN complémentaire du gène *fat-1*, provenant du nématode *Caenorhabditis elegans* (Spsychalla et al., 1997). Ce gène a été identifié par son homologie (32 à 35 %) avec les gènes *fad-2* et *fad-3* d'*Arabidopsis*. Le gène *fat-1* code pour une n-3 désaturase permettant l'introduction d'une double liaison en position n-3 de la chaîne carbonée des AG en n-6. Ainsi, l'introduction du gène *fat-1* de *Caenorhabditis elegans* dans des cardiomyocytes de rat peut rapidement et efficacement augmenter les teneurs cellulaires en AGPI en n-3 et fortement rééquilibrer le rapport AGPI en n-6/n-3 (Spsychalla et al., 1997). Ce gène peut s'exprimer dans des cellules de mammifères de manière fonctionnelle et leur confère l'aptitude à convertir les AGPI en n-6 en AGPI en n-3, conduisant à un rapport n-6/n-3 équilibré et à une modification de la production d'eicosanoïdes (Kang et al., 2001).

En 2004, Kang et collaborateurs ont inséré le gène *fat-1* dans le génome de souris C57BL/6J par une méthode de transgénèse aléatoire par injection dans le pronucléus, du plasmide PGE8 contenant l'ADN complémentaire codant pour *fat-1* (Figure 22) (Kang et al., 2004). Ce gène *fat-1* a été couplé à un promoteur  $\beta$ -actine de poulet qui autorise une expression ubiquitaire chez la souris. Les souris transgéniques *fat-1* et sauvages maintenues sous le même régime montrent alors des profils lipidiques différents (riche en AG en n-3 et pauvre en AG en n-6 pour les souris transgéniques *fat-1* ; et riche en AG en n-6 et déficient en AG en n-3 pour les souris sauvages). Les tissus des animaux sauvages contiennent principalement des AGPI en n-6 (pour 98 %) dont LA et AA, et de faibles teneurs en AGPI en n-3 (apportés par le régime). À l'opposé, les tissus des souris transgéniques *fat-1* sont riches en AGPI en n-3, principalement en ALA, EPA, DPA (acide docosapentaénoïque) et DHA. Les concentrations en LA et AA dans les tissus des souris transgéniques *fat-1* sont significativement réduites, indiquant que les AG en n-6 ont été convertis en AG en n-3, entraînant une chute du rapport n-6/n-3 de 20-50 à presque 1, sans altérer les teneurs totales en lipides cellulaires. Cet enrichissement en AG en n-3, aux dépens des AG en n-6 permet l'équilibre du rapport n-6/n-3 et du rapport AA/(EPA+DPA+DHA) dans les organes et tissus. Ces auteurs ont examiné le profil lipidique des tissus sur quatre générations de souris transgéniques (homozygotes et hétérozygotes) et ont trouvé une augmentation effective en AG en n-3, indiquant que ce transgène est fonctionnellement actif *in vivo* et transmissible (Kang et al., 2004).

Ainsi, l'utilisation de la souris transgénique *fat-1*, capable d'une synthèse endogène d'AG en n-3, permet d'éliminer les facteurs confondants apportés par les régimes et ainsi permettre d'étudier leurs effets spécifiques (Xia et al., 2006, Kang, 2007, Rahman et al., 2009). Ces souris transgéniques *fat-1* constituent donc un modèle d'investigation approprié pour étudier les



**Figure 22** Création et caractéristiques du modèle transgénique *fat-1*

*Le gène fat-1 de Caenorhabditis elegans est inséré dans le génome d'une souris C57BL/6 par recombinaison hétérologue. Les souris fat-1 peuvent ainsi convertir de manière endogène les AGPI en n-6 en AGPI en n-3. D'après Kang et al. 2004*

fonctions biologiques des AG en n-3 ainsi que l'importance du rapport n-6/n-3 dans la prévention et/ou le traitement de maladies métaboliques.

# **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Les données bibliographiques développées ci-dessus rappellent que l'obésité - composante majeure du syndrome métabolique - est associée à une inflammation systémique et que les lipopolysaccharides semblent être de bons candidats impliqués dans le développement d'une endotoxémie métabolique pouvant être à l'origine de cette inflammation de bas grade associée à l'obésité et au diabète de type 2. D'autre part, la littérature a également montré que des régimes hyperlipidiques pouvaient altérer la composition du microbiote intestinal, entraînant une augmentation de la perméabilité de l'intestin, et par conséquent conduire à une augmentation des taux circulants de LPS.

Diverses études chez la souris et chez l'Homme semblent indiquer qu'une supplémentation en AGPI en n-3 soit capable d'améliorer la fonction barrière de l'intestin et de réduire l'inflammation chronique, lors de régimes hyperlipidiques.

Collectivement ces données indiquent qu'une modulation de la fonction barrière de l'intestin par les AGPI en n-3 reste incomplètement élucidée et que la capacité des AGPI en n-3 à diminuer la perméabilité induite par le LPS, plus particulièrement lors de l'utilisation de régimes alimentaires induisant l'obésité, reste à déterminer. De plus, lors d'expériences nutritionnelles, il est difficile de vérifier la contribution *per se* d'AGPI en n-3 spécifiques, du fait d'effets potentiellement confondants apportés par d'autres constituants alimentaires. Ainsi, l'utilisation du modèle transgénique fat-1 exprimant de manière ubiquitaire une n-3 désaturase catalysant la conversion des AGPI en n-6 en AGPI en n-3, permet de s'affranchir de suppléments nutritionnelles en n-3, et ainsi d'éviter les effets de facteurs confondants.

Ainsi, l'hypothèse sur laquelle repose ce travail est que les AGPI en n-3 pourraient exercer des effets bénéfiques lors de l'obésité et de l'inflammation qui lui est associée en régulant la population microbienne intestinale et/ou la libération au niveau systémique d'endotoxines de type lipopolysaccharidique, en préservant l'intégrité de la barrière intestinale (Figure 23).

Ainsi, le but de ce travail a été, *via* l'utilisation du modèle transgénique fat-1 présentant une diminution drastique du rapport n-6/n-3 au niveau tissulaire

1) d'évaluer les mécanismes impliqués dans la prévention de l'obésité en termes de diminution de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique

2) d'explorer la population microbienne intestinale afin de savoir si la prévention de l'obésité alimentaire observée chez les souris fat-1 est associée à une modulation du microbiote.

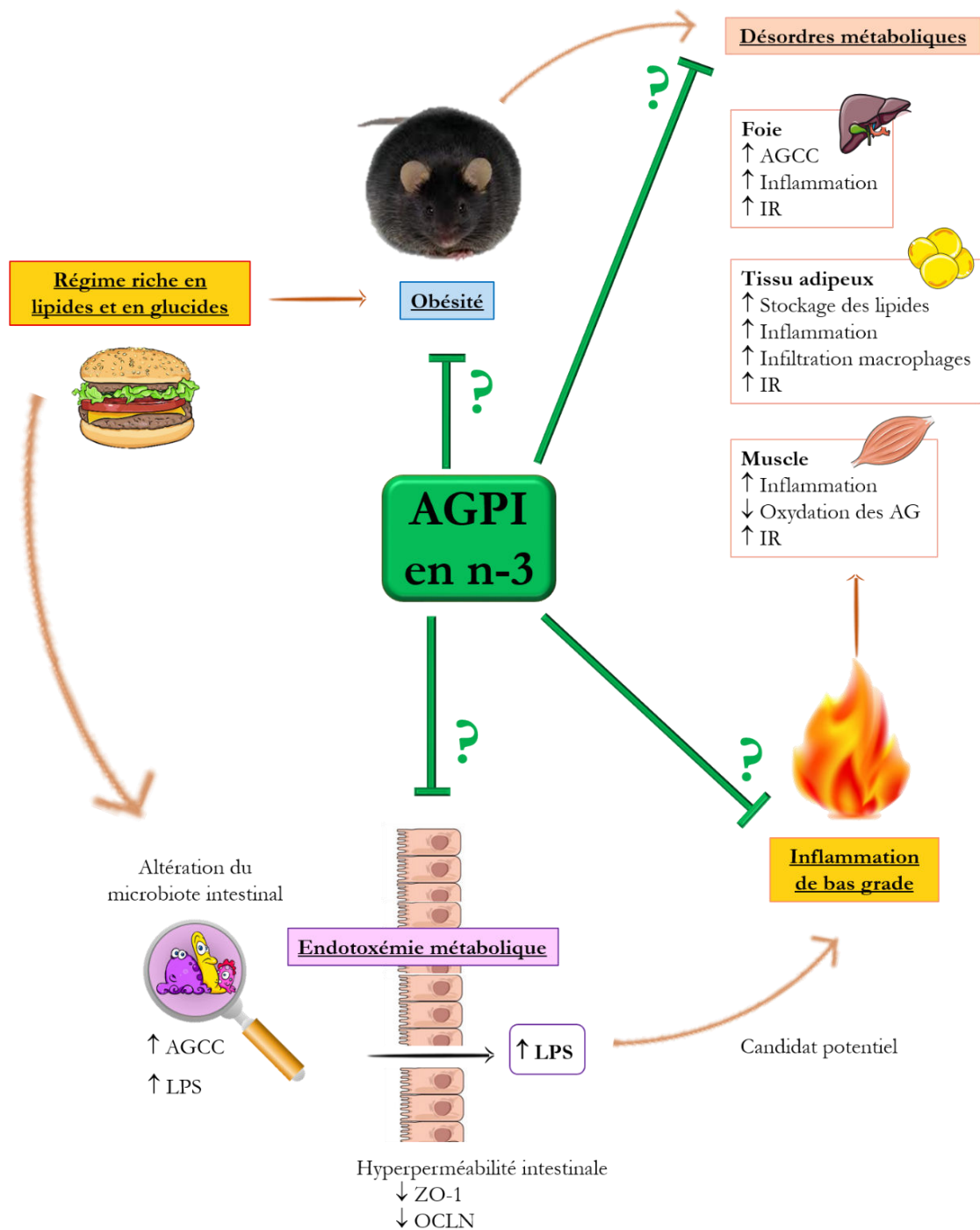


Figure 23 Hypothèses de travail proposées quant aux rôles des AGPI en n-3 sur l'obésité

Les AGPI en n-3 agiraient sur l'endotoxémie métabolique via le microbiote intestinal, et la perméabilité intestinale. Les AGPI en n-3 agiraient sur l'inflammation de bas grade et les maladies métaboliques associées. (AGCC : acides gras courte chaîne ; LPS : lipopolysaccharide ; ZO-1 : Zonula Occludens-1 ; OCLN : Occludine ; IR : insulino-résistance)



Afin de répondre à ces objectifs, deux études nutritionnelles chez la souris et une étude *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine colique Caco-2/TC ont été mises en œuvre.

Dans un premier temps, le rôle des AGPI en n-3 dans la prévention de l'obésité alimentaire et des désordres métaboliques associés ont été étudiés chez des souris sauvages et transgéniques fat-1 soumises durant 18 semaines à un régime obésogène (high-fat/high-sucrose, Research diet, D12451) comparativement à des souris nourries avec un régime témoin (Research diet, D12450B). Lors de cette étude nutritionnelle, le rôle des AGPI en n-3 dans la prévention des altérations du microbiote intestinal, de l'hyperperméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique a été exploré. En complément, une étude *in vitro* des effets spécifiques d'AGPI en n-3 sur le maintien de la fonction barrière épithéliale et la réduction de la réponse inflammatoire a été effectuée sur des cellules humaines coliques Caco-2/TC7, cultivées en présence ou non de LPS.

Dans un deuxième temps, une étude de transplantation croisée de matière fécale entre des souris sauvages et transgéniques fat-1 a été réalisée afin de confirmer l'implication directe du microbiote des souris présentant un enrichissement endogène tissulaire en AGPI en n-3 dans la prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés.

# ARTICLE DE THÈSE

**Remodeling gut microbiota by n-3 fatty acids  
prevents high fat/high sucrose diet-induced metabolic endotoxemia  
and associated metabolic disorders.**

Bidu C.1,2,3, Bellenger S.1,2,3, Spor A.5, Galan M. 6, Geissler A.7, Dardevet D.8,9, Morio-Liondor B.10, Cani PD.11, Lagrost L.2,3,4, Narce M.1,2,3, Bellenger J.1,2,3

1 Université de Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR U866, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France.

2 INSERM, Lipides Nutrition Cancer UMR U866, F-21000 Dijon, France.

3 LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France

4 UFR Médecine, Université de Bourgogne, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21078 Dijon Cedex, France

5 INRA, UMR 1347, Agroécologie, F-21065 Dijon Cedex, France.

6 INRA–UMR 1062 CBGP (INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro), 755 avenue du Campus Agropolis CS 30016, F-34 988 Montferrier-sur-Lez, France

7 INSERM UMR866, IFR100 Imagerie Cellulaire Histologie CellImap, Faculté de Médecine et Pharmacie, F21000 Dijon, France

8 Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

9 INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

10 INRA, UMR 1397, CarMeN Laboratory, Lyon 1 University, INSERM U1060, INSA of Lyon, Rockefeller and Charles Merieux Lyon-Sud Medical Universities, Lyon, France

11 Université Catholique de Louvain, Walloon Excellence in Life Sciences and BIOTEchnology, Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, 9 Av. E. Mounier, 73, B1.73.11, 1200 Brussels, Belgium.

Corresponding author: Jérôme BELLENGER,  
Centre de Recherche Inserm/uB UMR 866  
Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne,  
6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

Tel: +33 3 80 39 38 57 – Fax: + 33 3 80 39 63 30

E-mail: [jerome.bellenger@u-bourgogne.fr](mailto:jerome.bellenger@u-bourgogne.fr)

## ABSTRACT

**Objectives** Obesity is now widely recognized to be associated with low-grade systemic inflammation. It has been shown that high-fat feeding modulates gut microbiota which strongly increased intestinal permeability leading to lipopolysaccharide absorption causing metabolic endotoxemia that triggers inflammation and metabolic disorders. Furthermore, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), have been shown associated with antiobesity properties. We then aimed to investigate the metabolic impact of endogenous n-3 PUFA-enrichment on high fat/high sucrose (HFHS)-fed mice and to determine whether its consequent antiobesity effects are related to modulations of gut microbiota and intestinal permeability.

**Design** Fat-1 transgenic mice and their wild-type littermates were fed either a control or a HFHS diet for 18 weeks. Intestinal permeability and consequent metabolic endotoxemia were evaluated, and gut microbiota composition was assessed by analyzing 16S rRNA gene sequences *via* Illumina MiSeq sequencing.

**Results** Under diet-induced obesity conditions, n-3 tissue-enrichment in fat-1 animals was found to lower intestinal permeability and to alleviate metabolic endotoxemia. Moreover, whether under control or diet-induced obesity conditions, fat-1 mice showed a much higher abundance of the mucin-degrading bacterium *Akkermansia* than wild-type. In addition to these data, fat-1 mice were found to prevent HFHS-induced weight gain and visceral obesity, and associated metabolic disorders as glucose intolerance and hepatic steatosis. Strikingly, after reciprocal fecal transplant, fat-1 mice's fecal microbiota exerts protecting effect against diet-induced obesity : decreased weight gain, improved whole-body glucose tolerance and decreased gut permeability.

**Conclusion** By remodeling gut microbiota, n-3 PUFAs improve HFHS-diet induced features of the metabolic syndrome which in turn affects host metabolism. Thus, increasing the gut microbiota *Akkermansia* population by appropriate n-3 PUFAs may represent a promising strategy to control or prevent metabolic diseases.

**Key words** : Obesity ; intestinal permeability ; metabolic endotoxemia ; gut microbiota ; n-3 PUFAs ; fat-1 mice

**Short running head** : Diet-induced obesity prevention by n-3 fatty acids through gut microbiota changes

## Significances of this study

### What is already known about this subject ?

- ~ Omega-3 fatty acids exert preventive effects on obesity and related metabolic disorders.
- ~ A high fat diet disrupts intestinal microbial community.
- ~ The gut microbiota composition plays a key role on host energy homeostasis by modulating energy balance, glucose metabolism and the low-grade inflammatory state associated with diet-induced obesity.

### What are the new findings ?

- ~ Under diet-induced obesity conditions, transgenic fat-1 mice exhibited enhanced jejunal tight junction protein expression and lower intestinal permeability
- ~ N-3 tissue enrichment prevented the high fat/high sucrose-induced increase in circulating lipopolysaccharide (*ie*, metabolic endotoxemia)
- ~ Endogenous n-3 PUFAs were associated with a great shift in the gut microbiota of mice by strikingly increasing the relative abundance of the mucin-degrading bacterium *Akkermansia*

### How might it impact on clinical practice in the foreseeable future ?

- ~ Our findings provide strong evidence that nutritional manipulation of the gut microbiota by n-3 fatty acid administration may improve metabolic profile in obese patients.
- ~ *Akkermansia* may become an interesting biomarker for the positive impact of n-3 PUFAs in nutritional interventions for health.

## INTRODUCTION

Obesity being a worldwide epidemic disease, efforts still need to be done to identify host and environmental factors that would prevent or curb this multifactorial pathology. Obesity is also associated with increased risk of developing chronic morbidities such as insulin resistance (IR) [1] and dyslipidemia which constitute the main component of the metabolic syndrome [2]. Nowadays, it is widely recognized that metabolic syndrome is associated with low-grade systemic inflammation, identified as a key factor in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders [3-5], even if the molecular origin of such inflammation is not fully elucidated [4]. Cani and co-workers [6] have identified bacterial lipopolysaccharides (LPS), a major component of the outer membrane in Gram-negative bacteria, as a triggering factor of metabolic endotoxemia when it translocates in the bloodstream, which has been associated with an increased risk of obesity and clinical diabetes [7].

Increased fat and energy intake has been found to be strongly correlated with increase of plasma LPS concentration and of high-fat diet-induced endotoxemia, which was coupled with increased expression of Toll-like receptor (TLR) 4 and NF- $\kappa$ B [6]. Although the reasons for its change in plasma during high-fat feeding are not fully understood, LPS level was closely correlated with intestinal microbiota dysbiosis during high-fat feeding in mice [8] and human [9]. In addition, it has been shown that the modulation of gut bacteria after high-fat diet strongly increased intestinal permeability by reducing the expression of genes coding for the tight junctions Zonula-Occludens 1 (ZO-1) and occludin [6]. Obesity induces an imbalance in bacterial composition (*Bacterioides/Firmicutes* ratio) of the microbiota (dysbiosis), altering the intestinal permeability [10] and then increasing LPS translocation in the bloodstream through TLR4 [8]. Next, LPS induces fat accumulation in liver and adipose tissue, triggers inflammatory cytokine expression and causes insulin resistance [8]. Such a central role of LPS in the pathogenesis of metabolic syndrome is also supported by the fact that : mice invalidated for TLR4 are resistant to high fat diet-induced inflammation, obesity, and insulin resistance [11], mice invalidated for CD14 gene (a TLR4 co-receptor) are resistant to the development of LPS-induced inflammation, compared with wild-type (WT) mice [8].

Studies on the effects of n-3 PUFAs on gut integrity have evidenced that dietary n-3 PUFAs reduced clinical colitis and colonic immunopathology by enhancing epithelial barrier function in animal models [12, 13]. EPA has been shown to up-regulate the expression of tight junctions and increase the transepithelial electrical resistance (TER), thus reducing the permeability of the endothelial cells [14]. Moreover, supplementation in DHA could lessen the severity of chronic

inflammatory bowel disease probably by reducing immune cell activation and enhancement of the epithelial barrier. Nevertheless, very few studies evaluating the impact of n-3 fatty acids on endotoxemia are available. Mani and co-workers [15] have shown in pigs that post-prandial endotoxemia was decreased by fish oil supplementation when it was increased by coconut oil (rich in saturated fatty acids).

Moreover, supplementation with n-3 PUFAs attenuated the decrease of the *Bacteroides/Firmicutes* ratio during high fat feeding in mice [16] and EPA and DHA seemed to preserve intestinal barrier integrity by reducing permeability-induced inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IL4 [17, 18]. In agreement it has been shown that, following intravenous injections of LPS *E. coli* to animal models, dietary DHA supplementation significantly enhanced the expression of intestinal tight junction as occludin and claudin-1 and decreased intestinal expression of TLR4 [19]. Recent studies suggested that n-3 PUFAs may influence the content of gut microbiota [19-21] when another study showed no prevention of gut microbiota dysbiosis in EPA- and DHA-treated mice [22]. Finally, a just recently published paper showed that mice fed a diet high in n-6 PUFAs exhibit higher levels of metabolic endotoxemia and systemic low-grade inflammation, while transgenic conversion of tissue n-6-to-n-3 PUFAs reduces endotoxemic and inflammatory status [23].

Collectively, these data indicate that modulation of intestinal TJ barrier by n-3 PUFAs remains not fully understood and ability of n-3 PUFAs to decrease LPS-induced permeability still needs to be determined and more particularly under diet-induced obesity (DIO) conditions. In addition, it is difficult to verify the contribution of specific n-3 PUFAs *per se*, without potential confounding effects of other dietary components. Therefore, an innovative animal model that overcomes the use of dietary manipulation would be helpful for avoiding any confounding dietary elements brought by diets.

Thereby, fat-1 transgenic mice ubiquitously express a *C. Elegans* gene, encoding a n-3 fatty acid desaturase able to catalyze the conversion of n-6 to n-3 PUFAs [24]. These mice exhibit a remarkable lower n-6-to-n-3 PUFA ratio in their tissues compared to WT. Such animals were used in the present study to 1) evaluate the mechanisms involved at the intestinal level in obesity prevention in terms of permeability and endotoxemia alleviation and 2) investigate whether diet-induced obesity prevention observed in fat-1 mice is related to a gut microbial community modulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin, fetal bovine serum (FBS), glutamine, antibiotics were purchased from PAA Laboratories. All purified fatty acids (OA, LA, DHA, as oleic, linoleic, and docosahexaenoic acids respectively), lipopolysaccharide – LPS - (055 :B5) and fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran 4kDa) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The antibody raised against zonula occludens-1 was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Radioactive substrate, 2-deoxy-d [<sup>3</sup>H] glucose was purchase from Perkin Elmer (Waltham, MA).

### Animals

All procedures followed institutional guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee of the University of Burgundy. Transgenic fat-1 mice were generated as described previously [24] and backcrossed onto a C57BL/6J background. Male fat-1 homozygous transgenic mice and nontransgenic littermate controls (12 to 16 weeks old) were used in this study. For that, we developed a fat-1 genotyping strategy (see additional material) which allows us to quickly discriminate by semi-quantitative PCR homozygous, heterozygous and WT littermate animals (figure 1S). Animals were maintained from the weaning up to the start of the experiment on a 10 % safflower oil diet (SSNIFF, Germany) *ad libitum* and housed in temperature- and humidity-controlled conditions with a 12-h light/dark cycle, under pathogen-free conditions. The diet contained (g/100 g diet) 4.5 sucrose, 18.6 casein, 50 corn starch, 0.3 DL-methionine, 7 mineral mix, 1 vitamin mix, 8.6 cellulose and 10 safflower oil. Safflower oil is high in linoleic acid (18 : 2 n-6) with very little n-3 fatty acids (less than 0.1 % of the total fat supplied). Animals were fed a control (CTL) diet (research diet D12450B) *versus* high-fat /high-sucrose (HFHS) diet (research diet D12451) *ad libitum* for 18 weeks. The CTL diet and the HFHS diet contained respectively 20 % protein, 10 and 45 % fat, and 70 and 35 % carbohydrates, expressed as percentage of total energy. The n-6 to n-3 ratio was 7.8 for the control diet and 12.1 for the HFHS diet. Body mass was recorded weekly. After 16 weeks of diet, an oral glucose tolerance test was performed. Body composition (fat mass and lean mass) was measured on week 1 and 17 by EchoMRI (Echo Medical Systems; Houston, TX). Intestinal permeability was assessed by FITC-Dextran 4kDa flux at week 17. At the end of the nutritional study (week 18) mice were killed, blood



collected by lethal intracardiac puncture for LPS, glucose and insulin quantification and liver, adipose tissue, jejunum and cecal content were collected and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

## **Cell culture and treatments**

Caco-2/TC7 cells [25], were routinely grown as a monolayer in plastic flasks at a density of  $10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured in DMEM containing 4.5 g/L D-glucose and 2 mM L-glutamine, supplemented with 20 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/µl streptomycin at 37 °C in a modified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> in air. Cells grown to approximately 80 % confluence were released by trypsinization and subcultured at a density of  $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on polycarbonate filters with a pore size of 0.4 µm (Transwells, 12 mm diameter, Corning Incorporated, NY USA) for paracellular permeability experiments.

Fatty acids (FA) used in cell culture experiments were diluted in 100 % ethanol, combined to lipid-free bovine serum albumin (BSA) and used at 100 µM final concentrations in the culture medium. In the control group, the medium consisting only of FA solvent and BSA was used to ensure the same concentration of ethanol in all groups. In the experimental groups, OA, LA, DHA were added to the cells on day 14 of culture in regards to our results of the time-course expression of the tight junction protein ZO-1 (data not shown). Monolayer of Caco-2/TC7 cells was pre-incubated with FA for 24 h. After pre-incubating with FA, Caco-2/TC7 cells were treated (or not) for 24 hours with LPS at 100 µg/mL final concentration diluted in a saline solution.

## **Jejunum and liver fatty acid composition**

The fatty acid composition in jejunum and liver was determined by gas chromatography as described previously [26].

## **Glucose tolerance test**

Oral glucose tolerance tests were performed after 16 weeks of diet as follows : 6-h-fasted mice were injected with glucose by gavage (2 g/kg body weight glucose, 20 % glucose solution). Blood glucose concentration was determined at 0, 15, 30, 60 and 120 min following the glucose load with a glucometer (One Touch Vita, LifeScan, Issy les Moulineaux, France) on 4 µl blood collected

from the tip of the tail vein. The area under the curve (AUC, 0-120 min) was calculated for each group of mice.

### **Effect of insulin on skeletal muscle glucose transport *in vitro***

Gastrocnemius skeletal muscles (200 mg) were dissected intact in the fiber axis for the measurement of skeletal muscle glucose transport as previously described by Dardevet *et al.* [27]. Briefly, muscles were incubated in Krebs-Heinseleit buffer pH 7.4 (120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 2mM pyruvate, 0.1 % BSA), in the absence or presence of various concentrations (0, 1, 5 and 75 nM) of insulin (Actrapid®Penfill®, Novo Nordisk, Denmark) and with 5 mM of 2-deoxy-d [<sup>3</sup>H] glucose (2-DOG : 0.5 µCi/ml). Muscles were then rinsed, blotted, weighed and digested in 1 M NaOH solution 20 min at 80 °C for radioactivity determination [27]. Muscle glucose transport was calculated by dividing the radioactivity within the gastrocnemius muscles by the specific activity of the 2-DOG into the incubation medium; it was expressed as nanomoles of 2-DOG per milligram of muscle per 15 min.

### **Histological and immunohistochemical analysis**

Samples were analyzed by CellImaP Core Facility (Faculty of Medicine, Dijon). Histological analysis was conducted on formalin-fixed, paraffin-embedded liver sections stained with Oil-Red-O (ORO) to study neutral lipid content.

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed organ sections stained with hematoxylin and eosin. Jejunums were dehydrated and included in paraffin. Paraffin blocks were sectioned (5 µm thick section, two different levels per block) and slices of jejunum were deposited onto Superfrost Plus slides.

ZO-1 (two slides per block at two different levels) immunohistofluorescence was performed using an automated Leica Bond-Max. Briefly, after dewax, antigen retrieval with EDTA (pH 9) buffer, and inhibition of endogenous peroxidases with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %), slides were saturated in BSA (3 %) in PBS for 20 min, then incubated with an avidin and biotin blockage kit (Vector Labs, SP2001) for 15 min twice. Then sections were incubated with primary antibody (anti-ZO-1 ; Cell Signaling,

D7D12, 1:100) for 1 h. The sections were then washed and incubated with secondary antibody linked to biotin (Southern Biotech, 6440-08, 1:500) for 45 min. After three washes, sections were incubated in streptavidin peroxidase (Invitrogen, T20934, 1:100) and revealed in tyramide-AlexaFluor 568 (Invitrogen, T20934, 1:100). Sections were counterstained with DAPI (Sigma, D9542, 2 µg/ml) for 10 min and rinsed. Negative controls (primary antibody omission) were included.

After processing, the sections were imaged by the Cell Observer station (Zeiss). This station is composed of an inverted motorized microscope, a mercury lamp for the fluorescence, a CCD camera (Zeiss HRm), a computer, and the AxioVision software which controls the station. Images were acquired using 10× objective; each image represents about 0.6 mm<sup>2</sup>. About three images were made by level (six images by organ). Image analysis was carried out using Visilog software. For the ZO-1 surface, images were threshold, binarized, and surface measurement of the binarized images was done. These surfaces were divided by the number of nuclei present in each image. This number was found by determining the mean area of a nucleus.

## **Real-Time Quantitative PCR.**

Total RNA was isolated from tissues using Tri-Reagent (Euromedex, France). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, USA) and random primers at 42 °C for 1 h. Quantitative PCRs were performed using StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, France). Primer sequences for the targeted human and mouse genes are available upon request. The mRNA expression level of target genes was normalized to levels of β-actin mRNA and the results were expressed as relative expression levels. The data were quantified by the method of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## **Western blot analysis**

Frozen jejunums were ground to a fine powder under liquid nitrogen and transfer in RIPA protein lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate and 1 % Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Proteins (80 µg) were separated by 10 % SDS-PAGE and electroblotted to Protran nitrocellulose membranes (Whatman, Dassel, Germany). After blocking nonspecific

binding sites with 5 % BSA in Tris-buffered saline - TBS - (0.1 % Tween-20 in TBS), blots were probed overnight at 4 °C with primary antibody against ZO-1 (Cell signaling, Ozyme), and  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a concentration of 1/1,000, and 1/5,000 respectively, washed in Tween-TBS (T-TBS), and incubated for 1 hour at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG for all the antibodies, except  $\beta$ -actin was incubated with goat anti mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Detection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting analysis procedure (ECL Plus; Amersham, Freiburg, Germany).

## **Determination of intestinal permeability**

The *in vitro* intestinal paracellular permeability across cell monolayers was determined by measuring the flux of FITC-Dextran 4 kDa. One mg/ml of FITC-Dextran 4 kDa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added to the apical compartment and cells were incubated for 1 hour at 37 °C. After incubation, the basolateral medium was removed and fluorescence was determined using a fluorescence spectrophotometer at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm respectively.

The *in vivo* intestinal permeability is also based on the intestinal permeability of FITC-Dextran 4 kDa. Briefly, 6-h-fasted mice were injected with FITC-Dextran 4 kDa by gavage (600 mg/kg body weight, 120 mg/ml). After 4 hours, 120  $\mu$ l of blood were collected from each mouse anesthetized by isofluran (TEM, Bordeaux, France) from the retro-orbital vein. The blood was centrifuged at 4 °C, 6,500 rpm, for 10 minutes. Plasma was analyzed for FITC-Dextran 4kDa concentration with a fluorescence spectrophotometer as mentioned above. Standard curves for calculating the FITC-Dextran 4 kDa concentration in the samples were obtained by diluting FITC-Dextran 4 kDa in non-treated plasma.

## **Plasma LPS quantification**

LPS concentrations were assayed in total serum by using a recently published method developed in our laboratory based on the direct quantitation of 3- $\beta$ -hydroxymyristic acid by HPLC/MS/MS according to the general procedure previously described [28]. This new approach is a relevant method to quantitate endotoxin in a sample, and evaluate the proinflammatory potential of LPS *in vivo*.

## **Cecal microbiota analysis**

### ***Cecal DNA extraction***

Ceca were recovered quickly after the mice were killed. The contents of each intact cecum was recovered by manual extrusion and was snap frozen (- 80 °C) until use. Frozen cecal samples (~100 mg) were used for whole community DNA extraction according guidelines of the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Valencia, CA).

### ***Amplicon generation and sequencing***

DNA samples were sequenced using universal primers targeting the hyper variable region V4 of the 16S rRNA gene (251 bp) *via* Illumina MiSeq (Illumina) sequencing. We followed the method described in Kozich and coworkers [29] to perform PCR amplification, indexing, pooling, multiplexing and taxonomic identification using the SILVA SSU Ref NR 119 database as a reference (<http://www.arb-silva.de/projects/ssu-ref-nr/>).

### ***Bioinformatic analysis of the 16S rRNA amplicons***

The paired-end sequences obtained were first quality-checked and assembled with the PEAR - Paired-End read merger software [30]. The assembled sequences were then denoised and processed with the QIIME software [31]. Briefly, reference-based chimera detection was performed using greengenes representative set of 16S rRNA sequences. Sequences were then clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity using USEARCH [32]. Representative sequences for each OTU were then aligned using PyNAST [33] and their taxonomy assigned using the greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>). A phylogenetic tree was then constructed using FastTree [34].

Diversity metrics, *i.e.* Faith's Phylogenetic Diversity [35], richness (observed species) and evenness (Simpson's reciprocal index), describing the structure of microbial communities were calculated based on rarefied OTU tables. Differences in  $\alpha$ -diversity indexes were tested using ANOVAs followed by Tukey HSD tests. Unweighted and weighted UniFrac distance matrices [36] were also computed to detect global variations in the composition of microbial communities. Principal Coordinates Analyses (PCoA) were then calculated and plotted.

## **Fecal microbiota transplantation**

### ***Preparation of fecal matter***

Prior to each fecal transfer treatment, 1 g of fecal pellets were collected from 8 naïve donor mice, pooled together, and then placed in 5 ml of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; Life Technologies, Grand Island, NY). The fecal pellets were vortexed at maximum speed for 1 min. The fecal matter was then centrifuged for 3 min at 800 g and the supernatant slurry was collected and used for transplantation into mice within 30 minutes of excretion.

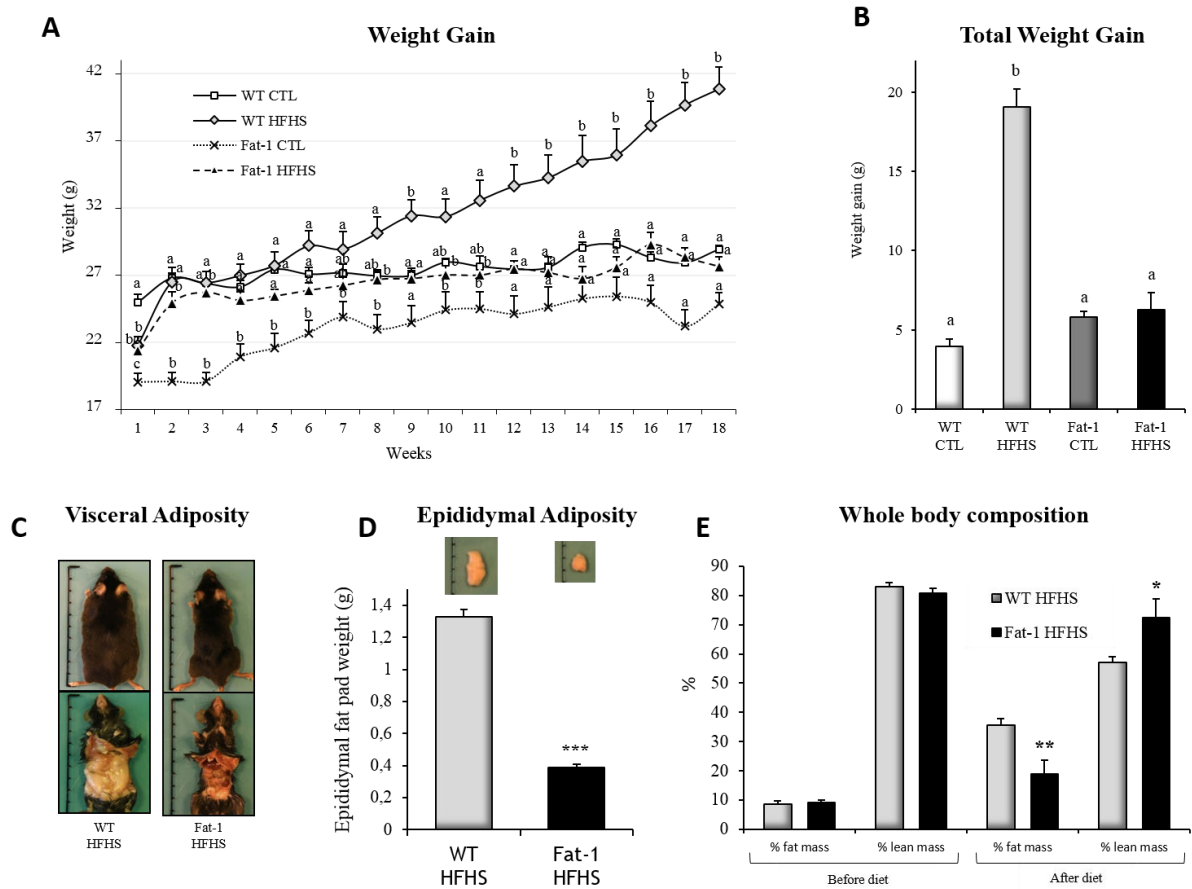
### ***Fecal transplantation***

The endogenous gut microbiota of 12 week old homozygous fat-1 transgenic and WT mice was depleted by treating with a single dose of streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The antibiotic was suspended in sterile water at 500 mg/ml and 50  $\mu$ l was placed directly in the oral cavity of each mouse. After the oral antibiotic treatment, mice were housed on raised wire flooring for 96 h to prevent coprophagy. Fecal transplants (WT to fat-1 and fat-1 to WT) were initiated 24 h later by placing 200  $\mu$ l of the donor fecal matter directly into the oral cavity of the recipient mice (n=6 per group). Control groups of mice (n=6) were given 200  $\mu$ l of transfer buffer alone. All mice received fecal transplants 24, 48, 72 and 96 hours after the streptomycin treatment. After the fourth fecal transplant, the wire flooring units were removed from the cages. Each group of mice (n=6) received a total of two additional treatments over the next 4 days.

## **Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM for each group. Statistical differences between more than two test groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison post-tests. Data with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Data with two groups were analyzed by unpaired two-tailed student T-test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.05.

## RESULTS



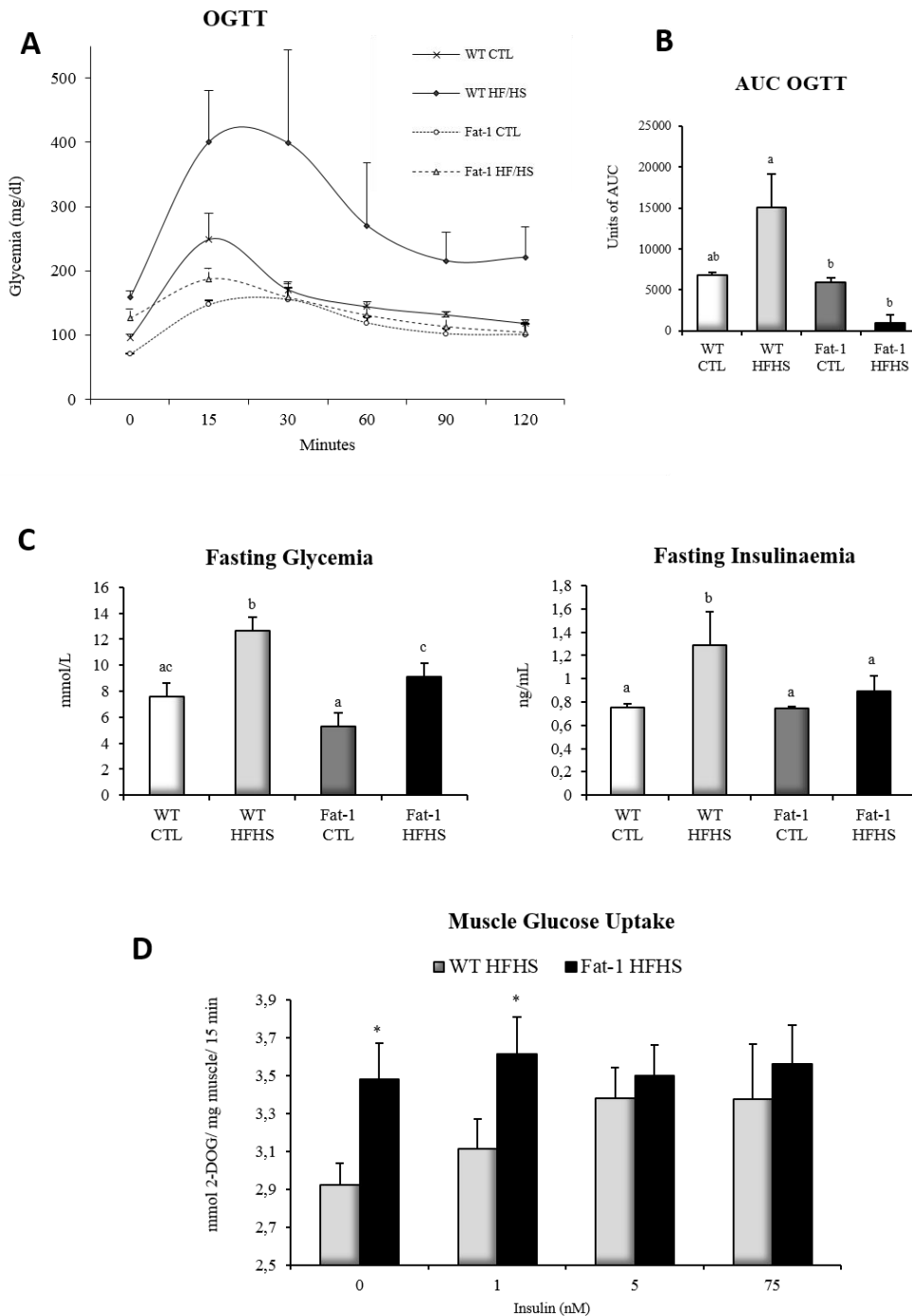
**Figure 1** *Fat-1* transgenic mice are protected from HFHS-diet-induced obesity.

Mice (WT and *fat-1* transgenic) were fed either a control or a high fat/high sucrose (HFHS) diet for 18 weeks. **A** : Weight gain curves (n=7 per group) **B** : Total weight gain. **C** : Representative photographs for a side-by-side comparison of male WT and transgenic mice fed the HFHS diet for 18 weeks. **D** : Epididymal fat mass in WT and *fat-1* mice fed HFHS diet (n=8 per group). **E** : Body composition analysis (fat mass and lean mass) of WT and *fat-1* mice before and after 18 weeks on the HFHS diet using dual-energy X-ray absorptiometry. n=10 to 12 for control and HFHS groups. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data with different superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ , according to the post hoc ANOVA statistical analysis. \* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$  (Student's t-test). Similar results have been obtained in five independent experiments.

## **Fat-1 transgenic mice are protected from HFHS-diet-induced obesity**

As expected, intake of a HFHS diet for 18 weeks induced obesity in WT mice as evidenced by the significant increase in body weight gain (Fig 1B) and adiposity (Fig 1C, D and E). In contrast, fat-1 transgenic mice were totally protected against HFHS diet-induced obesity : their body weight remaining similar to controls (Fig 1A) and they exhibit much less adipose tissue compared to WT (Fig 1C, D and E). These huge differences of body weight gain between the two genotypes occur with no change in food intake in the HFHS diet-fed fat-1 mice when compared with HFHS diet-fed WT mice ( $3.58 \pm 0.12\text{g/day}$  versus  $3.39 \pm 0.17\text{g/day}$  in WT and fat-1 mice respectively).



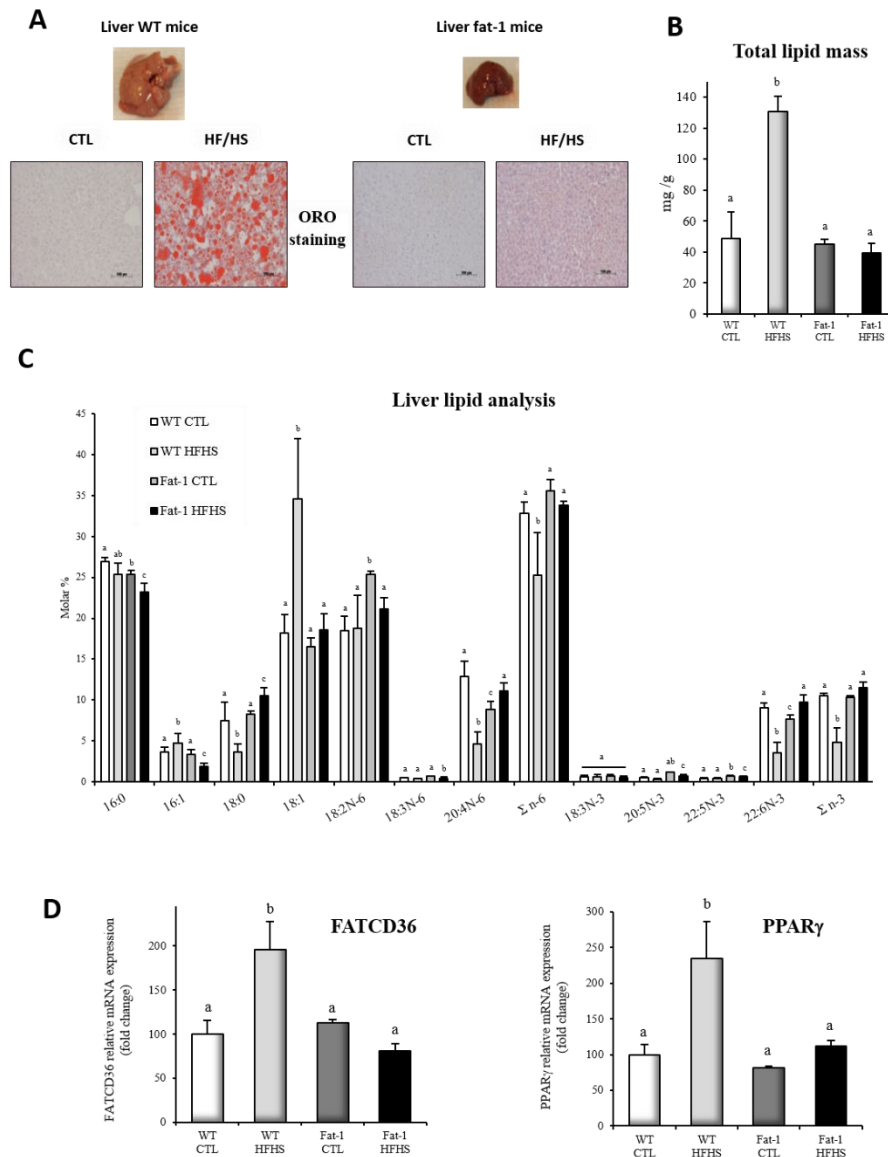


**Figure 2** *Fat-1* transgenic animals are protected against whole body glucose intolerance.

Mice were 6h fasted and an oral glucose tolerance test (**A**) was performed after gavage with glucose (2 g/kg body weight). **B** : Area under the curves for OGTTs. **C**: Animals were 12h fasted for glycemia and insulinaemia determination. **D** : Dose-response histograms of insulin-stimulated glucose transport in isolated gastrocnemius muscles from WT and transgenic mice fed a HFHS diet after an overnight food deprivation. n=4 (**A** and **B**) ; n=8 (**C**); n=6 (**D**). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data with different superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ , according to the post hoc ANOVA statistical analysis. \* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$  (Student's t-test). Similar results have been obtained in five independent experiments.

## **Fat-1 transgenic animals are protected against whole body glucose intolerance**

Along with adiposity, it is known that HFHS feeding has deleterious effects on glucose homeostasis [37, 38]. This is evidenced in our study where the HFHS-diet fed WT mice exhibit a severe whole body glucose intolerance indicated by a much higher 15 min peak and a larger area under the curve in response to a bolus glucose injection in the OGTT than the ones of the control diet-fed mice (Fig 2A, B). This glucose intolerance is supported by an increased fasting glycaemia and insulinemia (Fig 2C). In contrast, fat-1 transgenic mice were totally protected against whole body glucose intolerance induced by the HFHS diet as evidenced by the fact that, in response to a bolus of glucose, the area under the curve of the HFHS-diet fed fat-1 mice was statistically comparable to the one of the controls (Fig 2B). Moreover, their fasting insulin and glucose levels remained similar to the levels of the control diet-fed WT mice. In relation to this large whole-body glucose tolerance improvement observed in the fat-1, we studied the effect of insulin on skeletal muscle glucose transport *in vitro*. We show that n-3 polyunsaturated fatty acids improve glucose uptake independently of the presence of insulin because when the HFHS diet-fed WT mice exhibit an insulin-dependent muscle glucose uptake level, this one is already maximum in the HFHS-fed fat-1 mice without any insulin in the medium of incubation (Fig 2D).

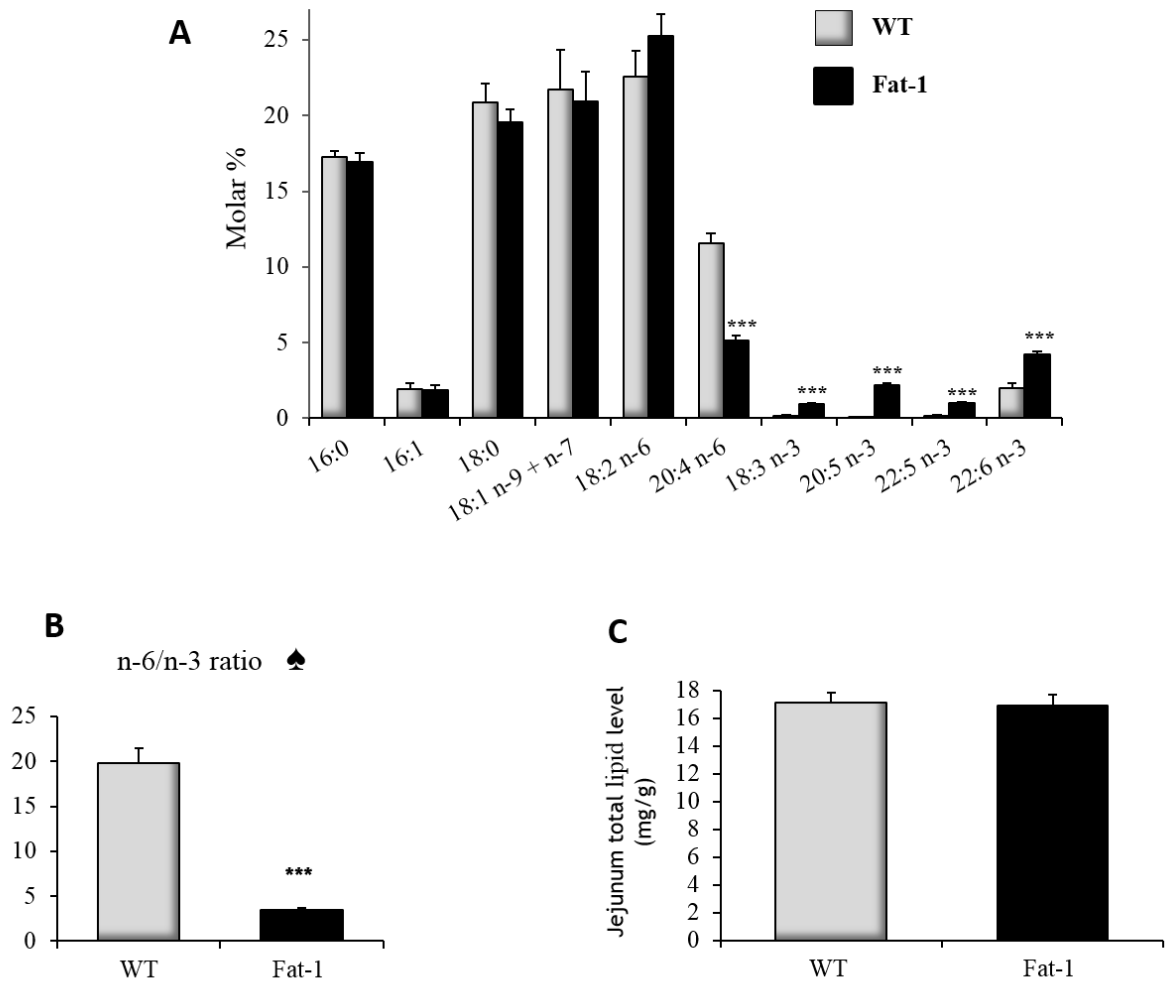


**Figure 3** *N-3 fatty acid enrichment protects fat-1 transgenic mice against HFHS-induced hepatic steatosis.*

Wild-type and transgenic animals were fed either a control or a high fat/high sucrose (HFHS) diet for 18 weeks. **A** : Representative photographs of the liver of WT and fat-1 mice and representative Oil Red O (ORO)-stained liver sections analysis (n=8 per group). **B** : Liver total lipid levels in animals fed either control or HFHS diet. **C** : Liver major fatty acid composition, total n-6 and total n-3 are indicated for WT and fat-1 mice fed with control or HFHS diets (n=8). **D** : Hepatic FATCD36 and PPAR $\gamma$  mRNA levels were measured by qRT-PCR. All mRNA levels were normalized relative to  $\beta$ -actin (n=10). The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data with different superscript letters are significantly different at P<0.05, according to the post hoc ANOVA statistical analysis. FATCD36 : Fatty acid transporter cluster of differentiation 36 ; PPAR $\gamma$  : peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Similar results have been obtained in five independent experiments.

## **N-3 fatty acid enrichment protects fat-1 transgenic mice against HFHS-induced hepatic steatosis**

Since nonalcoholic fatty liver disease is positively associated with the development of obesity, insulin resistance, and ultimately type 2 diabetes mellitus, it is often regarded as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. Remarkably, histological analysis after an Oil Red O staining indicates very few and small lipid droplets in HFHS-fed fat-1 mice (Fig 3A) when, as expected, an accumulation of large and numerous lipid droplets was observed in HFHS-fed WT mice. These histological observations were confirmed by a severe hepatic steatosis in HFHS-fed WT mice as depicted by the representative liver pictures (Fig 3A) and measurement of hepatic lipid level which is 3-fold increased; in contrast, hepatic lipid levels of all transgenic mice remained similar to those of the WT control mice (Fig 3B). When feeding the HFHS diet, the WT mice present a 2-fold increase of oleic acid level (a marker of hepatic steatosis) when its level in the HFHS-fed fat-1 mice remains similar to controls (Fig 3C). Moreover, in accordance with this liver steatosis prevention, the mRNA expressions of FATCD36 (a fatty acid transport protein) and PPAR $\gamma$  (an adipogenic marker) remain comparable to controls in the liver of HFHS-fed fat-1 mice when they were 2 and 2.5-fold enhanced respectively in the HFHS-fed WT mice (Fig 3D).

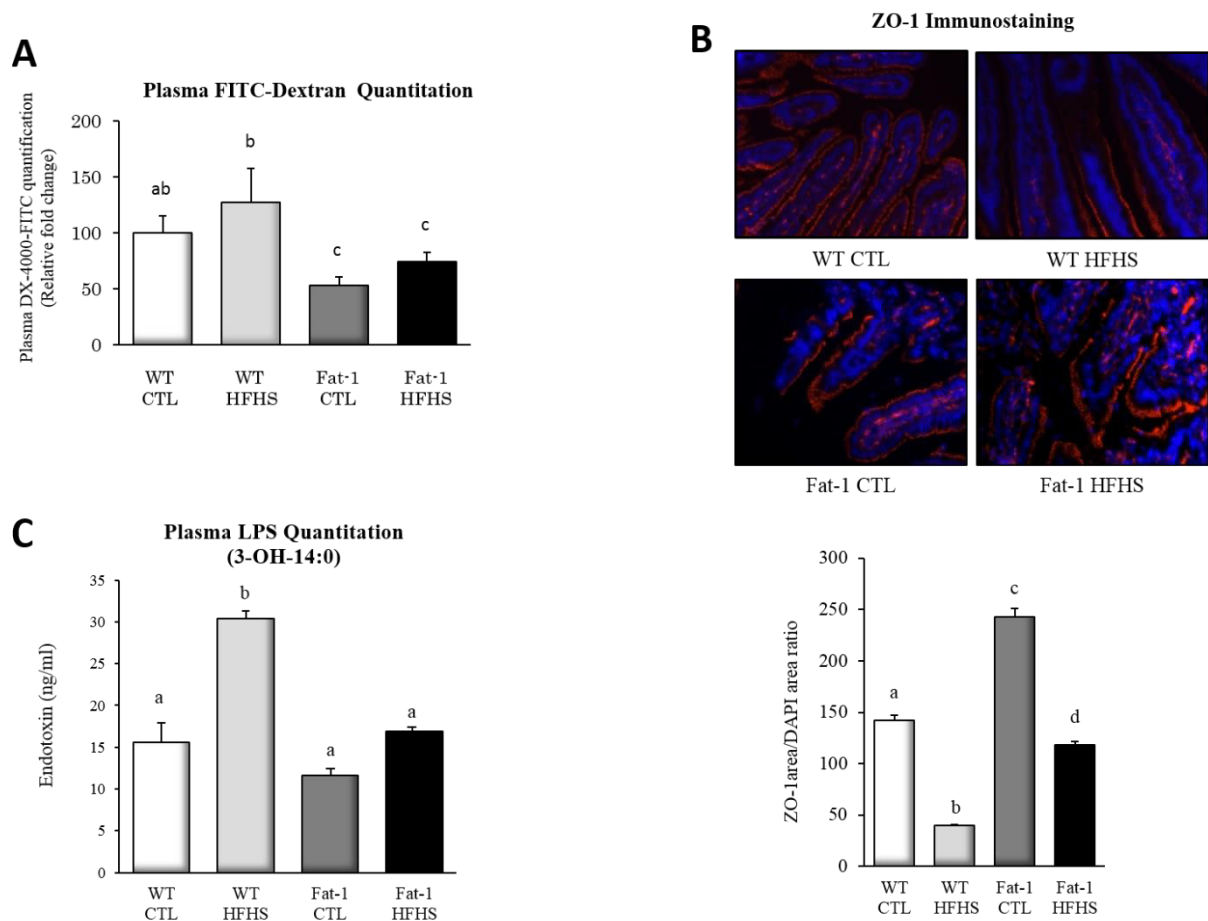


**Figure 4 Jejunum n-3 fatty acid enrichment and total lipid level.**

**A** : Jejunum major fatty acid composition, total n-6 and total n-3 for WT and fat-1 transgenic mice fed with the 10 % safflower oil diet (mean  $\pm$  SEM). **B** : Jejunum fatty acid ratios in WT and fat-1 mice fed with the 10 % safflower oil diet. **C** : Jejunum total lipid level in WT and fat-1 animals. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$  (Student's t-test);  $n = 5$  per group. ♠ The n-6/n-3 ratio is given by  $(18:2 \text{ n-6} + 20:4 \text{ n-6} + 22:4 \text{ n-6} + 22:5 \text{ n-6}) / (18:3 \text{ n-3} + 20:5 \text{ n-3} + 22:5 \text{ n-3} + 22:6 \text{ n-3})$ .

## **Jejunum n-3 fatty acid enrichment and total lipid level**

Fatty acid composition of jejunum total lipids of a 10 % safflower oil diet-fed mice (Fig 4A) revealed higher levels of alpha-linolenic acid (ALA, 18:3 n-3), EPA (20:5 n-3), docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-3) and DHA (22:6 n-3) in fat-1 transgenic animals compared with WT mice, whereas arachidonic acid (AA, 20:4 n-6) was decreased by 70 %. In addition, the ratio of n-6 PUFA to the long chain n-3 PUFA (Fig 4B) was drastically reduced ( $P < 0.01$ ) in jejunum from fat-1 mice ( $3.46 \pm 0.25$ ), compared with WT animals ( $19.8 \pm 3.43$ ) despite the animals being fed the same diet. These data indicate that expression of the fat-1 gene enriches the jejunum of the transgenic animals in n-3 PUFAs at the expense of the n-6 PUFAs, giving a more balanced n-6 to n-3 ratio, when jejunum total lipid level remained unchanged in both genotypes (Fig 4C).



**Figure 5** *N-3 PUFAs protect fat-1 mice from intestinal epithelial barrier dysfunction, tight junction protein impairment and reduce metabolic endotoxemia.*

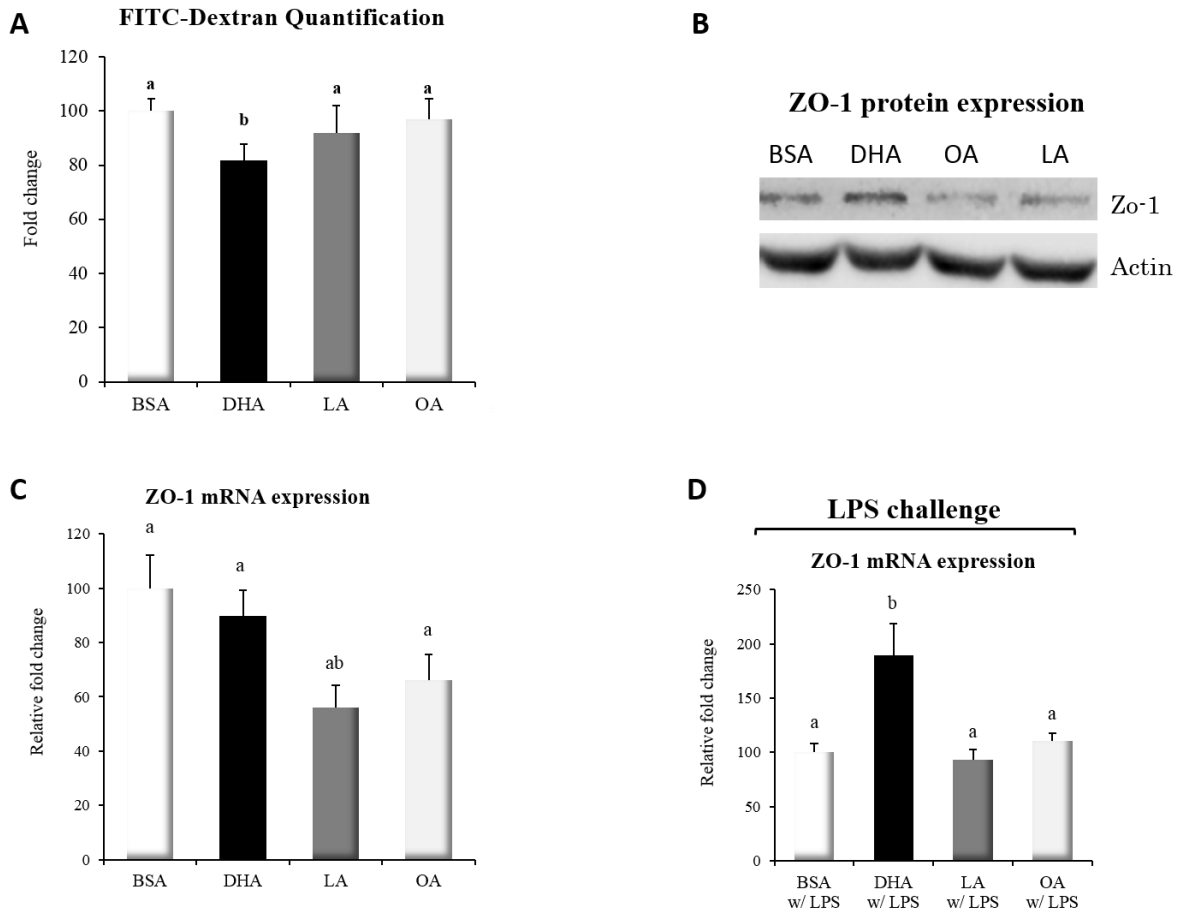
**A** : Intestinal permeability assay: plasma FITC-Dextran oral challenge was measured in WT and fat-1 mice fed a control or a HFHS diet for 17 weeks. **B** : Representative immunofluorescence staining for ZO-1 in the jejunum of WT and fat-1 mice fed a control or a HFHS diet for 18 weeks, and ZO 1 immunostaining quantification of WT and fat-1 mice presented as ZO-1 area/DAPI area ratio. **C** : Direct plasma quantitation of 3- $\beta$ -hydroxymyristic acid concentration by gas chromatography-mass spectrometry in WT and fat-1 mice fed with a HFHS for 18 weeks (n=8 per group). Data are means  $\pm$  SEM. Data with different superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ , according to the post hoc ANOVA statistical analysis. CTL, control diet ; HFHS, high fat/high sucrose diet ; ZO-1, Zonula Occludens-1 ; FITC, fluorescein isothiocyanate ; LPS, lipopolysaccharide ; 3-OH-14:0 : 3- $\beta$ -hydroxymyristic acid.

### **N-3 PUFAs protect fat-1 mice against intestinal epithelial barrier dysfunction, tight junction protein impairment and reduce metabolic endotoxemia**

As a putative link between obesity, insulin-resistance and low-grade systemic inflammation has already been mentioned, we then hypothesized that protection of the fat-1 mice against diet-induced obesity and related metabolic disorders could occur through prevention of epithelial barrier dysfunction and endotoxemia. Dextran flux, an indicator of epithelial paracellular permeability to uncharged macromolecules and tight junction protein immunostaining was employed to assess barrier function.

We first evidenced that fat-1 CTL mice exhibit a 50 % decrease of intestinal permeability compared with WT CTL mice. After 17 weeks of a HFHS diet, a higher flux of 4 kDa FITC-Dextran was observed in WT mice than, when the one of the fat-1 transgenic animals was not affected by the diet and remains in both control and HFHS groups lower than in the WT animals fed the control diet (Fig 5A). These data suggest that the jejunum n-3 PUFAs-enrichment in fat-1 mice is capable of dampening intestinal epithelial barrier dysfunction induced by a HFHS diet. It has been reported that the alteration of tight junction protein expression is involved in the intestinal barrier disruption caused by a diet-induced obesity [6, 39]. Thus, we investigated, in the jejunum, the effect of high n-3 tissue content in fat-1 mice of immunofluorescence and the total protein expression of the tight junction protein ZO-1. Our results show that ZO-1 immunostaining is 70 % higher in the fat-1 CTL mice than in the WT CTL. Moreover, 18 weeks of a HFHS diet decreased by 70 and 50 % the jejunum ZO-1 immunofluorescence in the WT and fat-1 mice respectively, but the ZO-1 immunostaining quantified in the fat-1 HFHS mice remains very close to that of the WT control diet-fed mice (Fig 5B). Altogether, these results highlight that intestinal enrichment in n-3 fatty acids protects transgenic animals from HFHS diet-induced tight junction protein disruption. It has been observed that increased intestinal permeability leads to translocation of inflammatory molecules such as lipopolysaccharides across the gut wall, when they then act as continuous triggers for low level systemic inflammation called endotoxemia [6, 8]. We then quantified the plasma LPS level and found that, compared to the WT HFHS-fed mice, n-3 enrichment in fat-1 mice was associated with reduced metabolic endotoxemia to be similar to that of the WT control animals (Fig 5C).



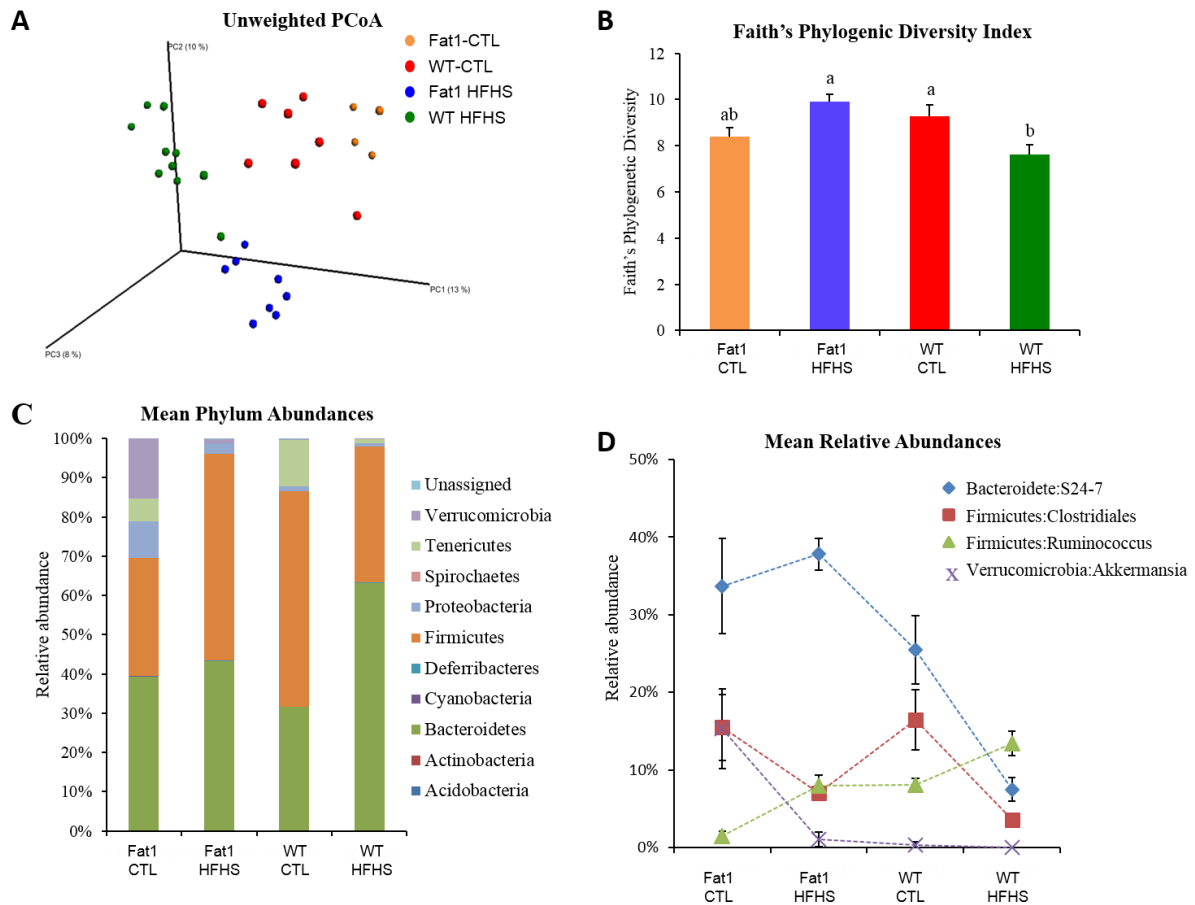


**Figure 6** Effects of unsaturated fatty acids *Caco-2* enriched cells on barrier integrity and tight junction expression.

Effect of fatty acids on FITC-Dextran permeability (**A**), ZO-1 protein and mRNA expression (**B** and **C** respectively) and ZO-1 mRNA expression after LPS challenging in *Caco-2* monolayer cells (**D**). Cells were treated with 100  $\mu$ M of OA, LA or DHA for 24h, with or without 100 g/ml of LPS for 24h, and BSA treatment served as control. The results are means  $\pm$  SEM. Mean values with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ , according to the post hoc ANOVA statistical analysis. FITC-Dextran : Fluorescein Isothiocyanate-Dextran ; ZO-1 : Zonula Occludens-1 ; LPS : lipopolysaccharide ; OA : oleic acid ; LA : linoleic acid ; DHA : docosahexaenoic acid ; BSA : bovine serum albumin.

## **Effects of unsaturated fatty acids Caco-2 enriched cells on barrier integrity and tight junction expression**

In order to extend and reinforce the *in vivo* effects of n-3 fatty acids on intestinal barrier function, we adopted an *in vitro* model in which human colonic Caco-2/TC7 epithelial cell monolayers (a subclone of Caco-2 cells validated for *in vitro* permeability assessment) were treated for 24h with 100  $\mu$ M of DHA or linoleic acid (LA, a n-6 PUFA) or oleic acid (OA, a monounsaturated FA) used as control alone or with 100  $\mu$ g/ml of LPS for 24 additional hours. As shown in Fig 6A, DHA decreased by 20 % paracellular permeability to 4 kDa FITC-Dextran in Caco-2/TC7 monolayers when no statistical difference was observed with the other FA. This preserved barrier integrity observed with DHA could be related to the fact that DHA also maintains tight junction ZO-1 protein and mRNA expressions (Fig 6B and C respectively) in our Caco-2/TC7 experimental conditions. It has recently been demonstrated that LPS induced epithelial barrier dysfunction and decreased the expression of tight junction proteins in Caco-2 monolayers [40, 41]. Moreover, studies have demonstrated a correlation between an increase in intestinal permeability and plasma LPS level. We then tested the effects of LPS on the mRNA expression encoding for ZO-1. Our results showed that DHA could increase the expression of this tight junction protein when Caco-2/TC7 cells were challenged with LPS. These results indicate that DHA treatment protects the Caco-2/TC7 monolayer barrier against tight junction breakdown and has beneficial effects on paracellular permeability. Then, these *in vitro* data support the observed *in vivo* protective effect of n-3 PUFA on intestinal epithelial barrier dysfunction under diet-induced obesity conditions.

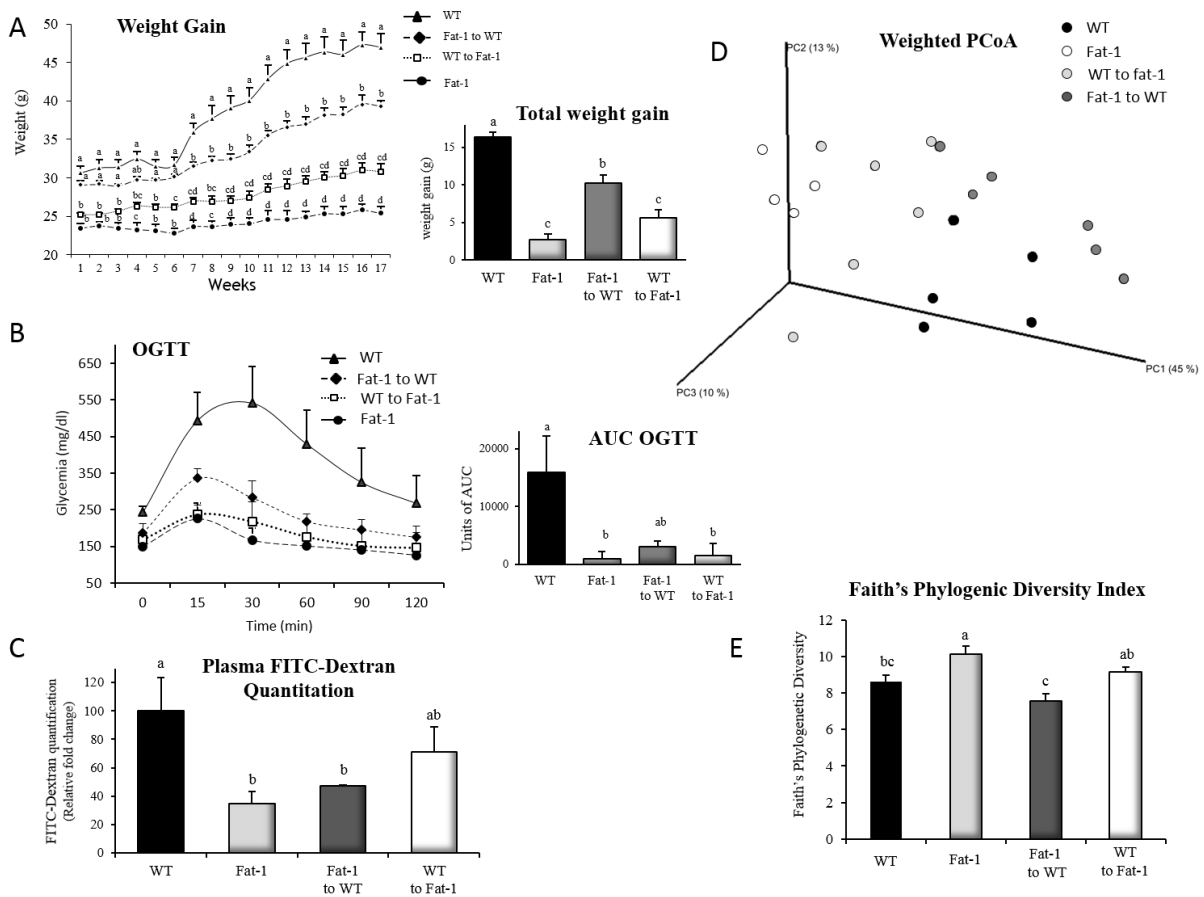


**Figure 7** *N-3* fatty acid enrichment affects the proportion of different phyla in *fat-1* transgenic mice.

**A** : Principal coordinates analysis of the unweighted UniFrac distance matrix. Orange, mauve, red and violet dots represent wild-type (WT) mice to the control (CTL) diet, Fat-1 mice (Fat-1) to the CTL diet, WT mice to the Diet-Induced Obesity (DIO) diet, and Fat-1 mice to the DIO diet, respectively. **B**: Variation between groups of Faith's Phylogenetic Diversity index. Groups with different letters are significantly different (Tukey HSD test,  $p < 0.05$ ). Means  $\pm$  SEM are represented. Colors are the same as in (A). **C**: Mean phylum abundances across the four treatments. Means  $\pm$  SEM are represented. **D**: Mean relative abundances of the most responding OTUs across the four treatments. Means  $\pm$  SEM are represented.

## **N-3 fatty acid enrichment affects the proportion of different phyla in fat-1 transgenic mice**

Given that we observed a prevention of metabolic endotoxemia and gut dysbiosis in fat-1 mice fed a HFHS diet and that altered gut microbiota composition contribute to the development of obesity [42], we then next used 16S rRNA sequencing to survey changes in the fecal microbiota between fat-1 and WT mice subjected to either control or HFHS diet. A Principal Coordinates Analysis (PCoA) of the unweighted UniFrac distance matrix showed drastic and significant changes (ANalysis Of SIMilarity,  $R=0.78$  ;  $p < 0.001$ ) in the composition of the fecal microbiota caused by both mice genotype and diet (Fig 7A). Shifts in composition were associated with significant changes in diversity levels (Faith Phylogenetic Diversity) also influenced by both mice genotype and diet ( $F_{1,25} = 15.9$ ,  $p = 0.001$ ). Fat-1 mice under the HFHS diet displayed a significantly higher diversity level than WT mice under the same diet (Tukey HSD test,  $p < 0.05$  ; Fig 7B). The fecal microbiota of all mice were dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes* but differences in community composition were observed at the phylum level, with fat-1 mice having a fecal microbiota enriched in OTUs belonging to the *Verrucomicrobia* phylum, especially under the control diet (Fig 7C). We also noted a strong decrease in the level of *Tenericutes* for both genotypes under the HFHS diet (Fig 7C). Using a supervised classification approach (“Nearest-Shrunken Centroid”), we identified OTUs that were particularly responsive to the interaction between mice genotype and their diet (Fig 7D). Fecal microbiota of fat-1 mice proved to be enriched in OTUs belonging to the *Akkermansia* genus, especially under the control diet, compared to WT mice. We also identified OTUs belonging to the *Ruminococcus* genus as particularly responsive to the HFHS diet for both genotypes, but with significantly lower relative abundance in fat-1 mice compared to WT mice. Members of the *Clostridiales* family seemed to be impacted by the HFHS diet, with decreasing relative abundance compared to control for both genotypes. Finally, we identified a differential response of the relative abundance of members of the S24-7 family to the diet depending on the genotype of mice. While they seemed to be unaffected by the HFHS diet in fat-1 mice, their relative abundance dramatically dropped in WT mice under the control diet.



**Figure 8** Transplantation of *fat-1* microbiota to wild-type animals decreases weight gain, improves whole body glucose tolerance and prevents intestinal permeability under HFHS diet.

After reciprocal transplantation, WT and *fat-1* transgenic mice were fed a HFHS diet for 16 weeks. **A** : Weight gain curves (n=6 per group). The inset represents the total body weight gain (g, n=6 per group). Mice were 6h fasted and an oral glucose tolerance test (**B**) was performed after gavage with glucose (2 g/kg body weight). The inset represents the area under the curve (AUC) of the four different groups. Plasma FITC-Dextran oral challenge was measured for intestinal permeability assay in WT and *fat-1* mice fed a HFHS diet for 16 weeks (**C**). **D** : Principal coordinates analysis of the weighted UniFrac distance matrix. **E** : Variation between groups of Faith's Phylogenetic Diversity index. Groups with different superscript letters are significantly different (Tukey HSD test,  $p < 0.05$ ). Fat-1 to WT : WT mice transplanted with the *fat-1* fecal microbiota; WT to Fat-1 : *fat-1* mice transplanted with the WT fecal microbiota.

## **Transplantation of fat-1 microbiota to wild-type animals decreases weight gain, improves whole body glucose tolerance and prevents intestinal permeability under HFHS diet**

In order to confirm that n-3 PUFA would exert their protective effect against diet-induced obesity and associated metabolic disorders through changes in gut microbiota composition we performed reciprocal fecal transplant before feeding the mice with a HFHS diet. As depicted in Fig 8A, we first confirmed the weight gain prevention in HFHS-fed fat-1 mice versus WT, but, more importantly, we showed that WT mice colonized with a fat-1 microbiota exhibited a significantly lower total weight gain (-40 %) over sixteen weeks than that of WT mice ( $10.2 \pm 1.1$  versus  $16.3 \pm 0.7$ g respectively). Additionally, we observed in fat-1 mice colonized with a WT microbiota, a higher total weight gain (+53 %) than in fat-1 mice ( $5.6 \pm 1.1$  versus  $2.6 \pm 0.8$ g respectively).

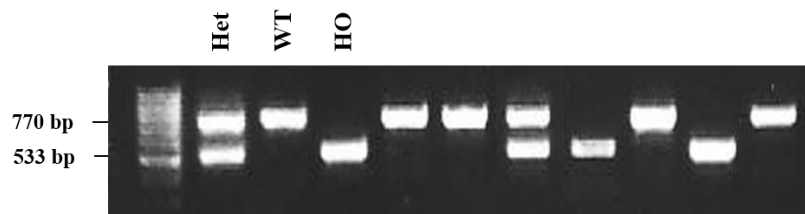
We next determined the impact of these transplantations on glucose homeostasis. Firstly, in comparison with HFHS-fed WT mice, HFHS-fed fat-1 mice showed (as expected and already shown Fig 2A, B) a decrease in the area under the curve (Fig 8B). Interestingly, compared with WT mice, fat-1 microbiota transplanted to WT mice induced a large improvement in glucose tolerance.

To further determine whether changes in the gut microbiota could be associated with modulation of gut permeability, we next measured the intestinal permeability to FITC-Dextran 4 (Fig 8C). Paracellular permeability was significantly decreased (-65 %) in HFHS-fed fat-1 mice compared with HFHS-fed WT mice. Moreover, compared with HFHS-fed WT mice, intestinal permeability was decreased by 53 % when fat-1 microbiota was transplanted to WT mice. Additionally, transplanting WT gut microbiota to fat-1 animals increased the permeability (+35 %).

We next examined changes in the fecal microbiota between the different groups. We thus used 16S rRNA sequencing of the fecal microbiota of WT and fat-1 mice under the HFHS diet, as well as WT-transplanted fat-1 mice and fat-1 transplanted WT mice under the same diet. Using PCoA of weighted UniFrac distance matrix, we detected a strong clustering of mice according to the genotype of the mice (Fig 8D) along the first axis of the PCoA plot which explains 45 % of the observed variation in fecal microbiota community composition. However, within each genotype cluster, transplanted mice differed significantly from control mice in fecal microbial composition (ANOSIM,  $R=0.47$  ;  $p<0.001$ ). When considering Faith's phylogenetic diversity, we found that the non-transplanted fat-1 mice displayed significantly higher (Tukey HSD test,  $p<0.05$ ) diversity levels than the non-transplanted WT mice under the HFHS diet (Fig 8E), as detected in the first

experiment (Fig 7B). Diversity levels of transplanted mice did not significantly differ from controls of the same genotype; however fat-1 mice transplanted with WT mice fecal content displayed significant higher levels of diversity in their feces than WT mice transplanted with fat-1 mice fecal content (Tukey HSD test,  $p < 0.05$  ; Fig 8E).

## Fat-1 genotyping (supplementary figure)



**Figure 1S Fat-1 genotyping**

*Representative picture of the genotyping exhibiting distinct amplicons for WT (770 bp) and homozygous (533bp) and both amplicons for heterozygous animals.*



## DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time that under diet-induced obesity (DIO) conditions, fat-1 mice - enriched in n-3 PUFAs - are protected against metabolic endotoxemia : lowered plasma LPS level, decreased gut permeability, enhanced jejunal tight junction protein expression were observed in comparison with wild-type littermates control mice. Such a prevention occurs with a resistance to weight gain and associated metabolic disorders, usually observed under DIO conditions. Moreover, n-3 fatty acid tissue-enrichment increased *Akkermansia* population in gut microbiota of fat-1 mice, and fat-1 fecal matter transplantation to WT mice limited their weight gain, normalized whole-body glucose tolerance, and hugely decreased intestinal permeability. We therefore conclude that the ability of n-3 fatty acids to raise the relative proportion of *Akkermansia* is playing a key role in decreasing LPS translocation and consequent endotoxemia-induced metabolic disorders in DIO.

When the WT mice developed severe obesity, fat-1 expression led to a strong suppression of both body weight and fat mass gain in mice fed a HFHS diet. Moreover, fat-1 transgenic animals were also totally protected against obesity associated metabolic disorders namely glucose intolerance and hepatic steatosis. Our results agree with data recently reported on fat-1 mice [43] showing that endogenous elevation of n-3 PUFAs and reduction of n-6 PUFAs levels in the fat-1 mice favor a lean phenotype, primarily through stimulation of increased energy expenditure. However, two earlier studies reported that fat-1 heterozygous mice were protected against obesity-linked inflammation and insulin resistance [44] and exhibited amelioration of non-alcoholic fatty liver disease [45] but with a similar body weight than that of WT mice under DIO. We also found that fat-1 heterozygous mice failed to prevent weight gain when fed a HFHS diet (data not shown). This is the reason why we carefully selected, by an easy and quick genotyping method developed in additional material section, homozygous fat-1 mice for the present study.

In addition to a large whole-body glucose tolerance improvement, we also showed that fat-1 mice exhibit an enhanced muscle glucose uptake, independently of the presence of insulin. White and coworkers [44] evidenced that compared with high fat-fed WT, the high fat-fed fat-1 mice displayed increased docosanoid biosynthesis in muscle. Indeed, the pro-resolving lipid mediator, PD1 (10R,17S-dihydroxy docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoic acid) was increased by ~176 % in muscle tissue of fat-1 mice versus WT mice. In addition, a recent study demonstrated that administration of PD1 to obese diabetic *db/db* mice substantially improved their insulin sensitivity [46]. In the light of these data, we may assume that the high muscle glucose uptake

observed in our study could be due, at least in part, to increased n-3 bioavailability for pro-resolution mediator synthesis (as PD1) in the muscle of the fat-1.

In association with the obesity and glucose intolerance prevention observed in the fat-1 mice versus WT, we also clearly showed that endogenously synthesized n-3 PUFAs totally prevent HFHS-induced fatty liver. These results agree with those of Kim *et al.* [45] and Li *et al.* [43] who evidenced that fat-1 gene expression protects against high-fat diet-induced hypercholesterolemia and hepatic steatosis.

Chronic low-grade inflammation is now considered to be a critical factor underlying obesity and type 2 diabetes [47] where significant alterations in the intestinal barrier occur [8, 48, 49] resulting in a two-to-threefold increase of LPS in serum concentrations, a threshold named metabolic endotoxemia [8]. Moreover, as n-3 PUFAs have shown to reduce intestinal permeability [50], we therefore speculated that fat-1 mice could be protected from DIO and associated metabolic disorders partly through prevention of decreased tight junction (TJ) protein expression, leaky gut, and consequent metabolic endotoxemia.

High-fat diet-fed mice have been characterized by an increase in gut permeability and metabolic endotoxemia [6, 48, 51] associated with the reduced expression of genes encoding for TJ proteins [6]. Nevertheless, to the best of our knowledge, very few *in vivo* studies have investigated the effects of n-3 PUFAs on intestinal permeability and metabolic endotoxemia [15, 19], despite a paper published very recently showing that WT mice fed a diet high in n-6 FA exhibit higher levels of metabolic endotoxemia and systemic low-grade inflammation, while endotoxemic and inflammatory status were alleviated in fat-1 mice [23]. Nevertheless, until now metabolic endotoxemia has never been investigated in fat-1 mice challenged by a diet inducing obesity known to disrupt intestinal permeability leading to endotoxemia : we report here that when HFHS-fed WT mice exhibit enhanced gut permeability in association with an alteration of TJs intestinal expression of, n-3 PUFAs protect fat-1 mice against a decreased TJ protein expression, a “leaky” intestinal epithelial barrier, thus giving rise to reduced metabolic endotoxemia. These *in vivo* data are strengthened by our *in vitro* results obtained on Caco-2/TC7 cells challenged by different FA where DHA improves paracellular permeability compared with OA and LA. These results are supported by Li *et al.* [17] and Willemsen *et al.* [18], who reported that DHA maintained epithelial barrier integrity by improving transepithelial electrical resistance and by Roig-Perez *et al.* [52] who showed that DHA treatment of Caco-monolayers increased paracellular impermeability via the intracellular redistribution of the TJ proteins [52]. Liu *et al.* [19] also showed that fish oil improved intestinal

barrier function compared with corn oil. Consistent with the improved intestinal barrier function, we also observed that DHA-treated Caco-2/TC7 cells maintained ZO-1 protein expression after LPS challenge. Similarly, Li *et al.* [17] mentioned that fish oil protected against altered membrane microdomain localization of TJ proteins, increased the expression of ZO-1, and attenuated the disruption of TJ structure in rat colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. Then, both our *in vivo* and *in vitro* data evidence that n-3 PUFAs protect HFHS-fed mice from DIO, glucose intolerance and liver steatosis in association with alleviation of intestinal paracellular permeability and metabolic endotoxemia.

This prompted us to investigate the impact of the transgenic n-3 PUFA-enrichment in fat-1 mice on the gut microbiota. Indeed, growing evidence supports that gut microbiota plays a decisive role in energy homeostasis through modulating energy balance [53, 54], glucose metabolism [6, 8, 55], and chronic inflammatory state associated with obesity [6, 8, 55, 56]. Accordingly, it has been demonstrated that gut microbiota-derived LPS plays an important role in the onset and progression of inflammation and related metabolic diseases [8]. Our results show that, besides significant differences in gut microbiota between the two genotypes, fat-1 mice display a significantly higher diversity level than WT mice when fed the HFHS diet. Moreover, fat-1 mice exhibit a fecal microbiota enriched in OTUs belonging to the *Verrucomicrobia* phylum and, by using a supervised classification approach, we proved the transgenic mice to be highly enriched (fiftyfold increased) in the *Akkermansia* genus compared to WT where this genus was almost not present ( $14.9 \pm 5.1$  % versus  $0.4 \pm 0.4$  % in fat-1 CTL and WT CTL respectively). These results agree with dietary experimentation conducted by Andersen *et al.* [57] who reported that, compared with sunflower oil supplementation, fish oil affected changes in large bacterial groups [57]. Moreover, Yu *et al.* [21] showed that fish oil is capable of producing significant changes in gut microbiota [21] especially suppression of *Helicobacter* and *Firmicutes* growth, known to play a significant role in the pathogenesis of peptic ulcer disease and obesity respectively. Finally, a just recently published paper support our data by showing that a host-microbiome interaction mediates the opposing effects of n-6 and n-3 FA on metabolic endotoxemia [23]. Nevertheless, to the best of our knowledge this is the first study reporting such a major effect of n-3 on the proportion of *Akkermansia* in the intestinal microbiota. *Akkermansia*, representing 1 %-5 % of the total gut microbiota, is a Gram-negative, mucin-degrading bacterium that lives in the mucus layer of the intestine. The population size of this bacterium has been shown to be inversely correlated with body weight [58-60]. Although we have not directly established the causal relationship between transgenic n-3 PUFA induced increase in the relative proportion of *Akkermansia* population and the improved features of obesity and the associated metabolic disorders in fat-1 HFHS-fed mice, recent studies

have already reported that increased intestinal abundance of *Akkermansia* can protect against obesity-linked metabolic syndrome [59-62]. Interestingly, besides the fact that *Akkermansia* uses mucins as a food supply, it seems to be crucial for the mucus layer integrity [61, 63]. *Akkermansia* administration as a probiotic has been reported to reduce systemic LPS levels in high-fat-fed mice, possibly through mucus layer thickness prevention, and then reduction of gut permeability and LPS leakage [61]. Moreover, *Akkermansia* population changes and their putative effects on obesity-driven dysbiosis occurs without major modifications in the proportions of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, as already mentioned by Anhe *et al.* [60] who studied the effects of a polyphenol-rich cranberry extract. Taken together, our observations highlight that n-3 PUFA-enrichment - by increasing by 50 % the presence of *Akkermansia* in fat-1 versus WT mice - may reduce intestinal permeability and LPS translocation, therefore preventing weight gain, whole-body glucose intolerance, and hepatic steatosis partly through mechanisms associated with metabolic functionalities assumed by gut microbes as *Akkermansia* in fat-1 HFHS-fed mice.

In order to validate the fact that n-3 PUFA-enrichment in fat-1 mice impact their gut microbiota by enhancing the proliferation of beneficial bacteria leading to DIO and associated disorders prevention, we performed reciprocal microbiota transplantation experiments, which strikingly evidenced that WT mice colonized with a fat-1 microbiota exhibited a significantly lower total weight gain than WT mice ( $10.2 \pm 1.1$  versus  $16.3 \pm 0.7$ g respectively) over sixteen weeks of HFHS diet. In addition to this weight gain attenuation, WT mice colonized with a fat-1 microbiota hugely improved glucose tolerance and exhibited much lower gut permeability.

In addition to preventing obesity and associated metabolic disorders, we found in the present paper that n-3 PUFA tissue-enrichment lowered plasma LPS level, decreased gut permeability, enhanced jejunal tight junction protein expression in HFHS-fed fat-1 mice versus WT leading to metabolic endotoxemia alleviation. Altogether, our results show for the first time that under DIO conditions, endogenous n-3 PUFA-enrichment in fat-1 mice induced an unexpected change in gut microbiota composition (a peculiarly increase of *Akkermansia*) in favor of a lean phenotype. We also demonstrated that transplanting gut microbes from fat-1 mice into WT mice replicated the protection against DIO and metabolic disorders, unequivocally showing that n-3 PUFAs impact gut microbiota, which in turn affects host metabolism. Consequently, we may assume that modulating the gut microbiota, aimed at increasing the *Akkermansia* population, by appropriate n-3 PUFAs represents a promising strategy to control or prevent obesity and related diseases.

## Acknowledgments

JB acknowledges support from the Région Bourgogne. This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex.

JB thanks Amandine Bataille, Amandine Chlémaire and André Bouchot for their great expertise in histology.

JB thanks Monique Rousset from U1138, Les Cordeliers, Paris, France, who provided the Caco-2/TC7 cell line.

JB greatly thanks Elise Lalarme for taking care of the animals, Loïc Roblet who performs fat-1 genotyping, and Chad Stroud who developed the genotyping strategy.

No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

## REFERENCES

1. Pereira, S., et al., *Insulin resistance of protein metabolism in type 2 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(1): p. 56-63.
2. Kahn, R., *Metabolic syndrome--what is the clinical usefulness?* Lancet, 2008. **371**(9628): p. 1892-3.
3. Horng, T. and G.S. Hotamisligil, *Linking the inflammasome to obesity-related disease*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 164-5.
4. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
5. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
6. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
7. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
8. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
9. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
10. Teixeira, T.F., et al., *Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability*. Nutr Res, 2012. **32**(9): p. 637-47.
11. Tsukumo, D.M., et al., *Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 1986-98.
12. Whiting, C.V., P.W. Bland, and J.F. Tarlton, *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(4): p. 340-9.
13. Hudert, C.A., et al., *Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11276-81.
14. Jiang, W.G., et al., *Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(2): p. 414-20.
15. Mani, V., J.H. Hollis, and N.K. Gabler, *Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia*. Nutr Metab (Lond), 2013. **10**(1): p. 6.
16. Liu, T., et al., *Gut bacteria profiles of Mus musculus at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids*. Anaerobe, 2012. **18**(3): p. 331-7.
17. Li, Q., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines*. Mol Immunol, 2008. **45**(5): p. 1356-65.
18. Willemsen, L.E., et al., *Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro*. Eur J Nutr, 2008. **47**(4): p. 183-91.
19. Liu, Y., et al., *Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge*. J Nutr, 2012. **142**(11): p. 2017-24.
20. Ghosh, S., et al., *Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55468.
21. Yu, H.N., et al., *Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota*. Arch Med Res, 2014. **45**(3): p. 195-202.

22. Mujico, J.R., et al., *Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice*. Br J Nutr, 2013. **110**(4): p. 711-20.
23. Kaliannan, K., et al., *A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11276.
24. Kang, J.X., et al., *Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids*. Nature, 2004. **427**(6974): p. 504.
25. Chantret, I., et al., *Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 1): p. 213-25.
26. Bellenger, J., et al., *A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 773-5.
27. Dardevet, D., et al., *Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats*. Endocrinology, 1994. **134**(3): p. 1475-84.
28. Pais de Barros, J.P., et al., *Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay*. J Lipid Res, 2015.
29. Kozich, J.J., et al., *Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(17): p. 5112-20.
30. Zhang, J., et al., *PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR*. Bioinformatics, 2014. **30**(5): p. 614-20.
31. Caporaso, J.G., et al., *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. Nat Methods, 2010. **7**(5): p. 335-6.
32. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2460-1.
33. Caporaso, J.G., et al., *PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment*. Bioinformatics, 2010. **26**(2): p. 266-7.
34. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, *FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(7): p. 1641-50.
35. Faith, D.P., *Conservation evaluation and phylogenetic diversity*. Biological conservation, 1992. **61**(1): p. 1-10.
36. Lozupone, C. and R. Knight, *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8228-35.
37. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. The Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-1428.
38. Ogden, C.L., et al., *The epidemiology of obesity*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2087-102.
39. Kim, K.A., et al., *High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47713.
40. Guo, S., et al., *Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14*. Am J Pathol, 2013. **182**(2): p. 375-87.
41. Lei, S., et al., *Somatostatin ameliorates lipopolysaccharide-induced tight junction damage via the ERK-MAPK pathway in Caco2 cells*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(7): p. 299-307.
42. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.

43. Li, J., et al., *Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice*. Mol Endocrinol, 2014. **28**(8): p. 1316-28.
44. White, P.J., et al., *Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice*. Diabetes, 2010. **59**(12): p. 3066-73.
45. Kim, E.H., et al., *Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(10): p. 1359-65.
46. White, P.J., et al., *Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 664-9.
47. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
48. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
49. Frazier, T.H., J.K. DiBaise, and C.J. McClain, *Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2011. **35**(5 Suppl): p. 14S-20S.
50. Usami, M., et al., *Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells*. Clin Nutr, 2001. **20**(4): p. 351-9.
51. Brun, P., et al., *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G518-25.
52. Roig-Perez, S., et al., *Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine*. J Lipid Res, 2004. **45**(8): p. 1418-28.
53. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
54. , P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
55. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1*. Obes Res, 2005. **13**(6): p. 1000-7.
56. Geurts, L., et al., *Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 149.
57. Andersen, A.D., et al., *Molecular fingerprints of the human fecal microbiota from 9 to 18 months old and the effect of fish oil supplementation*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011. **53**(3): p. 303-9.
58. Everard, A., et al., *Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 2775-86.
59. Shin, N.R., et al., *An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice*. Gut, 2014. **63**(5): p. 727-35.
60. Anhe, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice*. Gut, 2015. **64**(6): p. 872-83.
61. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71.
62. Roopchand, D.E., et al., *Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome*. Diabetes, 2015. **64**(8): p. 2847-58.



63. Belzer, C. and W.M. de Vos, *Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia*. ISME J, 2012. **6**(8): p. 1449-58.

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Dans ce travail, nous avons mis en évidence lors d'une première expérimentation nutritionnelle, une réponse différentielle des souris transgéniques fat-1 et sauvages soumises à deux régimes distincts (contrôle et riche en lipides et en glucides, high-fat/high-sucrose). Plus encore, nous avons montré une prévention de l'obésité alimentaire chez les souris transgéniques fat-1 par rapport aux souris sauvages soumises à un régime riche en lipides et en glucides, sans modification de la prise alimentaire (résultat non présenté). Dans une étude chez les souris transgéniques fat-1, Li et collaborateurs ont également montré que l'enrichissement endogène en AGPI en n-3 des animaux est associé à un phénotype mince et à une augmentation de la dépense énergétique (Li et al., 2014a). Cependant, des études préalables (Li et al., 2008a, White et al., 2010) ont montré que des souris fat-1 et sauvages nourries avec un régime HF riche en lipides (55 % kcal) développaient une obésité similaire. Cette différence peut se justifier de plusieurs manières.

Tout d'abord, nous avons utilisés un régime high fat-/high sucrose, riches en lipides et en glucides (research diet D12451) apportant 35 % de l'énergie sous forme de glucides et 45 % de l'énergie sous forme de lipides et dont la composition (en % pondéral sec) est présentée ci-après : Glucides 41, Protéines 24, Fibres/Vitamines/Minéraux/Cendres 11, Lipides 24 dont AGS 31,4/AGMI 39,8/AG en n-6 26,6/ AG en n-3 2,2 (rapport n-6/n-3 12,1). Le choix d'un régime dont 45 % des kcals sont apportés par les lipides est considérés moins extrême et plus relevant d'un point de vue nutritionnel par rapport à un régime 55 % (Ghibaudi et al., 2002, Johnston et al., 2007). Ainsi, étudier les effets d'une manipulation nutritionnelle sur la prévention des effets des régimes extrêmes est moins difficile dans ces conditions (Wang and Liao, 2012).

Ensuite, des souris hétérozygotes pour le transgène fat-1 étaient utilisées pour ces travaux (Li et al., 2008a, White et al., 2010) alors que notre étude a été réalisée sur des souris homozygotes pour ce transgène, tout comme celle de (Li et al., 2014a), ce qui laisse supposer que la présence du transgène sur un seul allèle ne semble pas protéger suffisamment ces souris de l'obésité, bien qu'il ait été montré que leur enrichissement tissulaire en AGPI en n-3 soit important (Kang et al., 2004). Il a en effet été montré que l'enrichissement endogène en AGPI en n-3 chez les souris fat-1 était dépendant de leur activité de conversion des AGPI en n-6 et AGPI en n-3. Une expression homozygote est plus efficace. Mais il a aussi été rapporté que ce taux de conversion était également grandement dépendant de l'apport en substrat AGPI en n-6 (Li et al., 2014a). Cette observation a justifié le fait que dans notre étude les animaux étaient nourris, dès le sevrage, avec un régime contenant pour unique source de lipides de l'huile de carthame riche en LA.

L'utilisation d'un régime de maintenance enrichit en huile de carthame sur des animaux tout juste sevrés et maintenu sur une période de 12 semaines est doublement intéressant pour notre étude. Il permet, d'une part, l'obtention de profils lipidiques tissulaires différents entre les souris

transgéniques fat-1 (riche en AG en n-3 et pauvre en AG en n-6) et sauvages (riche en AG en n-6 et déficient en AG en n-3) lors du démarrage du régime obésogène, ce qui n'était pas le cas pour l'étude menée par Li et collaborateurs et White et collaborateurs (Li et al., 2008a, White et al., 2010). D'autre part, ce régime permet de sensibiliser les souris sauvages à l'induction d'une obésité par un régime d'intervention riche en lipides et en glucides. Il a en effet été montré qu'un régime supplémenté en acide linoléique (majoritaire dans l'huile de carthame) induisait un développement du tissu adipeux blanc chez la rate en gestation ainsi qu'une obésité chez sa progéniture (Hausman et al., 1991). De plus, il a été décrit que l'acide linoléique combiné aux AG saturés conduisait à une altération de l'action de l'insuline et à une insulino-résistance, des complications associées l'obésité (Storlien et al., 1987),.

Ces différents points peuvent alors expliquer en partie la prévention de l'induction d'une obésité alimentaire observée chez les souris fat-1, sous nos conditions expérimentales.

De plus, notre travail met en évidence une amélioration du profil glucidique - meilleure tolérance au glucose et meilleure sensibilité à l'insuline - chez les souris fat-1 soumises au régime HF/HS, comparativement aux souris sauvages. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui a montré que les AGPI en n-3, principalement l'EPA et le DHA, permettaient une prévention de l'insulino-résistance (Fedor and Kelley, 2009, Gonzalez-Periz et al., 2009). De même, Smith et collaborateurs ont montré que la diminution du rapport n-6/n-3 des souris fat-1 était associée à une amélioration de la tolérance au glucose (Smith et al., 2010). Enfin, Belchior et collaborateurs ont également montré une amélioration de la tolérance au glucose chez des souris fat-1 ainsi que chez des souris nourries avec un régime riche en lipides et en glucides enrichi en AGPI en n-3 (Belchior et al., 2015). En relation avec cette meilleure tolérance au glucose, les souris fat-1 présentent un captage musculaire du glucose supérieur à celui des souris sauvages, indépendamment de la présence ou non d'insuline. De plus, une surexpression des protéines impliquées dans les étapes précoces de la voie de signalisation de l'insuline - IRS1, pIRS1, PI3K - est observée au niveau hépatique (résultat non présenté), renforçant ainsi l'hypothèse d'une protection par les AGPI en n-3 des souris fat-1, à la fois vis-à-vis de l'obésité et de l'insulino-résistance, du fait d'une efficacité accrue de la prise en charge musculaire du glucose circulant et de l'insulino-sensibilité hépatique. Il est connu que l'incorporation d'AG en n-3 dans les membranes cellulaires augmente la fluidité des membranes (Feskens et al., 1991). Ce qui pourrait stimuler l'activité des récepteurs à l'insuline et le transport du glucose et augmenter la sensibilité à l'insuline des tissus cibles (Field et al., 1988). Storlien et collaborateurs ont supposé que l'agrégation, l'internalisation du complexe insuline-récepteur, et l'adressage des transporteurs au glucose à la

membrane des cellules était facilité par ces changements de la fluidité membranaire suite à l'incorporation des AGPI en n-3 dans les phospholipides des membranes (Storlien et al., 1987).

De plus, au niveau hépatique, l'accumulation de gouttelettes lipidiques de même que l'augmentation de la masse de lipides totaux observées chez les souris sauvages sous l'effet d'un régime obésogène, ne sont pas retrouvées chez les souris fat-1. Les souris fat-1 apparaissent donc protégées de l'apparition d'une stéatose hépatique par les AGPI en n-3, ce qui est en accord avec une expression réduite de FATCD36 et de PPAR $\gamma$  chez ces souris dans nos conditions expérimentales, ces deux marqueurs sont généralement surexprimés lors du développement d'une stéatose hépatique (Miquilena-Colina et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec diverses études nutritionnelles montrant que, lors d'un régime riche en lipides, une supplémentation en AGPI en n-3 réduisait la stéatose hépatique (Mori et al., 2007, Valenzuela and Videla, 2011). Cependant, il a été récemment montré, dans une étude chez des souris fat-1 et des souris sauvages supplémenté en AGPI en n-3, que l'accumulation des TAG hépatiques est influencée de manière flagrante par la source des AGPI en n-3 utilisés. La présence de ces AG au niveau tissulaire chez les souris fat-1, n'a pas été suffisante, dans cette étude, pour protéger du développement d'une stéatose hépatique. Seule la supplémentation d'AGPI en n-3 par gavage est parvenue à prévenir cette accumulation de lipides par le foie (Daniel et al., 2015). Ces auteurs ont émis l'hypothèse d'une forte implication de l'axe intestin-foie dans les effets bénéfiques attribués aux AGPI en n-3. Lors de cette étude, les souris ont été maintenues sous un riche en lipides (55% des kcals) et n'ont pas été préalablement maintenues sous un régime enrichit en AG en n-6 (Daniel et al., 2015). Ainsi, l'enrichissement en AGPI en n-3 chez les souris fat-1 a pu ne pas être suffisant et ces deux faits peuvent expliquer la différence de résultats obtenus par rapport à notre étude expérimentale.

Une augmentation de l'inflammation est l'un des facteurs majeur pouvant conduire, lors de l'obésité, au développement d'une l'insulino-résistance. Les AGPI en n-3 tissulaires peuvent réduire cette inflammation *via* la production de médiateurs lipidiques dérivant du DHA tels le 17-HDoHE et ses métabolites comme la protectine D1, dont la teneur est supérieure d'environ 176 % au niveau musculaire chez des souris fat-1 comparativement aux souris sauvages (White et al., 2010, White et al., 2014), qui protègent les hépatocytes contre le stress oxydatif et la dégradation de l'ADN en cas de lésions nécroinflammatoires du foie (Rius et al., 2012). Ils sont également à même de modifier la composition des membranes lipidiques, induisant la diminution de l'activité pro-inflammatoire des cytokines TNF $\alpha$  et IL1 $\beta$  (Ma et al., 2004). Gonzalez-Periz et collaborateurs ont également

montré une réduction du statut inflammatoire *via* l'inhibition de la formation d'eicosanoïdes pro-inflammatoires dérivés des AGPI en n-6, chez des souris *ob/ob* supplémentées en AGPI en n-3, en lien avec une prévention de la stéatose hépatique (Gonzalez-Periz et al., 2009). Ces données suggèrent que la prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés dans nos conditions expérimentales peut s'expliquer également en partie par une augmentation de la synthèse de seconds messagers lipidiques aux propriétés anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes.

La plus faible perméabilité intestinale observée chez les souris *fat-1* *via* un maintien de l'expression de protéines de jonctions serrées ZO-1 et OCLN (résultat non montré pour cette dernière) explique en partie le fait que l'endotoxémie métabolique observée chez les souris *fat-1* soit plus faible que celle des souris sauvages. Une étude très récente rapporte une prévention du risque endotoxique par les AGPI en n-3 chez des souris transgéniques *fat-1* soumises à un régime riche en AGPI en n-6 (Kaliannan et al., 2015). Un tel impact des AGPI en n-3 endogènes sur l'endotoxémie métabolique semble donc s'exercer à la fois dans des conditions obésogènes et lors d'un régime déséquilibré dans le rapport n-6/n-3. Dans leur étude, Kaliannan et collaborateurs ont proposé un autre mécanisme quant aux rôles des AGPI en n-3 sur la réduction de l'endotoxémie métabolique. Ils ont constaté que l'enrichissement tissulaire en AGPI en n-3 chez les souris *fat-1* était associé à une production et sécrétion accrue de la phosphatase alcaline intestinale (IAP), ce qui induit une modulation de l'écologie bactériennes intestinale, une diminution de la production des LPS (et de leur activité par une déphosphorylation des lipides porté par la partie lipide A), une réduction de la perméabilité intestinale et par conséquent une réduction de l'endotoxémie métabolique et de l'inflammation (Kaliannan et al., 2015). De plus, il semblerait que l'IAP réprime le facteur de croissance VEGF (Wang et al., 2015), soulevant le rétro-contrôle négatif de ce facteur sur l'expression de protéines de jonction serrées en particulier (Koutroubakis et al., 2004).

Il est à noter que les LPS peuvent également entrer dans la circulation sanguine par d'autres moyens, notamment par une perméabilité transcellulaire à travers les domaines des radeaux lipidiques des membranes, ce qui implique une endocytose médiée par des récepteurs (FABP, TLR4) (Triantafilou et al., 2002), et aussi *via* une perméabilité facilitée par la formation de micelles, après la consommation de lipides alimentaires, qui transportent les LPS vers les cellules intestinales. Puis les chylomicrons formés au niveau des entérocytes vont les transporter principalement aux organes périphériques (Ghoshal et al., 2009). Même si plusieurs mécanismes entrent en jeu, la consommation d'un régime riche en lipides favorise l'internalisation des jonctions serrées et augmente la perméabilité paracellulaire aux macro-molécules dont les endotoxines LPS (Cani et al., 2008).

Les résultats obtenus dans notre étude *in vitro* sur des cellules coliques humaines Caco-2/TC7 traitées au DHA en présence ou non de LPS montrent un maintien de l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1 (et OCLN, résultat non présenté) et une amélioration de la perméabilité para-cellulaire comparativement à des traitements au LA et OA, confortant ainsi les résultats précédents. D'autres approches ont également montré que le DHA était capable de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale par exemple par l'amélioration de la résistance électrique transépithéliale (Li et al., 2008b, Willemsen et al., 2008) ou par une redistribution intracellulaire des protéines de jonctions serrées (Roig-Perez et al., 2004). De telles protections de la barrière intestinale par les AGPI en n-3 ont également été mises en évidence chez le porc (Liu et al., 2012a), et dans un modèle de colite chez le rat (Li et al., 2008c).

En 2014, Myles et al. ont démontré que l'administration d'AG en n-3 à des souris gestantes affecte le microbiote de leur progéniture en entraînant la diminution de la réponse inflammatoire. Cela suggère que les propriétés anti-inflammatoires de ces AG pourraient perdurer de génération en génération après l'exposition aux AG en n-3, potentiellement à travers l'héritage du microbiote (Myles et al., 2014). Le microbiote intestinal jouant un rôle important dans l'homéostasie énergétique de l'hôte, (Backhed et al., 2004, Turnbaugh et al., 2006), le métabolisme glucidique (Cani et al., 2007a, Cani et al., 2008, Cani et al., 2005), et l'inflammation chronique associée à l'obésité (Cani et al., 2007a, Cani et al., 2008, Cani et al., 2005, Geurts et al., 2011) et les LPS bactériens jouant un rôle important dans l'apparition et la progression de l'inflammation et des maladies métaboliques associées (Cani et al., 2007a), nous nous sommes donc par la suite intéressés à l'impact des AGPI en n-3 sur le microbiote intestinal en conditions obésogènes.

Dans notre première expérimentation nutritionnelle, une analyse du microbiome caecal a révélé une abondance similaire des grands phyla bactériens *Bactéroidetes* et *Firmicutes* avec néanmoins une abondance relative plus importante de *Bactéroidetes* S24-7 chez les souris sauvages et les souris transgéniques fat-1 soumises à un régime hyperlipidique et glucidique. Des résultats différents ont été obtenus par Ley et collaborateurs, qui ont montré une réduction significative de 50 % des *Bactéroidetes* et une plus forte proportion en *Firmicutes* dans le microbiote caecal de souris obèses par rapport à des souris minces (Ley et al., 2005). Cependant, cette analyse montre une diversité microbienne plus importante chez les souris transgéniques fat-1 par rapport aux souris sauvages, ce qui a récemment été montré comme facteur prédictif potentiel d'un phénotype mince (Cotillard et al., 2013).

De plus, nous avons montré que le microbiote caecal des souris transgéniques *fat-1* était enrichi en phylum *Verrucomicrobia*, et plus particulièrement *Akkermansia*, que l'on retrouve environ à hauteur de 15 % chez les souris *fat-1* comparativement aux souris sauvages. Cette bactérie à Gram négatif, résidant dans la couche de mucus où elle utilise les protéines mucines comme substrats énergétiques, représente généralement 1 à 5 % du microbiote intestinal (Belzer and de Vos, 2012). Sécrétée par les cellules caliciformes, la muqueuse constitue un milieu de choix pour les bactéries en tant que source nutritionnelle, ce qui permet de confiner les agents pathogènes dans sa couche externe (Etzold and Juge, 2014). Les études ont montrés l'influence réciproque de la muqueuse envers le microbiote et la défectuosité en mucines (par exemple MUC2), mènerait à un déséquilibre du microbiote en faveur de *Clostridium difficile* (Cobo et al., 2015), tandis que certaines populations bactériennes protégeraient la muqueuse (Jakobsson et al., 2015).

Bien que nous n'ayons pas établi de lien direct entre l'enrichissement en AGPI en n-3 et la proportion relative en *Akkermansia*, cette modification de la distribution d'*Akkermansia* chez les souris *fat-1* pourrait également expliquer en partie les effets de ces acides gras sur la prévention de l'obésité chez la souris *fat-1*. En effet, cette bactérie a été montrée comme étant impliquée dans le contrôle de la fonction barrière intestinale (Cani et al., 2013, Zhang et al., 2013) et son abondance dans le microbiote intestinal ayant été inversement corrélée au poids corporel (Anhe et al., 2015, Shin et al., 2014). Elle pourrait donc permettre une protection de l'hôte vis-à-vis du développement d'un syndrome métabolique associé à l'obésité (Everard et al., 2013, Roopchand et al., 2015). Des changements de l'abondance en *Akkermansia* peuvent donc apparaître en l'absence de modification des proportions en *Firmicutes* and *Bactéroïdetes*, comme cela a été montré récemment lors d'une étude sur les effets d'un extrait de cranberry riche en polyphénols (Anhe et al., 2015).

Ainsi, les AGPI en n-3, en augmentant l'abondance relative du genre *Akkermansia* au sein du microbiote intestinal des souris *fat-1* comparativement à des souris sauvages, peuvent réduire la perméabilité intestinale et le passage des LPS au niveau systémique, protégeant ainsi ces souris d'une prise de poids excessive, et des perturbations associées.

Dans une seconde nutritionnelle réalisée suite à la transplantation réciproque de microbiote fécal entre souris sauvages et souris *fat-1*, nous avons montré, après 16 semaines de régime HFHS, que des souris sauvages transplantées avec du microbiote de souris transgéniques *fat-1* présentaient une prise de poids réduite, comparativement à des souris sauvages non transplantées. Ceci s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose et de la fonction barrière intestinale.



En revanche, la transplantation du microbiote des souris sauvages vers les souris fat-1 n'a pas ou peu d'effet significatif. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une implication partielle du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte et notamment sa susceptibilité au développement d'une obésité induite par un régime obésogène, mais également le rôle spécifique des AGPI en n-3 dans la prévention de ce phénomène de prise de poids et désordres associés. Concernant l'étude du microbiote, les souris transgéniques fat 1 présentent des phyla différents de ceux retrouvés chez les souris sauvages, mais il ne s'agit pas ici du phylum *Verrucomicrobia* (résultats non présentés). Le même constat est fait concernant la comparaison de l'écologie bactérienne entre les souris sauvages transplantées et les souris fat-1 transplantées (résultats non présentés). Ceci pourrait être expliqué en partie par un biais de procédure corrélé à l'utilisation de l'antibiotique streptomycine sur 24h, qui pourrait orienter le microbiote intestinal vers une espèce opportuniste résistante à cet antibiotique, empêchant peut être l'implantation de certaines espèces bactériennes, telles que les *Verrucomicrobia*.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'ensemble de ce travail met en évidence que les souris transgéniques fat-1 présentent une teneur élevée en phylum bactérien *Akkermansia* comparativement aux souris sauvages, chez lesquelles il est pratiquement absent, permettant de préserver l'intégrité de la fonction barrière de l'intestin *via* le maintien de l'expression de protéines de jonctions serrées, en particulier ZO-1. Ce phénomène permet une prévention de l'hyperperméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique avec, en conséquence, une réduction des teneurs en LPS circulants, lors de l'induction d'une obésité alimentaire. Ces résultats sont confirmés *in vitro* par un traitement au DHA de cellules Caco-2/TC7, qui montre un maintien de la perméabilité épithéliale en relation avec une augmentation de l'expression de protéines de jonctions serrées, en présence ou non de LPS dans le milieu de culture.

Ces résultats sont autant d'arguments permettant d'expliquer en partie la prévention de l'obésité, de l'intolérance au glucose et de la stéatose hépatique observées chez les souris transgéniques fat-1 soumises à un régime obésogène.

L'hypothèse d'une implication du microbiote dans cette prévention est renforcée par le fait qu'une transplantation de bactéries fécales provenant de souris fat-1 à des souris sauvages maintenues sous régime obésogène atténue la prise de poids et le développement de désordres associés.

Ainsi, l'utilisation des acides gras polyinsaturés en n-3 afin de moduler le microbiote intestinal en faveur d'une augmentation d'*Akkermansia*, apparaît comme une stratégie prometteuse de prévention ou de contrôle de l'installation de l'obésité (Figure 24).

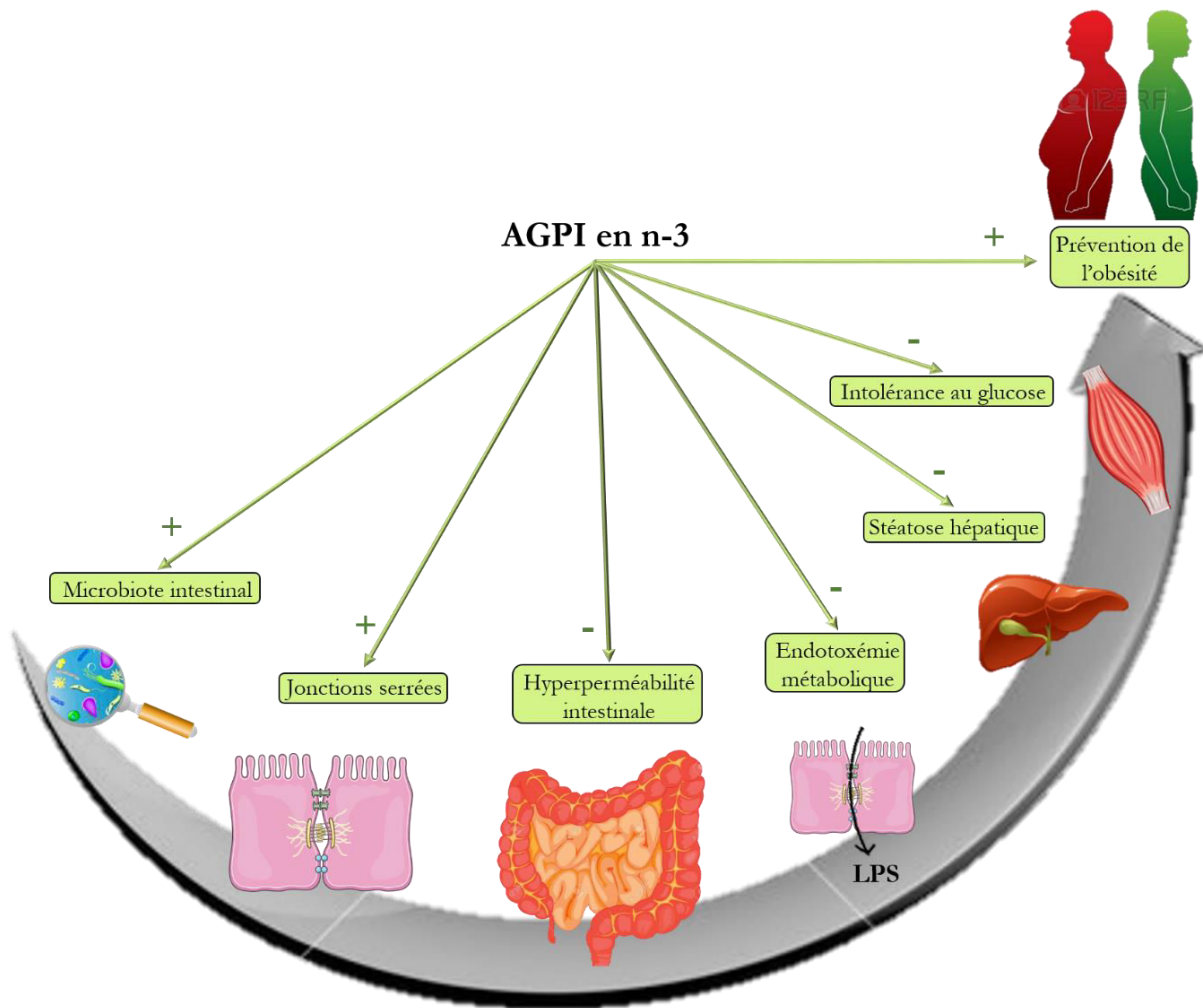


Figure 24 Schéma récapitulatif des actions des AGPI en n-3

Les AGPI en n-3 préviennent du développement d'une obésité en agissant sur la composante intestinale. Ils préviennent des altérations du microbiote et maintiennent l'intégrité et l'expression des protéines de jonctions. Ainsi, ils améliorent la fonction barrière intestinale et réduisent l'endotoxémie métabolique. Les AGPI en n-3 agissent également sur les maladies métaboliques secondaires associées à l'obésité. Ils préviennent le développement d'une stéatose hépatique et améliorent la tolérance au glucose, principalement au niveau musculaire

En perspectives, il conviendrait d'étudier les effets d'une administration continue de faibles doses de LPS *via* des pompes à diffusion sous-cutanée, couplée à un régime obésogène afin d'exacerber la composante inflammatoire de l'endotoxémie métabolique liée à l'obésité. Ainsi, nous pourrions vérifier si les souris fat-1 sont également résistantes à une prise de poids induite par un régime obésogène couplé à une infusion continue de LPS. Pour cela, des souris sauvages et transgéniques fat-1, seront soumises à un régime obésogène et des mini-pompes osmotiques Alzet contenant soit du LPS soit une solution saline leur seront implantées par voie intrapéritonéale. Au cours de cette période, des mesures anthropométriques seront réalisées : suivi pondéral, mesure de la prise alimentaire, quantification de la masse grasse et de la masse maigre par QNMR (Quantitative Nuclear Magnetic Resonance). Les composantes intestinales des animaux seront ensuite envisagées par des approches expérimentales semblables à celles utilisées durant ce travail de thèse.

Par ailleurs, les effets des AGPI en n-3 sur le transport sanguin des LPS et leur détoxification en conditions obésogènes pourraient être étudiés. En effet, il a été observé que la liaison des LPS avec les lipoprotéines prévenait partiellement l'activation des macrophages/monocytes et la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse à une endotoxémie (Cavaillon et al., 1990, Harris et al., 1993). Chez les mammifères, l'élimination des LPS se fait de façon comparable à la voie métabolique du transport inverse du cholestérol et son captage par les récepteurs hépatiques (Glomset, 1968, Hampton et al., 1991, Hampton and Raetz, 1991, Acton et al., 1996). Il a été montré que la PLTP (protéine de transfert des phospholipides), jouait un rôle important dans l'élimination des LPS (Gautier et al., 2008). Chez les souris transgéniques fat-1, la prise en charge des LPS par la PLTP et leur élimination par la voie hépatobiliaire pourrait être modifiée lors d'une l'induction de l'obésité, par rapport à leurs homologues sauvages et ce d'autant que, dans une faible proportion, les acides biliaires peuvent être métabolisés par le microbiote en acides biliaires secondaires (Gerard et al., 2007). Le développement d'un modèle PLTPKO/fat-1 permettrait de conforter les résultats de cette étude.

Enfin, dans le but de compléter l'étude de transplantation croisée de matière fécale entre des souris sauvages et transgéniques fat-1, il serait intéressant de réaliser des transplantations fécales provenant de souris transgéniques fat-1 et sauvages chez des souris axéniques afin d'éviter les biais éventuels en lien avec l'utilisation d'antibiotiques, et ce à la fois sous régime standard et sous régime obésogène.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894, i-xii, 1-253.
- ABATE, N., BURNS, D., PESHOCK, R. M., GARG, A. & GRUNDY, S. M. 1994. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res*, 35, 1490-6.
- ABREU, M. T. 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, 10, 131-44.
- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K. T., XU, S., HOBBS, H. H. & KRIEGER, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-20.
- ALDRIDGE, C., RAZZAK, A., BABCOCK, T. A., HELTON, W. S. & ESPAT, N. J. 2008. Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production is decreased by an omega-3 fatty acid lipid emulsion. *J Surg Res*, 149, 296-302.
- ALLMANN, D. W. & GIBSON, D. M. 1965. Fatty Acid Synthesis during Early Linoleic Acid Deficiency in the Mouse. *J Lipid Res*, 6, 51-62.
- AMAR, J., BURCELIN, R., RUIDAVETS, J. B., CANI, P. D., FAUVEL, J., ALESSI, M. C., CHAMONTIN, B. & FERRIERES, J. 2008. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*, 87, 1219-23.
- AMASHEH, S., FROMM, M. & GUNZEL, D. 2011. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)*, 201, 133-40.
- ANDERSEN, A. D., MOLBAK, L., MICHAELSEN, K. F. & LAURITZEN, L. 2011. Molecular fingerprints of the human fecal microbiota from 9 to 18 months old and the effect of fish oil supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 53, 303-9.
- ANDERSON, P. D., MEHTA, N. N., WOLFE, M. L., HINKLE, C. C., PRUSCINO, L., COMISKEY, L. L., TABITA-MARTINEZ, J., SELLERS, K. F., RICKELS, M. R., AHIMA, R. S. & REILLY, M. P. 2007. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2272-9.
- ANHE, F. F., ROY, D., PILON, G., DUDONNE, S., MATAMOROS, S., VARIN, T. V., GAROFALO, C., MOINE, Q., DESJARDINS, Y., LEVY, E. & MARETTE, A. 2015. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, 64, 872-83.

- ARITA, M., BIANCHINI, F., ALIBERTI, J., SHER, A., CHIANG, N., HONG, S., YANG, R., PETASIS, N. A. & SERHAN, C. N. 2005. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*, 201, 713-22.
- ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D. R., FERNANDES, G. R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J. M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNANDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUROKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H. B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E. G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W. M., BRUNAK, S., DORE, J., META, H. I. T. C., ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H. M., ALMEIDA, M., BRECHOT, C., CARA, C., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FOERSTNER, K. U., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., HUBER, W., VAN HYLCKAMA-VLIEG, J., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KNOL, J., LAKHDARI, O., LAYEC, S., LE ROUX, K., MAGUIN, E., MERIEUX, A., MELO MINARDI, R., M'RINI, C., MULLER, J., OOZEER, R., PARKHILL, J., RENAULT, P., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., SUNAGAWA, S., TORREJON, A., TURNER, K., VANDEMEULEBROUCK, G., VARELA, E., WINOGRADSKY, Y., ZELLER, G., WEISSENBACH, J., EHRLICH, S. D. & BORK, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-80.
- BACKHED, F., DING, H., WANG, T., HOOPER, L. V., KOH, G. Y., NAGY, A., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15718-23.
- BACKHED, F., MANCHESTER, J. K., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 979-84.
- BALKOVETZ, D. F. 2006. Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, F572-9.
- BALTZELL, J. K., WOOTEN, J. T. & OTTO, D. A. 1991. Lipoprotein lipase in rats fed fish oil: apparent relationship to plasma insulin levels. *Lipids*, 26, 289-94.



- BARBER, E., SINCLAIR, A. J. & CAMERON-SMITH, D. 2013. Comparative actions of omega-3 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 89, 359-66.
- BARNARD, M. L., SCHWIESO, J. E., THOMAS, E. L., BELL, J. D., SAEED, N., FROST, G., BLOOM, S. R. & HAJNAL, J. V. 1996. Development of a rapid and efficient magnetic resonance imaging technique for analysis of body fat distribution. *NMR Biomed*, 9, 156-64.
- BASARANOGLU, M., ACBAY, O. & SONSUZ, A. 1999. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 31, 384.
- BASTARD, J. P., MAACHI, M., VAN NHIEU, J. T., JARDEL, C., BRUCKERT, E., GRIMALDI, A., ROBERT, J. J., CAPEAU, J. & HAINQUE, B. 2002. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2084-9.
- BATES, J. M., AKERLUND, J., MITTGE, E. & GUILLEMIN, K. 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2, 371-82.
- BELCHIOR, T., PASCHOAL, V. A., MAGDALON, J., CHIMIN, P., FARIAS, T. M., CHAVES-FILHO, A. B., GORJAO, R., ST-PIERRE, P., MIYAMOTO, S., KANG, J. X., DESHAIES, Y., MARETTE, A. & FESTUCCIA, W. 2015. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation through PPARgamma dependent and independent actions. *Mol Nutr Food Res*.
- BELL, C. G., MEYRE, D., SAMSON, C., BOYLE, C., LECOEUR, C., TAUBER, M., JOURET, B., JAQUET, D., LEVY-MARCHAL, C., CHARLES, M. A., WEILL, J., GIBSON, F., MEIN, C. A., FROGUEL, P. & WALLEY, A. J. 2005. Association of melanin-concentrating hormone receptor 1 5' polymorphism with early-onset extreme obesity. *Diabetes*, 54, 3049-55.
- BELLENGER, J., BELLENGER, S., BATAILLE, A., MASSEY, K. A., NICOLAOU, A., RIALLAND, M., TESSIER, C., KANG, J. X. & NARCE, M. 2011. High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. *Diabetes*, 60, 1090-9.
- BELLENGER, J., BELLENGER, S., CLEMENT, L., MANDARD, S., DIOT, C., POISSON, J. P. & NARCE, M. 2004. A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J*, 18, 773-5.

- BELZER, C. & DE VOS, W. M. 2012. Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia. *ISME J*, 6, 1449-58.
- BEN-AV, P., CROFFORD, L. J., WILDER, R. L. & HLA, T. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372, 83-7.
- BERNET, M. F., BRASSART, D., NEESER, J. R. & SERVIN, A. L. 1994. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35, 483-9.
- BERTACCA, A., CICCARONE, A., CECCHETTI, P., VIANELLO, B., LAURENZA, I., DEL PRATO, S. & BENZI, L. 2007. High insulin levels impair intracellular receptor trafficking in human cultured myoblasts. *Diabetes Res Clin Pract*, 78, 316-23.
- BERTRAND, C., PIGNALOSA, A., WANECQ, E., RANCOULE, C., BATUT, A., DELERUYELLE, S., LIONETTI, L., VALET, P. & CASTAN-LAURELL, I. 2013. Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS One*, 8, e78874.
- BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40, 845-59.
- BHATTACHARYA, A., CHANDRASEKAR, B., RAHMAN, M. M., BANU, J., KANG, J. X. & FERNANDES, G. 2006. Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 925-30.
- BIASUCCI, G., BENENATI, B., MORELLI, L., BESSI, E. & BOEHM, G. 2008. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr*, 138, 1796S-1800S.
- BRANDTZAEG, P. 2001. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogeneses? *Acta Odontol Scand*, 59, 235-43.
- BRENNA, J. T. 2002. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 127-32.
- BRENNER, R. R. 1971. The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 6, 567-75.
- BRENNER, R. R. 2003. Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68, 151-62.
- BRINGER, J., FONTAINE, P., DETOURNAY, B., NACHIT-OUINEKH, F., BRAMI, G. & ESCHWEGE, E. 2009. Prevalence of diagnosed type 2 diabetes mellitus in the French general population: the INSTANT study. *Diabetes Metab*, 35, 25-31.

- BROWN, A. J., GOLDSWORTHY, S. M., BARNES, A. A., EILERT, M. M., TCHEANG, L., DANIELS, D., MUIR, A. I., WIGGLESWORTH, M. J., KINGHORN, I., FRASER, N. J., PIKE, N. B., STRUM, J. C., STEPLEWSKI, K. M., MURDOCK, P. R., HOLDER, J. C., MARSHALL, F. H., SZEKERES, P. G., WILSON, S., IGNAR, D. M., FOORD, S. M., WISE, A. & DOWELL, S. J. 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*, 278, 11312-9.
- BROWNING, L. M. 2007. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 447-453.
- BRUN, P., CASTAGLIUOLO, I., DI LEO, V., BUDA, A., PINZANI, M., PALU, G. & MARTINES, D. 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G518-25.
- BRUUN, J. M., LIHN, A. S., PEDERSEN, S. B. & RICHELSEN, B. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2282-9.
- BURCELIN, R., SERINO, M., CHABO, C., BLASCO-BAQUE, V. & AMAR, J. 2011. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol*, 48, 257-73.
- BURR, G. O. & BURR, M. M. 1973. Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr Rev*, 31, 248-9.
- CAI, D., YUAN, M., FRANTZ, D. F., MELENDEZ, P. A., HANSEN, L., LEE, J. & SHOELSON, S. E. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*, 11, 183-90.
- CALDER, P. C. 2002. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc*, 61, 345-58.
- CALDER, P. C. 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 83, 1505S-1519S.
- CALDER, P. C. 2008. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*, 52, 885-97.
- CALDER, P. C. 2009. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol*, 28, 506-34.
- CALDER, P. C. 2010. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, 2, 355-74.

- CALDER, P. C. 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*, 142, 592S-599S.
- CAMPBELL, E. L., MACMANUS, C. F., KOMINSKY, D. J., KEELY, S., GLOVER, L. E., BOWERS, B. E., SCULLY, M., BRUYNINCKX, W. J. & COLGAN, S. P. 2010. Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14298-303.
- CANI, P. D., AMAR, J., IGLESIAS, M. A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., TUOHY, K. M., CHABO, C., WAGET, A., DELMEE, E., COUSIN, B., SULPICE, T., CHAMONTIN, B., FERRIERES, J., TANTI, J. F., GIBSON, G. R., CASTEILLA, L., DELZENNE, N. M., ALESSI, M. C. & BURCELIN, R. 2007a. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, 1761-72.
- CANI, P. D., BIBILONI, R., KNAUF, C., WAGET, A., NEYRINCK, A. M., DELZENNE, N. M. & BURCELIN, R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 1470-81.
- CANI, P. D. & DELZENNE, N. M. 2007. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10, 729-34.
- CANI, P. D. & DELZENNE, N. M. 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 15, 1546-58.
- CANI, P. D., EVERARD, A. & DUPARC, T. 2013. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol*, 13, 935-40.
- CANI, P. D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., KNAUF, C., BURCELIN, R. G., TUOHY, K. M., GIBSON, G. R. & DELZENNE, N. M. 2007b. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50, 2374-83.
- CANI, P. D., NEYRINCK, A. M., MATON, N. & DELZENNE, N. M. 2005. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*, 13, 1000-7.
- CANI, P. D., POSSEMIERS, S., VAN DE WIELE, T., GUIOT, Y., EVERARD, A., ROTTIER, O., GEURTS, L., NASLAIN, D., NEYRINCK, A., LAMBERT, D. M., MUCCIOLI, G. G. & DELZENNE, N. M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58, 1091-103.

- CAPEAU, J. 2003. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*, 19, 834-9.
- CAPEAU, J. 2008. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab*, 34, 649-57.
- CAPPER, E. A. & MARSHALL, L. A. 2001. Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res*, 40, 167-97.
- CARPENTIER, J. L. 1994. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia*, 37 Suppl 2, S117-24.
- CAVAILLON, J. M., FITTING, C., HAEFFNER-CAVAILLON, N., KIRSCH, S. J. & WARREN, H. S. 1990. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 58, 2375-82.
- CHAN, Y. K., ESTAKI, M. & GIBSON, D. L. 2013. Clinical Consequences of Diet-Induced Dysbiosis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63, 28-40.
- CHANG, H. Y., LEE, H. N., KIM, W. & SURH, Y. J. 2015. Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Life Sci*, 120, 39-47.
- CHAPKIN, R. S., WANG, N., FAN, Y. Y., LUPTON, J. R. & PRIOR, I. A. 2008. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 466-71.
- CHO, H. P., NAKAMURA, M. & CLARKE, S. D. 1999a. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem*, 274, 37335-9.
- CHO, H. P., NAKAMURA, M. T. & CLARKE, S. D. 1999b. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem*, 274, 471-7.
- CHRISTL, S. U., MURGATROYD, P. R., GIBSON, G. R. & CUMMINGS, J. H. 1992. Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology*, 102, 1269-77.
- CINTI, S., MITCHELL, G., BARBATELLI, G., MURANO, I., CERESI, E., FALOIA, E., WANG, S., FORTIER, M., GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46, 2347-55.
- CLARIA, J., DALLI, J., YACOUBIAN, S., GAO, F. & SERHAN, C. N. 2012. Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. *J Immunol*, 189, 2597-605.
- CLARKE, S. D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr*, 131, 1129-32.

- CLARKE, S. D. & JUMP, D. 1997. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57, 65-9.
- CLAVEL, T., DESMARCHELIER, C., HALLER, D., GERARD, P., ROHN, S., LEPAGE, P. & DANIEL, H. 2014. Intestinal microbiota in metabolic diseases: from bacterial community structure and functions to species of pathophysiological relevance. *Gut Microbes*, 5, 544-51.
- COBO, E. R., KISSOON-SINGH, V., MOREAU, F. & CHADEE, K. 2015. Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of beta-defensin 2. *Mucosal Immunol*, 8, 1360-72.
- COHEN, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-91.
- COLDITZ, G. A., WILLETT, W. C., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E., HENNEKENS, C. H., ARKY, R. A. & SPEIZER, F. E. 1990. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol*, 132, 501-13.
- COREY, E. J., SHIH, C. & CASHMAN, J. R. 1983. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3581-4.
- CORNIER, M. A., DABELEA, D., HERNANDEZ, T. L., LINDSTROM, R. C., STEIG, A. J., STOB, N. R., VAN PELT, R. E., WANG, H. & ECKEL, R. H. 2008. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 29, 777-822.
- CORREIA, M., MICHEL, V., MATOS, A. A., CARVALHO, P., OLIVEIRA, M. J., FERREIRA, R. M., DILLIES, M. A., HUERRE, M., SERUCA, R., FIGUEIREDO, C., MACHADO, J. C. & TOUATI, E. 2012. Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One*, 7, e35072.
- COTILLARD, A., KENNEDY, S. P., KONG, L. C., PRIFTI, E., PONS, N., LE CHATELIER, E., ALMEIDA, M., QUINQUIS, B., LEVENEZ, F., GALLERON, N., GOUGIS, S., RIZKALLA, S., BATTO, J. M., RENAULT, P., CONSORTIUM, A. N. R. M., DORE, J., ZUCKER, J. D., CLEMENT, K. & EHRLICH, S. D. 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500, 585-8.
- CREELY, S. J., MCTERNAN, P. G., KUSMINSKI, C. M., FISHER, F. M., DA SILVA, N. F., KHANOLKAR, M., EVANS, M., HARTE, A. L. & KUMAR, S. 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, E740-7.
- CUMMINGS, J. H. & MACFARLANE, G. T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*, 70, 443-59.

- CUNNANE, S. C., RYAN, M. A., NADEAU, C. R., BAZINET, R. P., MUSA-VELOSO, K. & MCCLOY, U. 2003. Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis? *Lipids*, 38, 477-84.
- DAS, U. N. 2005. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72, 343-50.
- DAS, U. N. 2010. Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition*, 26, 459-73.
- DAVIES, J. 2001. In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, 291, 2316.
- DE LA SERRE, C. B., ELLIS, C. L., LEE, J., HARTMAN, A. L., RUTLEDGE, J. C. & RAYBOULD, H. E. 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G440-8.
- DE LUCA, C. & OLEFSKY, J. M. 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*, 582, 97-105.
- DE PRETER, V. & VERBEKE, K. 2013. Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 4, 97-107.
- DEFRONZO, R. A., GUNNARSSON, R., BJORKMAN, O., OLSSON, M. & WAHREN, J. 1985. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 76, 149-55.
- DELGADO, C. L. 2003. Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *J Nutr*, 133, 3907s-3910s.
- DELZENNE, N. M. & CANI, P. D. 2008. [Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]. *Med Sci (Paris)*, 24, 505-10.
- DEOPURKAR, R., GHANIM, H., FRIEDMAN, J., ABUAYSHEH, S., SIA, C. L., MOHANTY, P., VISWANATHAN, P., CHAUDHURI, A. & DANDONA, P. 2010. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care*, 33, 991-7.
- DERRIEN, M., VAUGHAN, E. E., PLUGGE, C. M. & DE VOS, W. M. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1469-76.
- DESPRES, J. P. & LEMIEUX, I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881-7.
- DESVERGNE, B. & WAHLI, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 20, 649-88.

- DETHLEFSEN, L., ECKBURG, P. B., BIK, E. M. & RELMAN, D. A. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*, 21, 517-23.
- DI MAURO, A., NEU, J., RIEZZO, G., RAIMONDI, F., MARTINELLI, D., FRANCAVILLA, R. & INDRIO, F. 2013. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr*, 39, 15.
- DIETZ, W. H., JR. & GORTMAKER, S. L. 1985. Do we fatten our children at the television set? Obesity and television viewing in children and adolescents. *Pediatrics*, 75, 807-12.
- DING, W. J., WANG, Y. & FAN, J. G. 2014. Regulation of adipokines by polyunsaturated fatty acids in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Arch Iran Med*, 17, 563-8.
- DREWNOWSKI, A. & POPKIN, B. M. 1997. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nutr Rev*, 55, 31-43.
- DUNCAN, S. H., LOUIS, P. & FLINT, H. J. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol*, 44, 343-50.
- DURNIN, J. V. & WOMERSLEY, J. 1974. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr*, 32, 77-97.
- DYERBERG, J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr Rev*, 44, 125-34.
- DYERBERG, J. & JORGENSEN, K. A. 1982. Marine oils and thrombogenesis. *Prog Lipid Res*, 21, 255-69.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-8.
- ECKEL, R. H. 1992. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet*, 340, 1452-3.
- EGGER, G. J., VOGELS, N. & WESTERTERP, K. R. 2001. Estimating historical changes in physical activity levels. *Med J Aust*, 175, 635-6.
- ELIN, R. J. & WOLFF, S. M. 1976. Biology of endotoxin. *Annu Rev Med*, 27, 127-41.
- ELKOUBY-NAOR, L. & BEN-YOSEF, T. 2010. Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems. *Int Rev Cell Mol Biol*, 279, 1-32.
- ENDRES, S., GHORBANI, R., KELLEY, V. E., GEORGILIS, K., LONNEMANN, G., VAN DER MEER, J. W., CANNON, J. G., ROGERS, T. S., KLEMPNER, M. S., WEBER, P. C. & ET AL. 1989. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty



- acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, 320, 265-71.
- ERRIDGE, C., ATTINA, T., SPICKETT, C. M. & WEBB, D. J. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*, 86, 1286-92.
- ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E. & POXTON, I. R. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, 4, 837-51.
- ETZOLD, S. & JUGE, N. 2014. Structural insights into bacterial recognition of intestinal mucins. *Curr Opin Struct Biol*, 28, 23-31.
- EVERARD, A., BELZER, C., GEURTS, L., OUWERKERK, J. P., DRUART, C., BINDELS, L. B., GUIOT, Y., DERRIEN, M., MUCCIOLI, G. G., DELZENNE, N. M., DE VOS, W. M. & CANI, P. D. 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9066-71.
- EZAKI, O., TSUJI, E., MOMOMURA, K., KASUGA, M. & ITAKURA, H. 1992. Effects of fish and safflower oil feeding on subcellular glucose transporter distributions in rat adipocytes. *Am J Physiol*, 263, E94-101.
- FANARO, S., CHERICI, R., GUERRINI, P. & VIGI, V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, 91, 48-55.
- FARHADI, A., GUNDLAPALLI, S., SHAIKH, M., FRANTZIDES, C., HARRELL, L., KWASNY, M. M. & KESHAVARZIAN, A. 2008. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 28, 1026-33.
- FAVIER, C. F., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M. & AKKERMANS, A. D. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, 68, 219-26.
- FEDOR, D. & KELLEY, D. S. 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12, 138-46.
- FEINMARK, S. J. & CORNICELLI, J. A. 1997. Is there a role for 15-lipoxygenase in atherogenesis? *Biochem Pharmacol*, 54, 953-9.
- FESKENS, E. J., BOWLES, C. H. & KROMHOUT, D. 1991. Inverse association between fish intake and risk of glucose intolerance in normoglycemic elderly men and women. *Diabetes Care*, 14, 935-41.
- FETTERMAN, J. W., JR. & ZDANOWICZ, M. M. 2009. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm*, 66, 1169-79.

- FIELD, C. J., RYAN, E. A., THOMSON, A. B. & CLANDININ, M. T. 1988. Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J*, 253, 417-24.
- FIGUERAS, M., OLIVAN, M., BUSQUETS, S., LOPEZ-SORIANO, F. J. & ARGILES, J. M. 2011. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status. *Obesity (Silver Spring)*, 19, 362-9.
- FLACHS, P., HORAKOVA, O., BRAUNER, P., ROSSMEISL, M., PECINA, P., FRANSEN-VAN HAL, N., RUZICKOVA, J., SPONAROVA, J., DRAHOTA, Z., VLCEK, C., KEIJER, J., HOUSTEK, J. & KOPECKY, J. 2005. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48, 2365-75.
- FLACHS, P., MOHAMED-ALI, V., HORAKOVA, O., ROSSMEISL, M., HOSSEINZADEH-ATTAR, M. J., HENSLER, M., RUZICKOVA, J. & KOPECKY, J. 2006. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 49, 394-7.
- FLACHS, P., ROSSMEISL, M., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2009. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)*, 116, 1-16.
- FLACHS, P., ROSSMEISL, M. & KOPECKY, J. 2014. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res*, 63 Suppl 1, S93-118.
- FLINT, H. J., BAYER, E. A., RINCON, M. T., LAMED, R. & WHITE, B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*, 6, 121-31.
- FORBES, G. B. & REINA, J. C. 1970. Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism*, 19, 653-63.
- FRANCIS, G. A., FAYARD, E., PICARD, F. & AUWERX, J. 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, 65, 261-311.
- FRANKEL, W. L., ZHANG, W., SINGH, A., KLURFELD, D. M., DON, S., SAKATA, T., MODLIN, I. & ROMBEAU, J. L. 1994. Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology*, 106, 375-80.
- FRUHBECK, G. 2008. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*, 456, 1-22.

- FULLER, N. J., HARDINGHAM, C. R., GRAVES, M., SCREATON, N., DIXON, A. K., WARD, L. C. & ELIA, M. 1999. Assessment of limb muscle and adipose tissue by dual-energy X-ray absorptiometry using magnetic resonance imaging for comparison. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23, 1295-302.
- FURUSE, M., ITOH, M., HIRASE, T., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 127, 1617-26.
- GAMMELMARK, A., MADSEN, T., VARMING, K., LUNDBYE-CHRISTENSEN, S. & SCHMIDT, E. B. 2012. Low-dose fish oil supplementation increases serum adiponectin without affecting inflammatory markers in overweight subjects. *Nutr Res*, 32, 15-23.
- GARG, M. L., SEBOKOVA, E., THOMSON, A. B. & CLANDININ, M. T. 1988. Delta 6-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or omega 3 fatty acids. *Biochem J*, 249, 351-6.
- GAUTIER, T., KLEIN, A., DECKERT, V., DESRUMAUX, C., OGIER, N., SBERNA, A. L., PAUL, C., LE GUERN, N., ATHIAS, A., MONTANGE, T., MONIER, S., PIARD, F., JIANG, X. C., MASSON, D. & LAGROST, L. 2008. Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J Biol Chem*, 283, 18702-10.
- GERARD, P., LEPERCQ, P., LECLERC, M., GAVINI, F., RAIBAUD, P. & JUSTE, C. 2007. Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5742-9.
- GETHER, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21, 90-113.
- GEURTS, L., LAZAREVIC, V., DERRIEN, M., EVERARD, A., VAN ROYE, M., KNAUF, C., VALET, P., GIRARD, M., MUCCIOLI, G. G., FRANCOIS, P., DE VOS, W. M., SCHRENZEL, J., DELZENNE, N. M. & CANI, P. D. 2011. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol*, 2, 149.
- GHIBAUDI, L., COOK, J., FARLEY, C., VAN HEEK, M. & HWA, J. J. 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*, 10, 956-63.
- GHOSH, S., DECOFFE, D., BROWN, K., RAJENDIRAN, E., ESTAKI, M., DAI, C., YIP, A. & GIBSON, D. L. 2013. Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One*, 8, e55468.

- GHOSHAL, S., WITTA, J., ZHONG, J., DE VILLIERS, W. & ECKHARDT, E. 2009. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*, 50, 90-7.
- GILLAM, M., NOTO, A., ZAHRADKA, P. & TAYLOR, C. G. 2009. Improved n-3 fatty acid status does not modulate insulin resistance in fa/fa Zucker rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81, 331-9.
- GIRALT, M. & VILLARROYA, F. 2013. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, 154, 2992-3000.
- GIRARD, J. 2005. [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action. mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)*, 21 Spec No, 19-25.
- GLOMSET, J. A. 1968. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, 9, 155-67.
- GOLDBERG, R. F., AUSTEN, W. G., JR., ZHANG, X., MUNENE, G., MOSTAFA, G., BISWAS, S., MCCORMACK, M., EBERLIN, K. R., NGUYEN, J. T., TATLIDEDE, H. S., WARREN, H. S., NARISAWA, S., MILLAN, J. L. & HODIN, R. A. 2008. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3551-6.
- GOLDSTEIN, B. J., AHMAD, F., DING, W., LI, P. M. & ZHANG, W. R. 1998. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem*, 182, 91-9.
- GONZALEZ-PERIZ, A. & CLARIA, J. 2010. Resolution of adipose tissue inflammation. *ScientificWorldJournal*, 10, 832-56.
- GONZALEZ-PERIZ, A., HERRILLO, R., FERRE, N., GRONERT, K., DONG, B., MORAN-SALVADOR, E., TITOS, E., MARTINEZ-CLEMENTE, M., LOPEZ-PARRA, M., ARROYO, V. & CLARIA, J. 2009. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*, 23, 1946-57.
- GORDON, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3, 23-35.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- GRAVAGHI, C., LA PERLE, K. M., OGRODWSKI, P., KANG, J. X., QUIMBY, F., LIPKIN, M. & LAMPRECHT, S. A. 2011. Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. *J Nutr Biochem*, 22, 360-5.

- GROSCHWITZ, K. R. & HOGAN, S. P. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 3-20; quiz 21-2.
- GROUP, N. H. W., PETERSON, J., GARGES, S., GIOVANNI, M., MCINNES, P., WANG, L., SCHLOSS, J. A., BONAZZI, V., MCEWEN, J. E., WETTERSTRAND, K. A., DEAL, C., BAKER, C. C., DI FRANCESCO, V., HOWCROFT, T. K., KARP, R. W., LUNSFORD, R. D., WELLINGTON, C. R., BELACHEW, T., WRIGHT, M., GIBLIN, C., DAVID, H., MILLS, M., SALOMON, R., MULLINS, C., AKOLKAR, B., BEGG, L., DAVIS, C., GRANDISON, L., HUMBLE, M., KHALSA, J., LITTLE, A. R., PEAVY, H., PONTZER, C., PORTNOY, M., SAYRE, M. H., STARKE-REED, P., ZAKHARI, S., READ, J., WATSON, B. & GUYER, M. 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*, 19, 2317-23.
- GUESNET, P., ALESSANDRI, J.-M., ASTORG, P., PIFFERI, F. & LAVIALLE, M. 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12, 333-343.
- GUILLEMOT, L., PASCHOUD, S., PULIMENO, P., FOGLIA, A. & CITI, S. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 601-13.
- GUILLOU, H., ZADRAVEC, D., MARTIN, P. G. & JACOBSSON, A. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, 49, 186-99.
- GULICK, T., CRESCI, S., CAIRA, T., MOORE, D. D. & KELLY, D. P. 1994. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11012-6.
- GUO, W., XIE, W., LEI, T. & HAMILTON, J. A. 2005. Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates beta-oxidation in adipocytes. *Lipids*, 40, 815-21.
- HAMPTON, R. Y., GOLENBOCK, D. T., PENMAN, M., KRIEGER, M. & RAETZ, C. R. 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 352, 342-4.
- HAMPTON, R. Y. & RAETZ, C. R. 1991. Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation. *J Biol Chem*, 266, 19499-509.
- HAN, T. S., KELLY, I. E., WALSH, K., GREENE, R. M. & LEAN, M. E. 1997a. Relationship between volumes and areas from single transverse scans of intra-abdominal fat measured by magnetic resonance imaging. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21, 1161-6.

- HAN, T. S., MCNEILL, G., SEIDELL, J. C. & LEAN, M. E. 1997b. Predicting intra-abdominal fatness from anthropometric measures: the influence of stature. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21, 587-93.
- HAN, T. S., SEIDELL, J. C., CURRALL, J. E., MORRISON, C. E., DEURENBERG, P. & LEAN, M. E. 1997c. The influences of height and age on waist circumference as an index of adiposity in adults. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21, 83-9.
- HANADA, H., MORIKAWA, K., HIROTA, K., NONAKA, M. & UMEHARA, Y. 2011. Induction of apoptosis and lipogenesis in human preadipocyte cell line by n-3 PUFAs. *Cell Biol Int*, 35, 51-9.
- HANNAH, V. C., OU, J., LUONG, A., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*, 276, 4365-72.
- HARRIS, H. W., GRUNFELD, C., FEINGOLD, K. R., READ, T. E., KANE, J. P., JONES, A. L., EICHBAUM, E. B., BLAND, G. F. & RAPP, J. H. 1993. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest*, 91, 1028-34.
- HARRIS, W. S. 1989. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J Lipid Res*, 30, 785-807.
- HASSAN, A., IBRAHIM, A., MBODJI, K., COEFFIER, M., ZIEGLER, F., BOUNOURE, F., CHARDIGNY, J. M., SKIBA, M., SAVOYE, G., DECHELOTTE, P. & MARION-LETELLIER, R. 2010. An alpha-linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF-kappaB in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr*, 140, 1714-21.
- HAUSMAN, D. B., MCCLOSKEY, H. M. & MARTIN, R. J. 1991. Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. *J Nutr*, 121, 1917-23.
- HELLMANN, J., TANG, Y., KOSURI, M., BHATNAGAR, A. & SPITE, M. 2011. Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. *FASEB J*, 25, 2399-407.
- HENSLER, M., BARDOVA, K., JILKOVA, Z. M., WAHLI, W., MEZTGER, D., CHAMBON, P., KOPECKY, J. & FLACHS, P. 2011. The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. *Lipids Health Dis*, 10, 128.
- HEUMANN, D. & ROGER, T. 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*, 323, 59-72.

- HILDEBRANDT, M. A., HOFFMANN, C., SHERRILL-MIX, S. A., KEILBAUGH, S. A., HAMADY, M., CHEN, Y. Y., KNIGHT, R., AHIMA, R. S., BUSHMAN, F. & WU, G. D. 2009. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137, 1716-24 e1-2.
- HIMMS-HAGEN, J. 1997. On raising energy expenditure in ob/ob mice. *Science*, 276, 1132-3.
- HIRASAWA, A., TSUMAYA, K., AWAJI, T., KATSUMA, S., ADACHI, T., YAMADA, M., SUGIMOTO, Y., MIYAZAKI, S. & TSUJIMOTO, G. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11, 90-4.
- HOLMAN, R. T., JOHNSON, S. B. & HATCH, T. F. 1982. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*, 35, 617-23.
- HONG, C. & TONTONOZ, P. 2008. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 461-7.
- HONG, S., GRONERT, K., DEVCHAND, P. R., MOUSSIGNAC, R. L. & SERHAN, C. N. 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*, 278, 14677-87.
- HOOPER, L. V. & GORDON, J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 1115-8.
- HORNSTRA, G., AL, M. D., VAN HOUWELINGEN, A. C. & FOREMAN-VAN DRONGELEN, M. M. 1995. Essential fatty acids in pregnancy and early human development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 61, 57-62.
- HOSSAIN, P., KAWAR, B. & EL NAHAS, M. 2007. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*, 356, 213-5.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91.
- HOWARD, F. A. & HENDERSON, C. 1999. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 29, 193-6.
- HOWARTH, A. G. & STEVENSON, B. R. 1995. Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 31, 323-32.
- HUA, Q. 2010. Insulin: a small protein with a long journey. *Protein Cell*, 1, 537-51.

- HUANG, F., WEI, H., LUO, H., JIANG, S. & PENG, J. 2011. EPA inhibits the inhibitor of kappaBalpha (IkappaBalpha)/NF-kappaB/muscle RING finger 1 pathway in C2C12 myotubes in a PPARgamma-dependent manner. *Br J Nutr*, 105, 348-56.
- HUDERT, C. A., WEYLANDT, K. H., LU, Y., WANG, J., HONG, S., DIGNASS, A., SERHAN, C. N. & KANG, J. X. 2006. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11276-81.
- IKEDA, M., KIHARA, A. & IGARASHI, Y. 2006. Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull*, 29, 1542-6.
- INNIS, S. M., DAI, C., WU, X., BUCHAN, A. M. & JACOBSON, K. 2010. Perinatal lipid nutrition alters early intestinal development and programs the response to experimental colitis in young adult rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G1376-85.
- INVESTIGATORS, I. B. D. I. E. S., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., BERGMANN, M. M., NAGEL, G., LINSEISEN, J., HALLMANS, G., PALMQVIST, R., SJODIN, H., HAGGLUND, G., BERGLUND, G., LINDGREN, S., GRIP, O., PALLI, D., DAY, N. E., KHAW, K. T., BINGHAM, S., RIBOLI, E., KENNEDY, H. & HART, A. 2009. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut*, 58, 1606-11.
- ISHIDA, T., YOSHIDA, M., ARITA, M., NISHITANI, Y., NISHIUMI, S., MASUDA, A., MIZUNO, S., TAKAGAWA, T., MORITA, Y., KUTSUMI, H., INOKUCHI, H., SERHAN, C. N., BLUMBERG, R. S. & AZUMA, T. 2010. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 87-95.
- ITARIU, B. K., ZEYDA, M., HOCHBRUGGER, E. E., NEUHOFER, A., PRAGER, G., SCHINDLER, K., BOHDJALIAN, A., MASCHER, D., VANGALA, S., SCHRANZ, M., KREBS, M., BISCHOF, M. G. & STULNIG, T. M. 2012. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 96, 1137-49.
- ITOH, M., NAGAFUCHI, A., MOROI, S. & TSUKITA, S. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*, 138, 181-92.
- ITOH, M., SUGANAMI, T., SATOH, N., TANIMOTO-KOYAMA, K., YUAN, X., TANAKA, M., KAWANO, H., YANO, T., AOE, S., TAKEYA, M., SHIMATSU, A., KUZUYA, H., KAMEI, Y. & OGAWA, Y. 2007. Increased adiponectin secretion by highly purified



- eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1918-25.
- ITOH, Y., KAWAMATA, Y., HARADA, M., KOBAYASHI, M., FUJII, R., FUKUSUMI, S., OGI, K., HOSOYA, M., TANAKA, Y., UEJIMA, H., TANAKA, H., MARUYAMA, M., SATOH, R., OKUBO, S., KIZAWA, H., KOMATSU, H., MATSUMURA, F., NOGUCHI, Y., SHINOHARA, T., HINUMA, S., FUJISAWA, Y. & FUJINO, M. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422, 173-6.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. & MISSET, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 15, 29-63.
- JAGER, J., GREMEAUX, T., CORMONT, M., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. & TANTI, J. F. 2007. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 148, 241-51.
- JAKOBSSON, A., WESTERBERG, R. & JACOBSSON, A. 2006. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*, 45, 237-49.
- JAKOBSSON, H. E., RODRIGUEZ-PINEIRO, A. M., SCHUTTE, A., ERMUND, A., BOYSEN, P., BEMARK, M., SOMMER, F., BACKHED, F., HANSSON, G. C. & JOHANSSON, M. E. 2015. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep*, 16, 164-77.
- JAN, S., GUILLOU, H., D'ANDREA, S., DAVAL, S., BOURIEL, M., RIOUX, V. & LEGRAND, P. 2004. Myristic acid increases delta6-desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Reprod Nutr Dev*, 44, 131-40.
- JANOVSKA, P., FLACHS, P., KAZDOVA, L. & KOPECKY, J. 2013. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. *Physiol Res*, 62, 153-61.
- JEBB, S. A. & ELIA, M. 1993. Techniques for the measurement of body composition: a practical guide. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 17, 611-21.
- JEBB, S. A., GOLDBERG, G. R., JENNINGS, G. & ELIA, M. 1995. Dual-energy X-ray absorptiometry measurements of body composition: effects of depth and tissue thickness, including comparisons with direct analysis. *Clin Sci (Lond)*, 88, 319-24.
- JEFFCOAT, R., DUNTON, A. P. & JAMES, A. T. 1978. Evidence for the different responses of delta9-, delta6- and delta5-fatty acyl-CoA desaturases to cytoplasmic proteins. *Biochim Biophys Acta*, 528, 28-35.

- JI, S., HARDY, R. W. & WOOD, P. A. 2009. Transgenic expression of n-3 fatty acid desaturase (fat-1) in C57/BL6 mice: Effects on glucose homeostasis and body weight. *J Cell Biochem*, 107, 809-17.
- JIANG, C., TING, A. T. & SEED, B. 1998a. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-6.
- JIANG, W. G., BRYCE, R. P., HORROBIN, D. F. & MANSEL, R. E. 1998b. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 414-20.
- JOHNSTON, S. L., SOUTER, D. M., TOLKAMP, B. J., GORDON, I. J., ILLIUS, A. W., KYRIAZAKIS, I. & SPEAKMAN, J. R. 2007. Intake compensates for resting metabolic rate variation in female C57BL/6J mice fed high-fat diets. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 600-6.
- JONES, B. H., MAHER, M. A., BANZ, W. J., ZEMEL, M. B., WHELAN, J., SMITH, P. J. & MOUSTAID, N. 1996. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol*, 271, E44-9.
- JUMP, D. B., CLARKE, S. D., THELEN, A. & LIIMATTA, M. 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 35, 1076-84.
- KAHN, B. B. & FLIER, J. S. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 106, 473-81.
- KALIANNAN, K., WANG, B., LI, X. Y., KIM, K. J. & KANG, J. X. 2015. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep*, 5, 11276.
- KALUPAHANA, N. S., CLAYCOMBE, K., NEWMAN, S. J., STEWART, T., SIRIWARDHANA, N., MATTHAN, N., LICHTENSTEIN, A. H. & MOUSTAID-MOUSSA, N. 2010. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr*, 140, 1915-22.
- KANG, J. X. 2007. Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 263-7.
- KANG, J. X., WANG, J., WU, L. & KANG, Z. B. 2004. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, 427, 504.
- KANG, Z. B., GE, Y., CHEN, Z., CLUETTE-BROWN, J., LAPOSATA, M., LEAF, A. & KANG, J. X. 2001. Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4050-4.

- KASBI CHADLI, F., ANDRE, A., PRIEUR, X., LOIRAND, G., MEYNIER, A., KREMPF, M., NGUYEN, P. & OUGUERRAM, K. 2012. n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br J Nutr*, 107, 1305-15.
- KATCH, F., MICHAEL, E. D. & HORVATH, S. M. 1967. Estimation of body volume by underwater weighing: description of a simple method. *J Appl Physiol*, 23, 811-3.
- KELLY, C. J., COLGAN, S. P. & FRANK, D. N. 2012. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. *Nutr Clin Pract*, 27, 215-25.
- KIM, H. K., DELLA-FERA, M., LIN, J. & BAILE, C. A. 2006. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr*, 136, 2965-9.
- KIM, S. J., CHOI, Y., CHOI, Y. H. & PARK, T. 2012. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem*, 23, 113-22.
- KITCHENS, R. L., THOMPSON, P. A., MUNFORD, R. S. & O'KEEFE, G. E. 2003. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J Lipid Res*, 44, 2339-48.
- KOENIG, J. E., SPOR, A., SCALFONE, N., FRICKER, A. D., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., ANGENENT, L. T. & LEY, R. E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4578-85.
- KONO, H., FUJII, H., OGIKU, M., TSUCHIYA, M., ISHII, K. & HARA, M. 2010. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res*, 156, 282-91.
- KOUTROBAKIS, I. E., XIDAKIS, C., KARMIRIS, K., SFIRIDAKI, A., KANDIDAKI, E. & KOUROUMALIS, E. A. 2004. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, 49, 1758-62.
- KOYAMA, I., MATSUNAGA, T., HARADA, T., HOKARI, S. & KOMODA, T. 2002. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. *Clin Biochem*, 35, 455-61.
- KREMMYDA, L. S., TVRZICKA, E., STANKOVA, B. & ZAK, A. 2011. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155, 195-218.

- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., APPEL, L. J. & NUTRITION, C. 2003. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, e20-30.
- KROETZ, D. L., YOOK, P., COSTET, P., BIANCHI, P. & PINEAU, T. 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem*, 273, 31581-9.
- KUDA, O., JELENIK, T., JILKOVA, Z., FLACHS, P., ROSSMEISL, M., HENSLER, M., KAZDOVA, L., OGSTON, N., BARANOWSKI, M., GORSKI, J., JANOVSKA, P., KUS, V., POLAK, J., MOHAMED-ALI, V., BURCELIN, R., CINTI, S., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2009. n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 52, 941-51.
- KVIST, H., SJOSTROM, L. & TYLEN, U. 1986. Adipose tissue volume determinations in women by computed tomography: technical considerations. *Int J Obes*, 10, 53-67.
- LAGIER, J. C., MILLION, M., HUGON, P., ARMOUGOM, F. & RAOULT, D. 2012. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 136.
- LAGO, F., DIEGUEZ, C., GOMEZ-REINO, J. & GUALILLO, O. 2007. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18, 313-25.
- LAM, Y. Y., HA, C. W., CAMPBELL, C. R., MITCHELL, A. J., DINUDOM, A., OSCARSSON, J., COOK, D. I., HUNT, N. H., CATERSON, I. D., HOLMES, A. J. & STORLIEN, L. H. 2012. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*, 7, e34233.
- LAMPING, N., DETTMER, R., SCHRODER, N. W., PFEIL, D., HALLATSCHEK, W., BURGER, R. & SCHUMANN, R. R. 1998. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest*, 101, 2065-71.
- LAUGERETTE, F., ALLIGIER, M., BASTARD, J. P., DRAI, J., CHANSEAUME, E., LAMBERT-PORCHERON, S., LAVILLE, M., MORIO, B., VIDAL, H. & MICHALSKI, M. C. 2014. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res*, 58, 1513-8.
- LAUGERETTE, F., FURET, J. P., DEBARD, C., DAIRA, P., LOIZON, E., GELOEN, A., SOULAGE, C. O., SIMONET, C., LEFILS-LACOURTABLAISE, J., BERNOUD-HUBAC, N., BODENNEC, J., PERETTI, N., VIDAL, H. & MICHALSKI, M. C. 2012.

- Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, E374-86.
- LAUKOETTER, M. G., NAVA, P., LEE, W. Y., SEVERSON, E. A., CAPALDO, C. T., BABBIN, B. A., WILLIAMS, I. R., KOVAL, M., PEATMAN, E., CAMPBELL, J. A., DERMODY, T. S., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*, 204, 3067-76.
- LAURITZEN, L., HANSEN, H. S., JORGENSEN, M. H. & MICHAELSEN, K. F. 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*, 40, 1-94.
- LEAN, M. E., HAN, T. S. & MORRISON, C. E. 1995. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*, 311, 158-61.
- LEBOVITZ, H. E. 1999. Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem*, 45, 1339-45.
- LEE, S., GURA, K. M., KIM, S., ARSENAULT, D. A., BISTRIAN, B. R. & PUDER, M. 2006. Current clinical applications of omega-6 and omega-3 fatty acids. *Nutr Clin Pract*, 21, 323-41.
- LEE, T. H., MENCIA-HUERTA, J. M., SHIH, C., COREY, E. J., LEWIS, R. A. & AUSTEN, K. F. 1984. Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J Clin Invest*, 74, 1922-33.
- LEONARD, A. E., PEREIRA, S. L., SPRECHER, H. & HUANG, Y. S. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 43, 36-54.
- LEUWER, M., WELTERS, I., MARX, G., RUSHTON, A., BAO, H., HUNTER, L. & TRAYHURN, P. 2009. Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice. *Pflugers Arch*, 457, 731-41.
- LEVELS, J. H., ABRAHAM, P. R., VAN DEN ENDE, A. & VAN DEVENTER, S. J. 2001. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun*, 69, 2821-8.
- LEVINE, D. M., PARKER, T. S., DONNELLY, T. M., WALSH, A. & RUBIN, A. L. 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 12040-4.
- LEVINE, J. A., LANNINGHAM-FOSTER, L. M., MCCRADY, S. K., KRIZAN, A. C., OLSON, L. R., KANE, P. H., JENSEN, M. D. & CLARK, M. M. 2005. Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity. *Science*, 307, 584-6.
- LEVY, B. D. 2010. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82, 327-32.

- LEY, R. E. 2010. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*, 26, 5-11.
- LEY, R. E., BACKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11070-5.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-3.
- LI, J., LI, F. R., WEI, D., JIA, W., KANG, J. X., STEFANOVIC-RACIC, M., DAI, Y. & ZHAO, A. Z. 2014a. Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol*, 28, 1316-28.
- LI, Q., ZHANG, Q., WANG, M., ZHAO, S., MA, J., LUO, N., LI, N., LI, Y., XU, G. & LI, J. 2008a. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol*, 126, 67-80.
- LI, Q., ZHANG, Q., WANG, M., ZHAO, S., XU, G. & LI, J. 2008b. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*, 45, 1356-65.
- LI, Q., ZHANG, Q., ZHANG, M., WANG, C., ZHU, Z., LI, N. & LI, J. 2008c. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *FEBS J*, 275, 411-20.
- LI, X., BALLANTYNE, L. L., CHE, X., MEWBURN, J. D., KANG, J. X., BARKLEY, R. M., MURPHY, R. C., YU, Y. & FUNK, C. D. 2015. Endogenously generated omega-3 fatty acids attenuate vascular inflammation and neointimal hyperplasia by interaction with free fatty acid receptor 4 in mice. *J Am Heart Assoc*, 4.
- LI, Y., WANG, X., LI, N. & LI, J. 2014b. The study of n-3PUFAs protecting the intestinal barrier in rat HS/R model. *Lipids Health Dis*, 13, 146.
- LIU, T., HOUGEN, H., VOLLMER, A. C. & HIEBERT, S. M. 2012a. Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe*, 18, 331-7.
- LIU, Y., CHEN, F., ODLE, J., LIN, X., JACOBI, S. K., ZHU, H., WU, Z. & HOU, Y. 2012b. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *J Nutr*, 142, 2017-24.
- LODHI, I. J., YIN, L., JENSEN-URSTAD, A. P., FUNAI, K., COLEMAN, T., BAIRD, J. H., EL RAMAHI, M. K., RAZANI, B., SONG, H., FU-HSU, F., TURK, J. & SEMENKOVICH, C. F. 2012. Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms

- thermogenesis and PPARgamma activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metab*, 16, 189-201.
- LOMBARDO, Y. B. & CHICCO, A. G. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem*, 17, 1-13.
- LOPEZ-VICARIO, C., ALCARAZ-QUILES, J., GARCIA-ALONSO, V., RIUS, B., HWANG, S. H., TITOS, E., LOPATEGI, A., HAMMOCK, B. D., ARROYO, V. & CLARIA, J. 2015. Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 536-41.
- LORENTE-CEBRIAN, S., BUSTOS, M., MARTI, A., MARTINEZ, J. A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2010. Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res*, 54 Suppl 1, S104-11.
- LOWRY, S. F. & THOMPSON, W. A., 3RD 1994. Nutrient modification of inflammatory mediator production. *New Horiz*, 2, 164-74.
- LUKASKI, H. C. 1987. Methods for the assessment of human body composition: traditional and new. *Am J Clin Nutr*, 46, 537-56.
- LUKIW, W. J., CUI, J. G., MARCHESELLI, V. L., BODKER, M., BOTKJAER, A., GOTLINGER, K., SERHAN, C. N. & BAZAN, N. G. 2005. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 115, 2774-83.
- LUMENG, C. N., DEYOUNG, S. M., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. 2007. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 56, 16-23.
- MA, D. W., SEO, J., DAVIDSON, L. A., CALLAWAY, E. S., FAN, Y. Y., LUPTON, J. R. & CHAPKIN, R. S. 2004. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J*, 18, 1040-2.
- MACDONALD, I. A., BOKKENHEUSER, V. D., WINTER, J., MCLERNON, A. M. & MOSBACH, E. H. 1983. Degradation of steroids in the human gut. *J Lipid Res*, 24, 675-700.
- MACFARLANE, G. T., CUMMINGS, J. H. & ALLISON, C. 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*, 132, 1647-56.
- MAHOWALD, M. A., REY, F. E., SEEDORF, H., TURNBAUGH, P. J., FULTON, R. S., WOLLAM, A., SHAH, N., WANG, C., MAGRINI, V., WILSON, R. K., CANTAREL,

- B. L., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., CROCK, L. W., RUSSELL, A., VERBERKMOES, N. C., HETTICH, R. L. & GORDON, J. I. 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5859-64.
- MALO, M. S., ALAM, S. N., MOSTAFA, G., ZELLER, S. J., JOHNSON, P. V., MOHAMMAD, N., CHEN, K. T., MOSS, A. K., RAMASAMY, S., FARUQUI, A., HODIN, S., MALO, P. S., EBRAHIMI, F., BISWAS, B., NARISAWA, S., MILLAN, J. L., WARREN, H. S., KAPLAN, J. B., KITTS, C. L., HOHMANN, E. L. & HODIN, R. A. 2010. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*, 59, 1476-84.
- MANCO, M., PUTIGNANI, L. & BOTTAZZO, G. F. 2010. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev*, 31, 817-44.
- MANDARD, S., MULLER, M. & KERSTEN, S. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*, 61, 393-416.
- MANI, V., HOLLIS, J. H. & GABLER, N. K. 2013. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab (Lond)*, 10, 6.
- MANICKAM, E., SINCLAIR, A. J. & CAMERON-SMITH, D. 2010. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health Dis*, 9, 57.
- MARCHESELLI, V. L., HONG, S., LUKIW, W. J., TIAN, X. H., GRONERT, K., MUSTO, A., HARDY, M., GIMENEZ, J. M., CHIANG, N., SERHAN, C. N. & BAZAN, N. G. 2003. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, 278, 43807-17.
- MARCOS, V., LATZIN, P., HECTOR, A., SONANINI, S., HOFFMANN, F., LACHER, M., KOLLER, B., BUFLER, P., NICOLAI, T., HARTL, D. & GRIESE, M. 2010. Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir Res*, 11, 32.
- MASLOWSKI, K. M. & MACKAY, C. R. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*, 12, 5-9.
- MATSUNAGA, H., HOKARI, R., KURIHARA, C., OKADA, Y., TAKEBAYASHI, K., OKUDAIRA, K., WATANABE, C., KOMOTO, S., NAKAMURA, M., TSUZUKI, Y., KAWAGUCHI, A., NAGAO, S., ITOH, K. & MIURA, S. 2008. Omega-3 fatty acids



- exacerbate DSS-induced colitis through decreased adiponectin in colonic subepithelial myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 1348-57.
- MATSUNAGA, H., HOKARI, R., KURIHARA, C., OKADA, Y., TAKEBAYASHI, K., OKUDAIRA, K., WATANABE, C., KOMOTO, S., NAKAMURA, M., TSUZUKI, Y., KAWAGUCHI, A., NAGAO, S. & MIURA, S. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate the severity of ileitis in the senescence accelerated mice (SAM)P1/Yit mice model. *Clin Exp Immunol*, 158, 325-33.
- MAURY, E. & BRICHARD, S. M. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314, 1-16.
- MAUS, U., HEROLD, S., MUTH, H., MAUS, R., ERMERT, L., ERMERT, M., WEISSMANN, N., ROSSEAU, S., SEEGER, W., GRIMMINGER, F. & LOHMEYER, J. 2001. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280, L58-68.
- MAZEN, I., EL-GAMMAL, M., ABDEL-HAMID, M. & AMR, K. 2009. A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Mol Genet Metab*, 97, 305-8.
- MCARDLE, M. A., FINUCANE, O. M., CONNAUGHTON, R. M., MCMORROW, A. M. & ROCHE, H. M. 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 52.
- MCNEIL, N. I. 1984. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr*, 39, 338-42.
- MEIJERINK, J., PLASTINA, P., VINCKEN, J. P., POLAND, M., ATTYA, M., BALVERS, M., GRUPPEN, H., GABRIELE, B. & WITKAMP, R. F. 2011. The ethanolamide metabolite of DHA, docosahexaenylethanolamine, shows immunomodulating effects in mouse peritoneal and RAW264.7 macrophages: evidence for a new link between fish oil and inflammation. *Br J Nutr*, 105, 1798-807.
- MENDIS, S., DAVIS, S. & NORRVING, B. 2015. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke*, 46, e121-2.
- MIELE, L., VALENZA, V., LA TORRE, G., MONTALTO, M., CAMMAROTA, G., RICCI, R., MASCIANA, R., FORGIONE, A., GABRIELI, M. L., PEROTTI, G., VECCHIO, F. M., RAPACCINI, G., GASBARRINI, G., DAY, C. P. & GRIECO, A. 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 49, 1877-87.

- MINETA, K., YAMAMOTO, Y., YAMAZAKI, Y., TANAKA, H., TADA, Y., SAITO, K., TAMURA, A., IGARASHI, M., ENDO, T., TAKEUCHI, K. & TSUKITA, S. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585, 606-12.
- MIQUILENA-COLINA, M. E., LIMA-CABELLO, E., SANCHEZ-CAMPOS, S., GARCIA-MEDIAVILLA, M. V., FERNANDEZ-BERMEJO, M., LOZANO-RODRIGUEZ, T., VARGAS-CASTRILLON, J., BUQUE, X., OCHOA, B., ASPICHUETA, P., GONZALEZ-GALLEGO, J. & GARCIA-MONZON, C. 2011. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60, 1394-402.
- MONTANARO, M. A., RIMOLDI, O. J., IGAL, R. A., MONTENEGRO, S., TARRES, M. C., MARTINEZ, S. M. & BRENNER, R. R. 2003. Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturations in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats. *Lipids*, 38, 827-32.
- MONTEIRO, A. C., SUMAGIN, R., RANKIN, C. R., LEONI, G., MINA, M. J., REITER, D. M., STEHLE, T., DERMODY, T. S., SCHAEFER, S. A., HALL, R. A., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2013. JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell*, 24, 2849-60.
- MORENO-ALIAGA, M. J., LORENTE-CEBRIAN, S. & MARTINEZ, J. A. 2010. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*, 69, 324-32.
- MORI, T., KONDO, H., HASE, T., TOKIMITSU, I. & MURASE, T. 2007. Dietary fish oil upregulates intestinal lipid metabolism and reduces body weight gain in C57BL/6J mice. *J Nutr*, 137, 2629-34.
- MORITA, K., FURUSE, M., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 511-6.
- MOWAT, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3, 331-41.
- MUJICO, J. R., BACCAN, G. C., GHEORGHE, A., DIAZ, L. E. & MARCOS, A. 2013. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr*, 110, 711-20.
- MUKHERJEE, P. K., MARCHESELLI, V. L., SERHAN, C. N. & BAZAN, N. G. 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, 8491-6.

- MURALI, G., DESOUZA, C. V., CLEVINGER, M. E., RAMALINGAM, R. & SARASWATHI, V. 2014. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 90, 13-21.
- MUSSO, G., GAMBINO, R. & CASSADER, M. 2010. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev*, 11, 430-45.
- MUST, A., SPADANO, J., COAKLEY, E. H., FIELD, A. E., COLDITZ, G. & DIETZ, W. H. 1999. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*, 282, 1523-9.
- MUTO, Y., SHINOHARA, N., BANPHOTKASEM, S., IITOYO, N. & HOSOYA, N. 1975. Effect of exogenous polyunsaturated fatty acids on lipogenic enzyme activity in rat liver under fixed carbohydrate consumption. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 21, 39-47.
- MYLES, I. A., PINCUS, N. B., FONTECILLA, N. M. & DATTA, S. K. 2014. Effects of parental omega-3 fatty acid intake on offspring microbiome and immunity. *PLoS One*, 9, e87181.
- NAKAMURA, M. T. & NARA, T. Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24, 345-76.
- NARA, T. Y., HE, W. S., TANG, C., CLARKE, S. D. & NAKAMURA, M. T. 2002. The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 111-7.
- NARCE, M. & POISSON, J. P. 1995. Age-related depletion of linoleic acid desaturation in liver microsomes from young spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53, 59-63.
- NATIVIDAD, J. M. & VERDU, E. F. 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*, 69, 42-51.
- NAVA, P., CAPALDO, C. T., KOCH, S., KOLEGRAFF, K., RANKIN, C. R., FARKAS, A. E., FEASEL, M. E., LI, L., ADDIS, C., PARKOS, C. A. & NUSRAT, A. 2011. JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/beta-catenin signalling. *EMBO Rep*, 12, 314-20.
- NEAL, M. D., LEAPHART, C., LEVY, R., PRINCE, J., BILLIAR, T. R., WATKINS, S., LI, J., CETIN, S., FORD, H., SCHREIBER, A. & HACKAM, D. J. 2006. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol*, 176, 3070-9.
- NEDERGAARD, J., BENGTTSSON, T. & CANNON, B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E444-52.

- NEDERGAARD, J. & CANNON, B. 2013. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 943-9.
- NEEDLEMAN, P., RAZ, A., MINKES, M. S., FERRENDELLI, J. A. & SPRECHER, H. 1979. Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 944-8.
- NEUHOFER, A., ZEYDA, M., MASCHER, D., ITARIU, B. K., MURANO, I., LEITNER, L., HOCHBRUGGER, E. E., FRAISL, P., CINTI, S., SERHAN, C. N. & STULNIG, T. M. 2013. Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. *Diabetes*, 62, 1945-56.
- NEYRINCK, A. M., CANI, P. D., DEWULF, E. M., DE BACKER, F., BINDELS, L. B. & DELZENNE, N. M. 2009. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 385, 351-6.
- NIELSEN, S., NIELSEN, D. S., LAURITZEN, L., JAKOBSEN, M. & MICHAELSEN, K. F. 2007. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 44, 613-8.
- NIELSEN, S. J. & POPKIN, B. M. 2003. Patterns and trends in food portion sizes, 1977-1998. *JAMA*, 289, 450-3.
- NIESSEN, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127, 2525-32.
- NINNO, R. E., DE TORRENTO, M. A., CASTUMA, J. C. & BRENNER, R. R. 1974. Specificity of 5- and 6-fatty acid desaturases in rat and fish. *Biochim Biophys Acta*, 360, 124-33.
- NKONDJOCK, A. & RECEVEUR, O. 2003. Fish-seafood consumption, obesity, and risk of type 2 diabetes: an ecological study. *Diabetes & Metabolism*, 29, 635-642.
- NORGAN, N. G. & JONES, P. R. 1995. The effect of standardising the body mass index for relative sitting height. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19, 206-8.
- NOVIKOV, D. K., KOIVURANTA, K. T., HELANDER, H. M., FILPPULA, S. A., YAGI, A. I., QIN, Y. M. & HILTUNEN, K. J. 1999. Enzymology of beta-oxidation of (poly)unsaturated fatty acids. *Adv Exp Med Biol*, 466, 301-9.
- NOWAK, J., WEYLANDT, K. H., HABEL, P., WANG, J., DIGNASS, A., GLICKMAN, J. N. & KANG, J. X. 2007. Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*, 28, 1991-5.
- NUSRAT, A., TURNER, J. R. & MADARA, J. L. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279, G851-7.

- OGUZHAN, B., SANCHO, V., ACITORES, A., VILLANUEVA-PENACARRILLO, M. L., PORTOIS, L., CHARDIGNY, J. M., SENER, A., CARPENTIER, Y. A. & MALAISSE, W. J. 2006. Alteration of adipocyte metabolism in omega3 fatty acid-depleted rats. *Horm Metab Res*, 38, 789-98.
- OH, D. Y., TALUKDAR, S., BAE, E. J., IMAMURA, T., MORINAGA, H., FAN, W., LI, P., LU, W. J., WATKINS, S. M. & OLEFSKY, J. M. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142, 687-98.
- ORAVA, J., NUUTILA, P., LIDELL, M. E., OIKONEN, V., NOPONEN, T., VILJANEN, T., SCHEININ, M., TAITTONEN, M., NIEMI, T., ENERBACK, S. & VIRTANEN, K. A. 2011. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*, 14, 272-9.
- OTTMAN, N., SMIDT, H., DE VOS, W. M. & BELZER, C. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 104.
- OUELLET, V., LABBE, S. M., BLONDIN, D. P., PHOENIX, S., GUERIN, B., HAMAN, F., TURCOTTE, E. E., RICHARD, D. & CARPENTIER, A. C. 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*, 122, 545-52.
- PALMER, C., BIK, E. M., DIGIULIO, D. B., RELMAN, D. A. & BROWN, P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5, e177.
- PALMER, C. D., MANCUSO, C. J., WEISS, J. P., SERHAN, C. N., GUINAN, E. C. & LEVY, O. 2011. 17(R)-Resolvin D1 differentially regulates TLR4-mediated responses of primary human macrophages to purified LPS and live *E. coli*. *J Leukoc Biol*, 90, 459-70.
- PAZ, K., HEMI, R., LEROITH, D., KARASIK, A., ELHANANY, E., KANETY, H. & ZICK, Y. 1997. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 272, 29911-8.
- PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A. & STOBBERINGH, E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 511-21.
- PEREZ-ECHARRI, N., PEREZ-MATUTE, P., MARCOS-GOMEZ, B., MARTINEZ, J. A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2009. Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. *Br J Nutr*, 101, 1059-67.

- PEREZ-MATUTE, P., PEREZ-ECHARRI, N., MARTINEZ, J. A., MARTI, A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2007. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Br J Nutr*, 97, 389-98.
- PETROVIC, N., WALDEN, T. B., SHABALINA, I. G., TIMMONS, J. A., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, 285, 7153-64.
- PETSCH, D. & ANSPACH, F. B. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*, 76, 97-119.
- PEYRON-CASO, E., FLUTEAU-NADLER, S., KABIR, M., GUERRE-MILLO, M., QUIGNARD-BOULANGE, A., SLAMA, G. & RIZKALLA, S. W. 2002. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res*, 34, 360-6.
- PICK, A., CLARK, J., KUBSTRUP, C., LEVISETTI, M., PUGH, W., BONNER-WEIR, S. & POLONSKY, K. S. 1998. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 47, 358-64.
- PICKUP, J. C. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 813-23.
- PICKUP, J. C. & CROOK, M. A. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 41, 1241-8.
- PIGHIN, D., KARABATAS, L., PASTORALE, C., DASCAL, E., CARBONE, C., CHICCO, A., LOMBARDO, Y. B. & BASABE, J. C. 2005. Role of lipids in the early developmental stages of experimental immune diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin. *J Appl Physiol (1985)*, 98, 1064-9.
- POPKIN, B. M. 2006. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am J Clin Nutr*, 84, 289-98.
- POPKIN, B. M. & NIELSEN, S. J. 2003. The sweetening of the world's diet. *Obes Res*, 11, 1325-32.
- POULIOT, M. C., DESPRES, J. P., LEMIEUX, S., MOORJANI, S., BOUCHARD, C., TREMBLAY, A., NADEAU, A. & LUPIEN, P. J. 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral

- adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol*, 73, 460-8.
- PRENTICE, A. M. & JEBB, S. A. 1995. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *Bmj*, 311, 437-9.
- PROSTEK, A., GAJEWSKA, M., KAMOLA, D. & BALASINSKA, B. 2014. The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3-L1 cells at different stages of cellular maturation. *Lipids Health Dis*, 13, 3.
- QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K. S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D. R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J. M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORE, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., META, H. I. T. C., BORK, P., EHRLICH, S. D. & WANG, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
- QU, Q., XUAN, W. & FAN, G. H. 2015. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biol Int*, 39, 3-22.
- QUINN, P. J., JOO, F. & VIGH, L. 1989. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog Biophys Mol Biol*, 53, 71-103.
- RACLOT, T., GROSCOLAS, R., LANGIN, D. & FERRE, P. 1997. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res*, 38, 1963-72.
- RAETZ, C. R. & WHITFIELD, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700.
- RAHMAN, M., HALADE, G. V., BHATTACHARYA, A. & FERNANDES, G. 2009. The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR-gamma and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Oxid Med Cell Longev*, 2, 307-16.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S. & MEDZHITOV, R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-41.

- RAVIN, H. A., ROWLEY, D., JENKINS, C. & FINE, J. 1960. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. *J Exp Med*, 112, 783-92.
- REAVEN, G. 2002. Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Implications for Management of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 106, 286-288.
- RELMAN, D. A. 2002. New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J Infect Dis*, 186 Suppl 2, S254-8.
- RIDLON, J. M., KANG, D. J. & HYLEMON, P. B. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*, 47, 241-59.
- RISSANEN, A. M., HELIOVAARA, M., KNEKT, P., REUNANEN, A. & AROMAA, A. 1991. Determinants of weight gain and overweight in adult Finns. *Eur J Clin Nutr*, 45, 419-30.
- RIUS, B., LOPEZ-VICARIO, C., GONZALEZ-PERIZ, A., MORAN-SALVADOR, E., GARCIA-ALONSO, V., CLARIA, J. & TITOS, E. 2012. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front Immunol*, 3, 257.
- ROIG-PEREZ, S., GUARDIOLA, F., MORETO, M. & FERRER, R. 2004. Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res*, 45, 1418-28.
- ROLLAND-CACHERA, M. F., COLE, T. J., SEMPE, M., TICHET, J., ROSSIGNOL, C. & CHARRAUD, A. 1991. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr*, 45, 13-21.
- ROMANATTO, T., FIAMONCINI, J., WANG, B., CURI, R. & KANG, J. X. 2014. Elevated tissue omega-3 fatty acid status prevents age-related glucose intolerance in fat-1 transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 186-91.
- ROOPCHAND, D. E., CARMODY, R. N., KUHN, P., MOSKAL, K., ROJAS-SILVA, P., TURNBAUGH, P. J. & RASKIN, I. 2015. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes*, 64, 2847-58.
- ROSEN, E. D. & MACDOUGALD, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 885-96.
- ROSS, R., LEGER, L., MORRIS, D., DE GUISE, J. & GUARDO, R. 1992. Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. *J Appl Physiol (1985)*, 72, 787-95.



- ROSS, R., SHAW, K. D., RISSANEN, J., MARTEL, Y., DE GUISE, J. & AVRUCH, L. 1994. Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging: anthropometric relationships. *Am J Clin Nutr*, 59, 1277-85.
- ROSSI, A. S., LOMBARDO, Y. B., LACORTE, J. M., CHICCO, A. G., ROUAULT, C., SLAMA, G. & RIZKALLA, S. W. 2005. Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R486-R494.
- ROSSMEISL, M., JILKOVA, Z. M., KUDA, O., JELENIK, T., MEDRIKOVA, D., STANKOVA, B., KRISTINSSON, B., HARALDSSON, G. G., SVENSEN, H., STOKNES, I., SJOVALL, P., MAGNUSSON, Y., BALVERS, M. G., VERHOECKX, K. C., TVRZICKA, E., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2012. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One*, 7, e38834.
- ROUZER, C. A. & MARNETT, L. J. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S29-34.
- RUXTON, C. H., REED, S. C., SIMPSON, M. J. & MILLINGTON, K. J. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, 17, 449-59.
- RUZICKOVA, J., ROSSMEISL, M., PRAZAK, T., FLACHS, P., SPONAROVA, J., VECK, M., TVRZICKA, E., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*, 39, 1177-85.
- SALATI, L. M. & CLARKE, S. D. 1986. Fatty acid inhibition of hormonal induction of acetyl-coenzyme A carboxylase in hepatocyte monolayers. *Arch Biochem Biophys*, 246, 82-9.
- SALTIEL, A. R. & KAHN, C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- SAMUEL, B. S., SHAITO, A., MOTOIKE, T., REY, F. E., BACKHED, F., MANCHESTER, J. K., HAMMER, R. E., WILLIAMS, S. C., CROWLEY, J., YANAGISAWA, M. & GORDON, J. I. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16767-72.
- SARTIPY, P. & LOSKUTOFF, D. J. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7265-70.

- SATO, A., KAWANO, H., NOTSU, T., OHTA, M., NAKAKUKI, M., MIZUGUCHI, K., ITOH, M., SUGANAMI, T. & OGAWA, Y. 2010. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes*, 59, 2495-504.
- SAVAGE, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 31, 107-33.
- SCHERER, P. E., WILLIAMS, S., FOGLIANO, M., BALDINI, G. & LODISH, H. F. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 270, 26746-9.
- SCHINNER, S., SCHERBAUM, W. A., BORNSTEIN, S. R. & BARTHEL, A. 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*, 22, 674-82.
- SCHMITZ, G. & ECKER, J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*, 47, 147-55.
- SCHOLTENS, P. A., OOZEER, R., MARTIN, R., AMOR, K. B. & KNOL, J. 2012. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 425-47.
- SCHWEINBURG, F. B. & FINE, J. 1960. Evidence for a lethal endotoxemia as the fundamental feature of irreversibility in three types of traumatic shock. *J Exp Med*, 112, 793-800.
- SEBOKOVA, E., KLIMES, I., GASPERIKOVA, D., BOHOV, P., LANGER, P., LAVAU, M. & CLANDININ, M. T. 1996. Regulation of gene expression for lipogenic enzymes in the liver and adipose tissue of hereditary hypertriglyceridemic, insulin-resistant rats: effect of dietary sucrose and marine fish oil. *Biochim Biophys Acta*, 1303, 56-62.
- SEGAL, K. R., BURASTERO, S., CHUN, A., CORONEL, P., PIERSON, R. N., JR. & WANG, J. 1991. Estimation of extracellular and total body water by multiple-frequency bioelectrical-impedance measurement. *Am J Clin Nutr*, 54, 26-9.
- SEIDELL, J. C., BAKKER, C. J. & VAN DER KOOY, K. 1990. Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution--a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am J Clin Nutr*, 51, 953-7.
- SERHAN, C. N. 2007. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, 25, 101-37.
- SERHAN, C. N. 2009. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 44-8.
- SERHAN, C. N. 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510, 92-101.

- SERHAN, C. N., CHIANG, N. & VAN DYKE, T. E. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, 8, 349-61.
- SERHAN, C. N., GOTTLINGER, K., HONG, S., LU, Y., SIEGELMAN, J., BAER, T., YANG, R., COLGAN, S. P. & PETASIS, N. A. 2006. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol*, 176, 1848-59.
- SERHAN, C. N., HONG, S., GRONERT, K., COLGAN, S. P., DEVCHAND, P. R., MIRICK, G. & MOUSSIGNAC, R. L. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, 196, 1025-37.
- SEVERSON, E. A., JIANG, L., IVANOV, A. I., MANDELL, K. J., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2008. Cis-dimerization mediates function of junctional adhesion molecule A. *Mol Biol Cell*, 19, 1862-72.
- SHAIKH, S. R., CHEREZOV, V., CAFFREY, M., STILLWELL, W. & WASSALL, S. R. 2003. Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry*, 42, 12028-37.
- SHANAB, A. A., SCULLY, P., CROSBIE, O., BUCKLEY, M., O'MAHONY, L., SHANAHAN, F., GAZAREEN, S., MURPHY, E. & QUIGLEY, E. M. 2011. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci*, 56, 1524-34.
- SHEN, J., SAKAIDA, I., UCHIDA, K., TERAJ, S. & OKITA, K. 2005. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci*, 77, 1502-15.
- SHI, H., KOKOEVA, M. V., INOUE, K., TZAMELI, I., YIN, H. & FLIER, J. S. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116, 3015-25.
- SHIMANO, H. 2009. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J*, 276, 616-21.
- SHIN, N. R., LEE, J. C., LEE, H. Y., KIM, M. S., WHON, T. W., LEE, M. S. & BAE, J. W. 2014. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 63, 727-35.
- SHOELSON, S. E., HERRERO, L. & NAAZ, A. 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132, 2169-80.

- SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116, 1793-801.
- SIMOPOULOS, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, 54, 438-63.
- SINGER, P., SHAPIRO, H., THEILLA, M., ANBAR, R., SINGER, J. & COHEN, J. 2008. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med*, 34, 1580-92.
- SMITH, B. K., HOLLOWAY, G. P., REZA-LOPEZ, S., JERAM, S. M., KANG, J. X. & MA, D. W. 2010. A decreased n-6/n-3 ratio in the fat-1 mouse is associated with improved glucose tolerance. *Appl Physiol Nutr Metab*, 35, 699-706.
- SMITH, B. W. & ADAMS, L. A. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 48, 97-113.
- SMITH, E. A. & MACFARLANE, G. T. 1997. Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3, 327-37.
- SONESSON, A., JANTZEN, E., TANGEN, T. & ZAHRINGER, U. 1994. Chemical characterization of lipopolysaccharides from *Legionella feeleii*, *Legionella hackeliae* and *Legionella jordanis*. *Microbiology*, 140 ( Pt 10), 2663-71.
- SOUZA, M. R., DINIZ MDE, F., MEDEIROS-FILHO, J. E. & ARAUJO, M. S. 2012. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*, 49, 89-96.
- SPECTOR, A. A. 1999. Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34 Suppl, S1-3.
- SPECTOR, A. A. & YOREK, M. A. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*, 26, 1015-35.
- SPRANGER, J., KROKE, A., MOHLIG, M., HOFFMANN, K., BERGMANN, M. M., RISTOW, M., BOEING, H. & PFEIFFER, A. F. 2003. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52, 812-7.
- SPRECHER, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 219-31.
- SPRUSS, A., KANURI, G., WAGNERBERGER, S., HAUB, S., BISCHOFF, S. C. & BERGHEIM, I. 2009. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 50, 1094-104.

- SPYCHALLA, J. P., KINNEY, A. J. & BROWSE, J. 1997. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1142-7.
- STEPHANI, J., RADULOVIC, K. & NIESS, J. H. 2011. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 59, 161-77.
- STEPHENS, T. W. & CARO, J. F. 1998. To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106, 1-15.
- STORLIEN, L. H., KRAEGEN, E. W., CHISHOLM, D. J., FORD, G. L., BRUCE, D. G. & PASCOE, W. S. 1987. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science*, 237, 885-8.
- STUBBS, C. D. & SMITH, A. D. 1990. Essential fatty acids in membrane: physical properties and function. *Biochem Soc Trans*, 18, 779-81.
- SVENDSEN, O. L., HAARBO, J., HASSAGER, C. & CHRISTIANSEN, C. 1993. Accuracy of measurements of body composition by dual-energy x-ray absorptiometry in vivo. *Am J Clin Nutr*, 57, 605-8.
- SWINBURN, B. A., CRAIG, P. L., DANIEL, R., DENT, D. P. & STRAUSS, B. J. 1996. Body composition differences between Polynesians and Caucasians assessed by bioelectrical impedance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20, 889-94.
- TAKAHASHI, A., MOTOMURA, K., KATO, T., YOSHIKAWA, T., NAKAGAWA, Y., YAHAGI, N., SONE, H., SUZUKI, H., TOYOSHIMA, H., YAMADA, N. & SHIMANO, H. 2005. Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 54, 492-9.
- TANABE, Y., MATSUNAGA, Y., SAITO, M. & NAKAYAMA, K. 2008. Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. *J Pharmacol Sci*, 106, 478-84.
- TANG, Q. Q. & LANE, M. D. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 81, 715-36.
- TAOUI, M., DAGOU, C., STER, C., DURAND, G., PINAULT, M. & DELARUE, J. 2002. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E664-71.
- TAPIERO, H., BA, G. N., COUVREUR, P. & TEW, K. D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother*, 56, 215-22.

- TAZOE, H., OTOMO, Y., KAJI, I., TANAKA, R., KARAKI, S. I. & KUWAHARA, A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 2, 251-62.
- TEBBEY, P. W., MCGOWAN, K. M., STEPHENS, J. M., BUTTKE, T. M. & PEKALA, P. H. 1994. Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA turnover. *J Biol Chem*, 269, 639-44.
- TEKELESELASSIE, A. W., GOH, Y. M., RAJION, M. A., MOTSHAKERI, M. & EBRAHIMI, M. 2013. A high-fat diet enriched with low omega-6 to omega-3 fatty acid ratio reduced fat cellularity and plasma leptin concentration in Sprague-Dawley rats. *ScientificWorldJournal*, 2013, 757593.
- TILG, H. & MOSCHEN, A. R. 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, 14, 222-31.
- TITOS, E. & CLARIA, J. 2013. Omega-3-derived mediators counteract obesity-induced adipose tissue inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 107, 77-84.
- TITOS, E., RIUS, B., GONZALEZ-PERIZ, A., LOPEZ-VICARIO, C., MORAN-SALVADOR, E., MARTINEZ-CLEMENTE, M., ARROYO, V. & CLARIA, J. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol*, 187, 5408-18.
- TOBIAS, P. S., SOLDAU, K. & ULEVITCH, R. J. 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem*, 264, 10867-71.
- TODORIC, J., LOFFLER, M., HUBER, J., BILBAN, M., REIMERS, M., KADL, A., ZEYDA, M., WALDHAUSL, W. & STULNIG, T. M. 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*, 49, 2109-19.
- TOMLINSON, J. E. & BLIKSLAGER, A. T. 2004. Interactions between lipopolysaccharide and the intestinal epithelium. *J Am Vet Med Assoc*, 224, 1446-52.
- TONTONOZ, P., NAGY, L., ALVAREZ, J. G., THOMAZY, V. A. & EVANS, R. M. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-52.
- TOTH, C. A. & THOMAS, P. 1992. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology*, 16, 255-66.
- TRIANTAFILOU, M., MIYAKE, K., GOLENBOCK, D. T. & TRIANTAFILOU, K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, 115, 2603-11.

- TROSEID, M., NESTVOLD, T. K., RUDI, K., THORESEN, H., NIELSEN, E. W. & LAPPEGARD, K. T. 2013. Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes Care*, 36, 3627-32.
- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOUR'TIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2007. The human microbiome project. *Nature*, 449, 804-10.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.
- TVRZICKA, E., KREMMYDA, L. S., STANKOVA, B. & ZAK, A. 2011. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155, 117-30.
- TYAGI, A., KUMAR, U., REDDY, S., SANTOSH, V. S., MOHAMMED, S. B., EHTESHAM, N. Z. & IBRAHIM, A. 2012. Attenuation of colonic inflammation by partial replacement of dietary linoleic acid with alpha-linolenic acid in a rat model of inflammatory bowel disease. *Br J Nutr*, 108, 1612-22.
- UCHIYAMA, K., NAKAMURA, M., ODAHARA, S., KOIDO, S., KATAHIRA, K., SHIRAISHI, H., OHKUSA, T., FUJISE, K. & TAJIRI, H. 2010. N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 1696-707.
- ULLOA-AGUIRRE, A., STANISLAUS, D., JANOVICK, J. A. & CONN, P. M. 1999. Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res*, 30, 420-35.
- UNGER, R. H. 1995. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*, 44, 863-70.
- UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-4.
- VALENZUELA, R. & VIDELA, L. A. 2011. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct*, 2, 644-8.

- VERSTREPEN, L., BEKAERT, T., CHAU, T. L., TAVERNIER, J., CHARIOT, A. & BEYAERT, R. 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2964-78.
- VIJAY-KUMAR, M., AITKEN, J. D., CARVALHO, F. A., CULLENDER, T. C., MWANGI, S., SRINIVASAN, S., SITARAMAN, S. V., KNIGHT, R., LEY, R. E. & GEWIRTZ, A. T. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, 328, 228-31.
- VOSS, A., REINHART, M., SANKARAPPA, S. & 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, 19995-20000.
- VREUGDENHIL, A. C., ROUSSEAU, C. H., HARTUNG, T., GREVE, J. W., VAN 'T VEER, C. & BUURMAN, W. A. 2003. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol*, 170, 1399-405.
- VRIEZE, A., HOLLEMAN, F., ZOETENDAL, E. G., DE VOS, W. M., HOEKSTRA, J. B. & NIEUWDORP, M. 2010. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53, 606-13.
- WALDEN, T. B., HANSEN, I. R., TIMMONS, J. A., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2012. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, E19-31.
- WALTER, J. & LEY, R. 2011. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol*, 65, 411-29.
- WANG, C. C., GOALSTONE, M. L. & DRAZNIN, B. 2004. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*, 53, 2735-40.
- WANG, C. Y. & LIAO, J. K. 2012. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*, 821, 421-33.
- WANG, J., THORNTON, J. C., HORLICK, M., FORMICA, C., WANG, W. & PIERSON, R. N., JR. 1999. Dual X-Ray absorptiometry in pediatric studies: changing scan modes alters bone and body composition measurements. *J Clin Densitom*, 2, 135-41.
- WANG, J., WU, X., SIMONAVICIUS, N., TIAN, H. & LING, L. 2006a. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*, 281, 34457-64.
- WANG, J., YU, L., SCHMIDT, R. E., SU, C., HUANG, X., GOULD, K. & CAO, G. 2005a. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 735-42.



- WANG, W., CHEN, S. W., ZHU, J., ZUO, S., MA, Y. Y., CHEN, Z. Y., ZHANG, J. L., CHEN, G. W., LIU, Y. C. & WANG, P. Y. 2015. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the translocation of bacteria of gut-origin in mice with peritonitis: mechanism of action. *PLoS One*, 10, e0124835.
- WANG, X., PAN, L., LU, J., LI, N. & LI, J. 2012. N-3 PUFAs attenuate ischemia/reperfusion induced intestinal barrier injury by activating I-FABP-PPARgamma pathway. *Clin Nutr*, 31, 951-7.
- WANG, Y., BEYDOUN, M. A., LIANG, L., CABALLERO, B. & KUMANYIKA, S. K. 2008. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 2323-30.
- WANG, Y., BOTOLIN, D., CHRISTIAN, B., BUSIK, J., XU, J. & JUMP, D. B. 2005b. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res*, 46, 706-15.
- WANG, Y., BOTOLIN, D., XU, J., CHRISTIAN, B., MITCHELL, E., JAYAPRAKASAM, B., NAIR, M. G., PETERS, J. M., BUSIK, J. V., OLSON, L. K. & JUMP, D. B. 2006b. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res*, 47, 2028-41.
- WASSALL, S. R., BRZUSTOWICZ, M. R., SHAIKH, S. R., CHEREZOV, V., CAFFREY, M. & STILLWELL, W. 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids*, 132, 79-88.
- WEINTRAUB, H. 2013. Update on marine omega-3 fatty acids: management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis*, 230, 381-9.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1796-808.
- WEYER, C., FUNAHASHI, T., TANAKA, S., HOTTA, K., MATSUZAWA, Y., PRATLEY, R. E. & TATARANNI, P. A. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 1930-5.
- WEYLANDT, K. H., CHIU, C. Y., GOMOLKA, B., WAECHTER, S. F. & WIEDENMANN, B. 2012. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 97, 73-82.
- WHITE, P. J., ARITA, M., TAGUCHI, R., KANG, J. X. & MARETTE, A. 2010. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution

- capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes*, 59, 3066-73.
- WHITE, P. J., MITCHELL, P. L., SCHWAB, M., TROTTIER, J., KANG, J. X., BARBIER, O. & MARETTE, A. 2015. Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: Potential role for protectins. *Metabolism*, 64, 666-76.
- WHITE, P. J., ST-PIERRE, P., CHARBONNEAU, A., MITCHELL, P. L., ST-AMAND, E., MARCOTTE, B. & MARETTE, A. 2014. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver gluco regulatory axis. *Nat Med*, 20, 664-9.
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R. & KING, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-53.
- WILLEMSSEN, L. E., KOETSIER, M. A., BALVERS, M., BEERMANN, C., STAHL, B. & VAN TOL, E. A. 2008. Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *Eur J Nutr*, 47, 183-91.
- WIZNITZER, T., SCHWEINBURG, F. B., ATKINS, N. & FINE, J. 1960. On the relation of the size of the intraintestinal pool of endotoxin to the development of irreversibility in hemorrhagic shock. *J Exp Med*, 112, 1167-71.
- WOLOWCZUK, I., VERWAERDE, C., VILTART, O., DELANOYE, A., DELACRE, M., POT, B. & GRANGETTE, C. 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol*, 2008, 639803.
- WONG, J. M., DE SOUZA, R., KENDALL, C. W., EMAM, A. & JENKINS, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40, 235-43.
- WOSTMANN, B. S. 1973. Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat. *J Nutr*, 103, 982-90.
- WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J. & MATHISON, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-3.
- WURFEL, M. M., KUNITAKE, S. T., LICHENSTEIN, H., KANE, J. P. & WRIGHT, S. D. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*, 180, 1025-35.
- XIA, S., LU, Y., WANG, J., HE, C., HONG, S., SERHAN, C. N. & KANG, J. X. 2006. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12499-504.

- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112, 1821-30.
- YAHAGI, N., SHIMANO, H., HASTY, A. H., MATSUZAKA, T., IDE, T., YOSHIKAWA, T., AMEMIYA-KUDO, M., TOMITA, S., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., IIZUKA, Y., OHASHI, K., OSUGA, J., HARADA, K., GOTODA, T., NAGAI, R., ISHIBASHI, S. & YAMADA, N. 2002. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem*, 277, 19353-7.
- YARON, S., KOLLING, G. L., SIMON, L. & MATTHEWS, K. R. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from Escherichia coli O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4414-20.
- YERRAM, N. R., MOORE, S. A. & SPECTOR, A. A. 1989. Eicosapentaenoic acid metabolism in brain microvessel endothelium: effect on prostaglandin formation. *J Lipid Res*, 30, 1747-57.
- 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. & 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, 1705-11.
- YU, H. N., ZHU, J., PAN, W. S., SHEN, S. R., SHAN, W. G. & DAS, U. N. 2014. Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Arch Med Res*, 45, 195-202.
- YUDKIN, J. S., STEHOUWER, C. D., EMEIS, J. J. & COPPACK, S. W. 1999. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 972-8.
- ZAMBO, V., SIMON-SZABO, L., SZELENYI, P., KERESZTURI, E., BANHEGYI, G. & CSALA, M. 2013. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol*, 5, 550-7.
- ZANEVELD, J., TURNBAUGH, P. J., LOZUPONE, C., LEY, R. E., HAMADY, M., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2008. Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 109-14.

- ZAREPOOR, L., LU, J. T., ZHANG, C., WU, W., LEPP, D., ROBINSON, L., WANASUNDARA, J., CUI, S., VILLENEUVE, S., FOFANA, B., TSAO, R., WOOD, G. A. & POWER, K. A. 2014. Dietary flaxseed intake exacerbates acute colonic mucosal injury and inflammation induced by dextran sodium sulfate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306, G1042-55.
- ZHANG, C., ZHANG, M., WANG, S., HAN, R., CAO, Y., HUA, W., MAO, Y., ZHANG, X., PANG, X., WEI, C., ZHAO, G., CHEN, Y. & ZHAO, L. 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*, 4, 232-41.
- ZHANG, X., SHEN, D., FANG, Z., JIE, Z., QIU, X., ZHANG, C., CHEN, Y. & JI, L. 2013. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*, 8, e71108.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.
- ZHAO, M. & CHEN, X. 2014. Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 450, 1446-51.
- ZICK, Y. 2003. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 Suppl 3, S56-60.
- ZOETENDAL, E. G., PLUGGE, C. M., AKKERMANS, A. D. & DE VOS, W. M. 2003. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 211-5.
- ZWEIGNER, J., GRAMM, H. J., SINGER, O. C., WEGSCHEIDER, K. & SCHUMANN, R. R. 2001. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood*, 98, 3800-8.

# **COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS**

# **I. Présentations issues des travaux de thèse**

## **I.1. Communications orales**

**Bidu C.** Fat-1 transgenic mice, endogenously synthesizing n-3 fatty acids, resist to diet-induced obesity. 8<sup>e</sup> Congrès International du Pôle VITAGORA, les 19 et 20 mars 2013 (Dijon, France)

**Bidu C..** Résistance de la souris transgénique fat-1 à l'obésité. 19<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, les 13 et 14 juin 2013 (Dijon, France) (**Second Prix**)

**Bidu C.** Fat-1 transgenic mice, endogenously enriched in n-3 PUFAs, resist to chronic diseases linked to obesity. 16<sup>th</sup> Congrès International GEM – 10<sup>th</sup> GERLI du 10 au 14 novembre 2013 (Nice, France)

**Bidu C.** N-3 polyunsaturated fatty acids reduce metabolic endotoxemia associated to obesity: fat-1 transgenic mice and Caco-2/TC7 cells study. 11<sup>e</sup> Congrès International de l'ISSFAL, du 28 juin au 2 juillet 2014 (Stockholm, Suède) (**New Investigator Award**)

## **I.1. Communications affichées**

**Bidu C.** Fat-1 transgenic mice, endogenously synthesizing n-3 fatty acids, resist to diet-induced obesity: impact of intestinal microbiota. 13<sup>e</sup> Journée Scientifique de l'IMBL, le 7 juin 2013 (Dijon, France)

**Bidu C..** Les souris transgéniques fat-1, aux fortes teneurs tissulaires en AGPI en n-3, ne développent pas les complications métaboliques associées à l'obésité alimentaire. 30<sup>e</sup> Journée Scientifique de l'AFERO, les 16 et 17 janvier 2014 (Dijon, France)

**Bidu C..** N-3 polyunsaturated fatty acids reduce metabolic endotoxemia associated to obesity: fat-1 transgenic mice and Caco-2/TC7 cells study. 9<sup>e</sup> Congrès International du Pôle VITAGORA, les 3 et 4 avril 2014 (Dijon, France)

**Bidu C..** N-3 polyunsaturated fatty acids protect fat- mice from dietary obesity and metabolic endotoxemia. 14<sup>e</sup> Journée Scientifique de l'IMBL, le 11 juin 2014 (Lyon, France)

## II. Publication issue des travaux de thèse et collaboration

**Bidu C**, Bellenger S., Spor A., Galan M., Geissler A., Dardevet D., Morio-Liondor B., Cani PD., Lagrost L., Narce M., Bellenger J. Remodeling gut microbiota by n-3 fatty acids prevents high fat/high sucrose diet-induced metabolic endotoxemia and associated metabolic disorders (soumission)

Zou Z, Bellenger S, Massey KA, Nicolaou A, Geissler A, **Bidu C**, Bonnotte B, Pierre AS, Minville-Walz M, Rialland M, Seubert J, Kang JX, Lagrost L, Narce M, Bellenger J. Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *Journal of Lipid Research (JLR)* (2013 Dec;54(12):3456-63)

Zou Z, **Bidu C**, Bellenger S, Narce M, Bellenger J. N-3 polyunsaturated fatty acids and HER2-positive breast cancer: Interest of the fat-1 transgenic mouse model over conventional dietary supplementation. *Biochimie* \_ (2014 jan;96:22-7)



# Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice

Zuquan Zou,<sup>1,\*†</sup> Sandrine Bellenger,<sup>\*†</sup> Karen A. Massey,<sup>§</sup> Anna Nicolaou,<sup>§</sup> Audrey Geissler,<sup>\*\*</sup> Célia Bidu,<sup>\*†</sup> Bernard Bonnotte,<sup>††</sup> Anne-Sophie Pierre,<sup>\*†</sup> Méline Minville-Walz,<sup>\*†</sup> Michaël Rialland,<sup>\*†</sup> John Seubert,<sup>§§</sup> Jing X. Kang,<sup>\*\*\*</sup> Laurent Lagrost,<sup>†</sup> Michel Narce,<sup>\*†</sup> and Jérôme Bellenger<sup>2,\*†</sup>

Université de Bourgogne,\* UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Dijon, France; INSERM UMR U866 Lipides Nutrition Cancer,<sup>†</sup> Université de Bourgogne, Dijon, France; Manchester Pharmacy School,<sup>§</sup> Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester, Manchester, UK; INSERM UMR866,\*\* IFR100 Imagerie Cellulaire Histologie, Faculté de Médecine et Pharmacie, F21000 Dijon, France; Université de Bourgogne,<sup>††</sup> UMR1098, Faculté de Médecine, IFR100, Dijon, France; Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,<sup>§§</sup> University of Alberta, Edmonton, Canada; and Department of Medicine,<sup>\*\*\*</sup> Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA

**Abstract** Overexpression of the tyrosine kinase receptor, ErbB2/HER2/Neu, occurs in 25–30% of invasive breast cancer (BC) with poor patient prognosis. Due to confounding factors, inconsistencies still remain regarding the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on BC. We therefore evaluated whether fat-1 transgenic mice, endogenously synthesizing n-3 PUFAs from n-6 PUFAs, were protected against BC development, and we then aimed to study *in vivo* a mechanism potentially involved in such protection. E0771 BC cells were implanted into fat-1 and wild-type (WT) mice. After tumorigenesis examination, we analyzed the expression of proteins involved in the HER2 signaling pathway and lipidomic analyses were performed in tumor tissues and plasma. Our results showed that tumors totally disappeared by day 15 in fat-1 mice but continued to grow in WT mice. This prevention can be related in part to significant repression of the HER2/ $\beta$ -catenin signaling pathway and formation of significant levels of n-3 PUFA-derived bioactive mediators (particularly 15-hydroxyeicosapentaenoic acid, 17-hydroxydocosahexaenoic acid, and prostaglandin E3) in the tumors of fat-1 mice compared with WT mice. All together these data demonstrate an anti-BC effect of n-3 PUFAs through, at least in part, HER2 signaling pathway downregulation, and highlight the importance of gene-diet interactions in BC.—Zou, Z., S. Bellenger, K. A. Massey, A. Nicolaou, A. Geissler, C. Bidu, B. Bonnotte, A.-S.

Pierre, M. Minville-Walz, M. Rialland, J. Seubert, J. X. Kang, L. Lagrost, M. Narce, and J. Bellenger. **Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice.** *J. Lipid Res.* 2013. 54: 3453–3463.

**Supplementary key words** polyunsaturated fatty acid-derived mediators • xenograft prevention • n-3 tissue enrichment

Breast cancer (BC) remains one of the most threatening mortality factors throughout the world despite significant advancements in early detection and therapy. With a current mortality rate of 40%, over one million women worldwide will fall victim to BC. Four closely related transmembrane tyrosine kinase receptors (HER1, -2, -3, and -4) have been implicated in the pathogenesis of cancer including BC. Binding of small peptide ligand molecules to HER receptors triggers homo- or heterodimerization and autophosphorylation, which results in enhanced cell proliferation, migration, and invasion (1, 2) via the PI3K/AKT/ $\beta$ -catenin downstream signaling pathway (3). The HER2/HER3 heterodimer is considered to be the

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex. J.B. acknowledges support from the Région Bourgogne. This work was also partially supported by a grant from La Ligue contre le cancer and the Groupe Lipides et Nutrition (GLN). No potential conflicts of interest relevant to this article have been reported.

Manuscript received 31 July 2013 and in revised form 2 September 2013

Published, JLR Papers in Press, September 19, 2013

DOI 10.1194/jlr.M042754

Abbreviations: AA, arachidonic acid; BC, breast cancer; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; HDHA, hydroxydocosahexaenoic acid; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid, HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PG, prostaglandin; TCF/LEF, T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor; TX, thromboxane; WT, wild-type.

<sup>1</sup>Z. Zou is a visiting postdoctoral fellow from Medical School, Ningbo University, Fenghua Road 818, Ningbo, 315211 Zhejiang, China.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: jerome.bellenger@u-bourgogne.fr

most active HER dimer and is crucial for signaling in tumors containing amplification of HER2 (4, 5). HER2 has no defined ligand but possesses an active tyrosine kinase domain (6) while, in contrast, HER3 has several ligands, including the neuregulins 1–4, but lacks intrinsic tyrosine kinase activity. HER2 overexpression occurs in 25–30% of invasive BCs and is associated with a more aggressive phenotype and a poor patient prognosis with intrinsic resistance to endocrine and conventional chemotherapy (7, 8). HER3 is often expressed together with HER2 in this disease (9). While both receptors are considered promising targets for therapy, the overemphasis on HER2 has shadowed the important role of HER3 in resistance to HER2-targeted therapies (10, 11). In recent years, an increased understanding of the role of HER3 has fueled the development of HER3-targeting agents (12). As tumors overexpressing HER2 are generally resistant to therapeutic agents, nutrition intervention may be a promising therapeutic strategy in preventing and treating this aggressive subtype of cancer. This can be accomplished by ablating HER2/HER3 expression and/or interfering with the interaction of HER2/HER3 heterodimers.

Epidemiological and preclinical studies suggest a protective effect of fish oil in the prevention of BC (13). In addition, *in vitro* and *in vivo* evidence demonstrates that n-3 fatty acids or their metabolites are able to reduce cellular proliferation and increase apoptosis in BC models (14). Moreover, a very recent report showed that mice expressing MMTV-neu(ndl)-YD5 (mouse mammary tumor virus), an aggressive HER2-positive BC model, and fat-1 (synthesizing n-3 PUFAs from n-6 PUFAs) can mitigate tumor development (15). Nevertheless, when the lifelong tumor development has been investigated in this mammary tumorigenesis model over-expressing HER2, mechanisms underlying such an anti-cancer role of n-3 PUFAs have not been elucidated. Then, the relevance of HER2 pathway involvement remains to be explored, as inhibitory dietary effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), the two main n-3 PUFAs found in fish oils, have been reported on HER family members (16, 17). Whether HER3 expression is associated with the n-3 PUFA-mediated antitumor effect in BC remains largely unknown. Despite research providing evidence that dietary or exogenously derived fatty acids may play an important role in the etiology, evolution, and/or progression of BC, many inconsistencies and discrepancies preclude definitive conclusions (18). For example, Holmes et al. (19) found an increased risk of BC associated with higher dietary marine n-3 PUFAs in a cohort study with 88,795 women. Such conflicting results reflect many confounding dietary elements. Indeed, marine oil, generally used in nutritional studies, contains not only EPA and DHA but also other fatty acids, and is particularly rich in vitamin D. Thus, it has been shown that oleic acid (18:1n-9) activates phosphatidylinositol 3-kinase, promotes proliferation, and reduces apoptosis of MDA-MB-231 BC cells (20); and Chatterjee et al. (21) showed, in a multitargeted approach, that the combination of vitamin D with MaxEPA (a fish oil supplement) was twice as effective as the individual

treatments in reducing tumor incidence and multiplicity. Consequently, it is still very difficult to understand the specific roles of n-3 PUFAs on BC prevention regarding many variables arising from the diets.

In the present study, we evaluated the role of high n-3 PUFA content in the pathogenesis of BC by inducing xenografts in the transgenic fat-1 mouse model. These mice carry the *fat-1* gene from the roundworm *Caenorhabditis elegans*, encoding an n-3 PUFA desaturase, absent in mammals, that catalyzes conversion of n-6 PUFAs into n-3 PUFAs (22). Therefore, these mice have endogenously elevated n-3 PUFA tissue content and exhibit a lower n-6/n-3 PUFA ratio compared with their wild-type (WT) littermates when maintained on a high n-6 PUFA diet. This contrasts feeding procedures using fish oil supplementation, which may bring confounding factors attributed to differences in the dietary composition. Hence, the fat-1 transgenic mouse model is a useful *in vivo* system for giving new insights of the role of the n-6/n-3 fatty acid ratio in BC tumorigenesis.

We examined the impact of enhanced n-3 PUFA production toward the development of BC and the regulation of the HER2/HER3/ $\beta$ -catenin/c-Myc signaling pathway. Thus, we implanted these cells in the fat-1 transgenic and WT mice in order to evaluate their tumorigenicities. Our data indicate that modulation of BC development by n-3 PUFAs might be mediated in part through HER2 signaling pathway downregulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

RPMT 1640, fetal bovine serum (FBS), glutamine, and antibiotics were purchased from PAA Laboratories. The antibodies raised against phospho (p)-HER2 (Tyr1248), HER2, p-HER3 (Tyr1289), HER3, p-Akt (Ser473), p-GSK-3 $\beta$  (Ser9), E-cadherin, and  $\beta$ -catenin were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). c-Myc antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Heregulin  $\beta$ -1 was purchased from Sigma-Aldrich. Prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, and 17-hydroxydocosahexaenoic acid (HDHA) were obtained from Bertin Pharma (France).

### Animals and diet

Transgenic fat-1 mice were generated as described previously (22) and backcrossed onto a C57BL/6J background. The presence of the *fat-1* gene in each mouse was confirmed both by genotyping and tail tissue fatty acid analysis profile. Transgenic and WT animals were maintained on a 10% safflower oil diet (SAFE, Augy, France) *ad libitum* and kept under pathogen-free conditions in standard cages in temperature- and humidity-controlled conditions with a 12 h light/dark cycle. We used 10- to 12-week-old female fat-1 transgenic mice and nontransgenic littermate controls for this experiment. The diet contained (per 100 g diet) 4.5 g sucrose, 18.6 g casein, 8.6 g cellulose, 50 g wheat starch, 0.3 g DL-methionine, 7 g mineral mix, 1 g vitamin mix, and 10 g safflower oil. Safflower oil is high in linoleic acid (18:2n-6) with very little n-3 fatty acid (less than 0.1% of the total fat supplied). Under the 10% safflower oil regimen, all the trans-

genic animals presented a total n-6/n-3 PUFA ratio greater than (but close to) one in their tail tissue (n-6/n-3 =  $1.6 \pm 0.2$  in fat-1 mice vs.  $39.5 \pm 3.2$  in WT control animals; n = 10 per group). All procedures were carried out according to institutional guidelines for the use and care of laboratory animals and approved by the Ethical Committee of the University of Burgundy (#A1408).

### Cancer cell lines

E0771 medullary breast adenocarcinoma cells were obtained from Dr. Enrico Mihich at Roswell Park Cancer Institute, New York, NY. E0771 cells were originally isolated from a spontaneous cancer in C57BL/6 mice. This C57BL/6 adenocarcinoma-derived BC E0771 cell line is, to our knowledge, the only cell model that can be grown to form breast tumors in immunocompetent fat-1 transgenic mice. The human BC cell lines SK-BR-3 and BT-474 were kindly provided by Dr. Sarab Lizard (Centre Georges François Leclerc, Dijon, France). E0771 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS with iron, 2 mmol/l L-glutamine, and 100 units/ml penicillin/streptomycin. SK-BR-3 and BT-474 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mmol/l L-glutamine, and penicillin/streptomycin. All these cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>-95% air at 37°C. In DHA-treated cells, the experiments were conducted in medium containing 0.5% FBS.

### Cell injections and tumor measurement

Cultured E0771 cells were collected with trypsin digestion (0.05% trypsin-EDTA, 3 min), washed twice with RPMI 1640 medium, and counted. Each female mouse was injected subcutaneously in the lower abdomen in or near the number 4 mammary fat pad with  $5 \times 10^5$  viable mycoplasma-free cells diluted in 200  $\mu$ l of RPMI 1640 medium. The day of the injection of E0771 cells was designated day 0. Tumor volume was measured with a caliper every 2 or 3 days, and calculated according to the following formula: tumor volume = length  $\times$  width<sup>2</sup>  $\times$  0.5.

### Lipidomic analysis

The fatty acid composition in tails (to perform phenotyping), tumors, and plasma was determined by gas chromatography as described previously (23).

Lipid mediators were analyzed using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) following the methodology developed by Masoodi et al. (24, 25). In brief, each tumor sample was homogenized in ice-cold methanol (4 ml of 15% v/v solution). Internal standards PGB2-*d4* and 12-HETE-*d8* (40 ng per sample each) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) were added to each sample and the homogenate was centrifuged for 5 min at 5,000 rpm at 4°C. The clear supernatant was acidified to pH 3.0 using 0.1M HCL and further purified by solid phase extraction cartridge (C18-E; Phenomenex, Macclesfield, UK) using methyl formate to elute the lipid mediators. Chromatographic analysis of prostanooids was performed on a C18 Luna column (5  $\mu$ m, 150  $\times$  2.0 mm, Phenomenex) while all hydroxy fatty acids were analyzed using a C18 Kinetex column (2.6  $\mu$ m, 100  $\times$  2.1 mm, Phenomenex). The analysis was performed using a Waters Alliance 2695 pump coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro Ultima; Waters, Elstree, Hertfordshire, UK). The following multiple reaction monitoring transitions were used: PGE2 *m/z* 351 > 271, PGD2 *m/z* 351 > 271, PGE3 *m/z* 349 > 269, thromboxane (TX)B3 *m/z* 367 > 167, TXB2 *m/z* 369 > 169, PGB2-*d4* *m/z* 337 > 179, 5-hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE) *m/z* 317 > 115, 18-HEPE *m/z* 317 > 133, 15-HEPE *m/z* 317 > 175, 12-HEPE *m/z* 317 > 179, 10-HDHA *m/z* 343 > 153, 14-HDHA *m/z* 343 > 161, 13-HDHA *m/z* 343 > 193, 17-HDHA *m/z* 343 > 201, and 12-HETE-*d8*

*m/z* 327 > 184. Protein content was estimated by the Bio-Rad protein assay using BSA as reference standard (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, UK). Results are expressed as pg/mg protein.

### Cell viability

The numbers of viable cells exposed to DHA were evaluated by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] cell proliferation assay, according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich). Briefly, BT-474, SK-BR-3, and E0771 cells were seeded and cultured in 96-well flat bottom plates at a density of  $3 \times 10^3$  per 100  $\mu$ l in medium containing 10% FBS, allowed to attach overnight, and then treated with DHA complexes to BSA in a 4:1 (DHA/BSA) molar ratio at 20, 40, 60, 80, and 100  $\mu$ M or vehicle for 72 h in medium containing 0.5% FBS. MTT reagent (20  $\mu$ l) was added to each well (final concentration 0.5 mg/ml) and the plate incubated at 37°C. After 4 h, supernatant was carefully removed and 100  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide was added to each well and the plate incubated for 2 h. The absorbance was read at 450 nm on a microplate reader (Bio-Rad, France). Data are represented as mean percent vehicle-treated cell proliferation  $\pm$  SE of triplicate experiments with internal triplicates.

### Western blot analysis

Cells were harvested in Triton protein lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 200 mM EGTA, and 1% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Proteins (50  $\mu$ g) were separated by 10% SDS-PAGE and electroblotted to Protran nitrocellulose membranes (Whatman, Dassel, Germany). After blocking nonspecific binding sites with 5% BSA in Tris-buffered saline (TBS) (0.1% Tween-20 in TBS), blots were probed overnight at 4°C with primary antibody against p-HER2 (Tyr1248), HER2, p-HER3 (Tyr1289), HER3, p-Akt (Ser473), p-GSK-3 $\beta$  (Ser9), E-cadherin,  $\beta$ -catenin (Cell Signaling, Ozyme), c-Myc (Santa Cruz Biotechnology), and  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich) at a concentration of 1/2,000, washed in Tween-TBS (T-TBS), and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG for all the antibodies, except  $\beta$ -actin was incubated with goat anti mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Detection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting analysis procedure (ECL Plus; Amersham, Freiburg, Germany).

In order to validate the potential link between the observed differences in PUFA-derived mediators and the differential tumorigenicities of E0771 cells in the mice, we studied the effects of PGE2, PGE3, and 17-HDHA on the protein expression of HER2, HER3, and c-Myc in these cells in culture. After treating E0771 cells with 1  $\mu$ M PGE2, 1  $\mu$ M PGE3, 1  $\mu$ M 17-HDHA, or DMSO as control, cells were harvested and Western blotting was performed to detect HER2, HER3, and c-Myc expression. The level of  $\beta$ -actin expression was used as the internal control for equal loading.

### p-HER3 immunolabeling

Tumors were dehydrated and included in paraffin. Paraffin blocks were sectioned (5  $\mu$ m thick section, two different levels per block) and slices of tumors were deposited onto Superfrost Plus slides.

p-HER3 (two slides per block at two different levels) immunohistochemistry was performed using an automated Leica Bond-Max. Briefly, after dewax, antigen retrieval with EDTA (pH 9) buffer, and inhibition of endogenous peroxidases with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), slides were saturated in BSA (3%) in PBS for 20 min, then incubated with an avidin and biotin blockage kit (Vector Labs,

SP2001) for 15 min twice. Then sections were incubated with primary antibody (anti-p-HER3; Cell Signaling, 4791, 1:100) for 1 h. The sections were then washed and incubated with secondary antibody linked to biotin (Southern Biotech, 6440-08, 1:500) for 45 min. After three washes, sections were incubated in streptavidin peroxidase (Invitrogen, T20934, 1:100) and revealed in tyramide-AlexaFluor 568 (Invitrogen, T20934, 1:100). Sections were counterstained with DAPI (Sigma, D9542, 2  $\mu$ g/ml) for 10 min and rinsed. Negative controls (primary antibody omission) were included.

After processing, the sections were imaged by the Cell Observer station (Zeiss). This station is composed of an inverted motorized microscope, a mercury lamp for the fluorescence, a CCD camera (Zeiss HRm), a computer, and the AxioVision software which controls the station. Images were acquired using 10 $\times$  objective; each image represents about 0.6 mm<sup>2</sup>. About three images were made by level (six images by tumor). Image analysis was carried out using Visilog software. For the p-HER3 surface, images were threshold, binarized, and surface measurement of the binarized images was done. These surfaces were divided by the number of nuclei present in each image. This number was found by determining the mean area of a nucleus.

### Statistical analysis

Results were expressed as the arithmetical mean and SE (mean  $\pm$  SE) for each group. Statistical significance in the tumor growth curves, tumor and plasma major fatty acid composition, total n-6, total n-3, n-6/n-3 ratio, and different lipid mediators in tumor samples between WT and fat-1 transgenic mice was determined using a Student's *t*-test ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ). The statistical study of the tumor p-HER3 immunohistofluorescence quantification was performed using the Mann-Whitney U test by Tanagra software ( $**P < 0.01$ ).

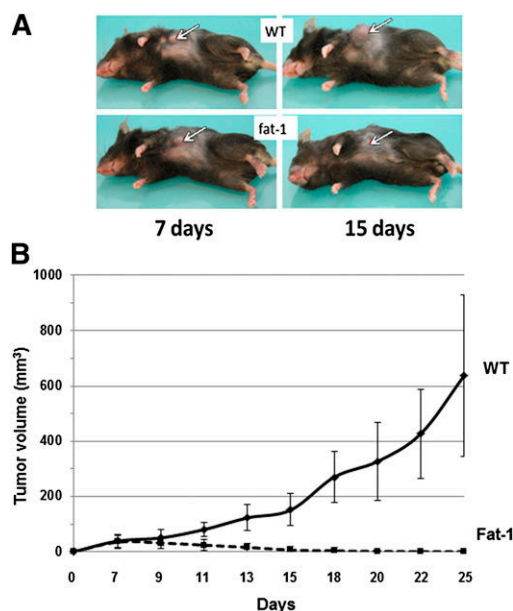
## RESULTS

### n-3 PUFAs inhibit the growth of BC xenografts in fat-1 transgenic mice

To test the hypothesis that a balanced ratio of n-6/n-3 fatty acids is able to decrease the risk of BC, we implanted E0771 mouse BC cells into the fat-1 and WT mice and examined the tumorigenicity of inoculated tumor cells. As shown in Fig. 1, there was a dramatic difference in the tumor volume between fat-1 transgenic (n = 10) and WT mice (n = 6). Over an observation period of 25 days, all mice initially developed a palpable tumor by day 7 but, importantly, all the tumors in fat-1 mice never grew more and all palpable tumors disappeared at day 18. By contrast, all the tumors in WT mice continued to grow up until host sacrifice. These findings clearly show that expression of *fat-1* inhibits the growth of BC cells in vivo and results in mammary tumor regression.

### Inhibition of HER2 signaling pathway by n-3 PUFAs in fat-1 transgenic mice

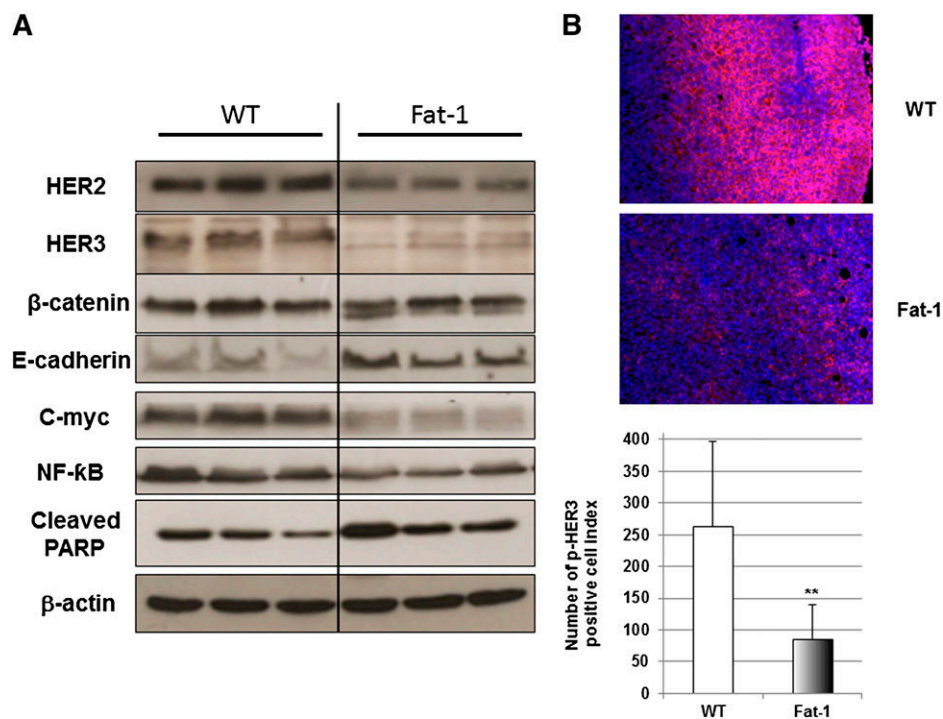
In order to define the regulation of HER2 and HER3 expression by a decreased ratio in n-6/n-3 fatty acids in fat-1 mice, tumor tissues were analyzed for the expression of HER2 and HER3 by Western blotting. Results presented in Fig. 2A demonstrate that HER2 and HER3 expressions were markedly downregulated in the tumor tissues of fat-1



**Fig. 1.** Tumorigenicity of E0771 BC cells in fat-1 transgenic and WT mice. Cells ( $5 \times 10^5$  diluted in 200  $\mu$ l of serum-free RPMI 1640 medium) were injected subcutaneously into each of 10 transgenic and 6 WT mice (10 weeks old, female). A: Representative photographs showing tumor formation at two different time points after cell implantation. B: Growth rates of melanomas in WT and fat-1 transgenic mice. Tumor growth was monitored at the indicated time points with a caliper and tumor volume was calculated on the basis of the following formula: tumor volume = (length  $\times$  width<sup>2</sup>)  $\times$  0.5. The points represent mean tumor volume  $\pm$  SE obtained from 6 WT mice or from 10 fat-1 transgenic mice. These observations have been done on four independent experiments.

mice 10 days after cell injection. Moreover, p-HER3 immunohistofluorescence was significantly ( $P < 0.01$ ) decreased in the fat-1 tumor tissues compared with the WT mice (Fig. 2B).  $\beta$ -Catenin not only plays a crucial role in morphogenesis and human cancer as a transcriptional regulator in canonical and noncanonical Wnt signaling pathways, it also takes part in cell-cell adhesion with the adhesion molecule E-cadherin, which is a potent invasion/tumor suppressor in BC (26). To investigate whether the decrease of HER2 and HER3 would affect cell-cell adhesion and  $\beta$ -catenin signaling, Western blotting was used to check the expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin. As shown in Fig. 2A, E-cadherin was markedly upregulated in the tumors of fat-1 mice compared with those in WT mice. We observed a change in the  $\beta$ -catenin expression pattern. Indeed, two protein bands were obtained for  $\beta$ -catenin expression in the fat-1 tumor tissues. We also checked the protein expression of the known transcriptional target gene *c-Myc* of  $\beta$ -catenin. As shown in Fig. 2A, *c-Myc* expression was hugely inhibited in tumors of fat-1 mice, suggesting that E-cadherin might be involved in modulating  $\beta$ -catenin signaling.

Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a pro-inflammatory and pro-survival transcriptional factor, is known to be highly involved in the initiation and progression of BC (27). As shown in Fig. 2A, fat-1 mouse tumor tissues exhibit a marked decrease of NF- $\kappa$ B protein expression compared



**Fig. 2.** Downregulation of HER2/HER3/β-catenin/c-Myc signaling pathway in fat-1 transgenic mouse tumors exhibiting enhanced n-3 PUFA tissue level. **A:** Western blotting of HER2, HER3, β-catenin, E-cadherin, c-Myc, NF-κB, cleaved PARP, and β-actin in BC xenograft tumors from three WT (lanes 1–3) and three fat-1 transgenic (lanes 4–6) mice. **B:** Representative immunohistofluorescence for p-HER3 in the tumors of the WT (top) and fat-1 transgenic (middle) mice (n = 5 and 4, respectively). p-HER3 quantification of WT and fat-1 mice is presented as number of p-HER3 positive cell index. Results are presented as mean ± SE and differences were analyzed using the Mann-Whitney U test by Tanagra software (\*\* $P < 0.01$ ).

with the WT mice. A low n-6/n-3 ratio in transgenic animals not only decreases expression of NF-κB but also induces apoptosis accompanied by an increased expression of cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Fig. 2A).

#### Tumor n-3 fatty acid enrichment and formation of PUFA-derived mediators

As shown in Fig. 3A, fatty acid composition of tumor total lipids revealed higher levels of EPA (20:5n-3) and DPA (22:5n-3) in fat-1 transgenic mice compared with WT animals, whereas arachidonic acid (AA, 20:4n-6) was decreased by 70%. Interestingly, the n-6/n-3 PUFA ratio (Fig. 3B) was significantly reduced in tumors from fat-1 mice ( $8.92 \pm 2.63$ ) compared with WT animals ( $30.51 \pm 6.99$ ) despite the animals being fed the same diet. These results indicate expression of *fat-1* enriches the transgenic animals in n-3 PUFAs at the expense of n-6 PUFAs, giving a lower n-6/n-3 ratio.

We then assessed n-6 and n-3 PUFA-derived metabolites from tumors [specifically n-6 AA (20:4n-6), n-3 EPA (20:5n-3), and DHA (22:6n-3) metabolites] by LC/ESI-MS/MS analysis to determine whether differences in tumor growth between WT and fat-1 mice were associated with these pathways. As shown in Fig. 3C, the EPA- (5-, 18-, 15-, and 12-HEPE) and DHA- (10-, 13-, 14-, and 17-HDHA) derived metabolites were identified at physiologically active levels within tumors from fat-1 mice. These metabolites were not found in tumors from WT mice. In addition to HEPE and HDHA lipid metabolites, significant amounts of n-3-derived PGE3 and TXB3 were

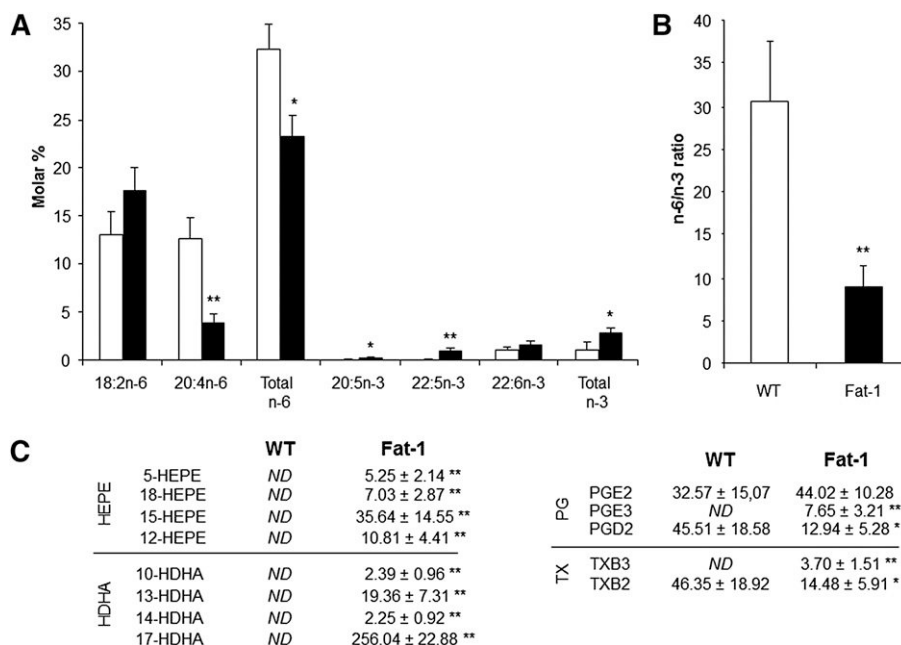
formed in tumors of fat-1 mice. There was no significant difference in the level of PGE2 between the two genotypes, but the levels of PGD2 and TXB2 were significantly lower in the fat-1 transgenic mice compared with WT mice (−72 and −70%, respectively).

#### Plasma n-3 fatty acid enrichment and total lipid level

Analysis of total lipid extracts from plasma showed distinctly different profiles between fat-1 and WT mice (Fig. 4A). There are significantly higher levels of n-3 PUFAs [20:5n-3 (EPA) and 22:6n-3 (DHA)] and a much lower concentration of n-6 PUFAs (AA, 20:4n-6) in the plasma from fat-1 transgenic mice compared with WT animals. As such, the n-6/n-3 PUFA ratio was significantly reduced in the transgenic mice (WT, 20.4:1; fat-1, 6.8:1). These data confirm that plasma was enriched in n-3 PUFAs at the expense of n-6 PUFAs, giving a lower n-6/n-3 ratio, when plasma total lipid level was not statistically changed in both groups (Fig. 4C).

#### DHA inhibits in vitro proliferation of BC cells

Given the significant growth inhibition of E0771 cells in fat-1 transgenic mice, we next assessed whether n-3 PUFAs can affect BC cell proliferation in vitro. Mouse E0771 cells and two human HER2-amplified BC cells, SK-BR-3 and BT-474, were examined for their response to DHA treatment. As shown in Fig. 5, DHA induced a concentration-dependent reduction of cell viability in all BC cell lines at 72 h. DHA treatment exhibited more robust growth inhibition



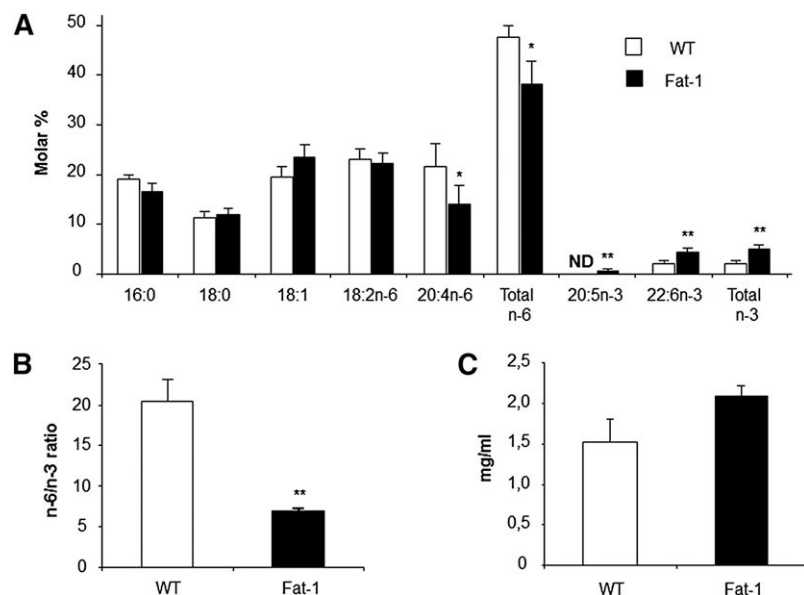
**Fig. 3.** Tumor n-3 fatty acid enrichment and formation of n-6 and n-3 PUFA-derived mediators. A: Tumor major fatty acid composition, total n-6, and total n-3. B: The n-6/n-3 ratio is indicated for WT and fat-1 transgenic mice as white and black bars respectively [results are presented as mean ± SE; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test);  $n = 8$  per group]. The n-6/n-3 ratio is given by  $(18:2n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6 + 22:5n-6) / (18:3n-3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3)$ . C: Quantification (ng/mg of tumor) of different n-6- and n-3-derived lipid mediators in tumors of WT ( $n = 4$ ) and fat-1 transgenic mice ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test).

in E0771 cells than in SK-BR-3 and BT-474 cells, exhibiting 50% of mortality with only 20  $\mu\text{M}$  of DHA ( $\text{IC}_{50}$ ) and inducing over 98% reduction of viable E0771 cells with DHA (40  $\mu\text{M}$ ) treatment.

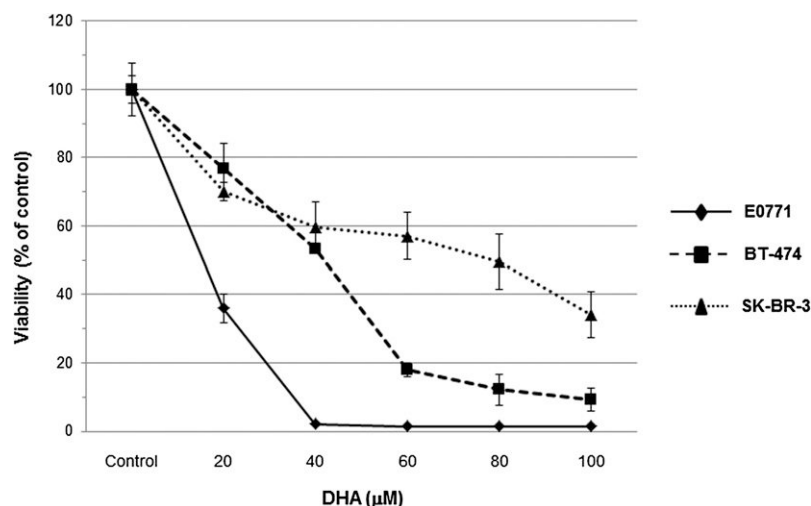
#### DHA inhibits HER2/HER3 expression and subsequent signaling

In order to assess the mechanism by which n-3 PUFAs might induce growth inhibition of BC cells, Western blotting was used to examine protein expressions in the HER2/

HER3/ $\beta$ -catenin signaling pathway in DHA-treated cells in vitro. As shown in **Fig. 6**, DHA treatment decreases HER2 and HER3 protein levels in E0771, SK-BR-3, and BT-474 cell lines; this effect was observed in a time- and dose-dependent manner (observed 24, 48, and 72 h after treatment). Importantly, treatment of DHA in SK-BR-3 and BT-474 cells for 48 h slightly downregulated HER2 and HER3, but dramatically inhibited p-HER2 and p-HER3 induced by heregulin stimulation. Similarly, the p-HER3 protein level was downregulated in E0771 cells treated with DHA for 24 h, while HER3



**Fig. 4.** Plasma n-3 fatty acid enrichment and total lipid level. A: Plasma major fatty acid composition, total n-6, total n-3, and n-6/n-3 ratio are indicated for WT and fat-1 transgenic mice as white and gray bars, respectively (mean ± SE). ND, not detected. B: Plasma fatty acid ratios in WT and fat-1 mice. C: Plasma total lipid level in WT and fat-1 animals. Results are presented as a mean ± SE. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test);  $n = 5$  per group. The n-6/n-3 ratio is given by  $(18:2n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6 + 22:5n-6) / (18:3n-3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3)$ .



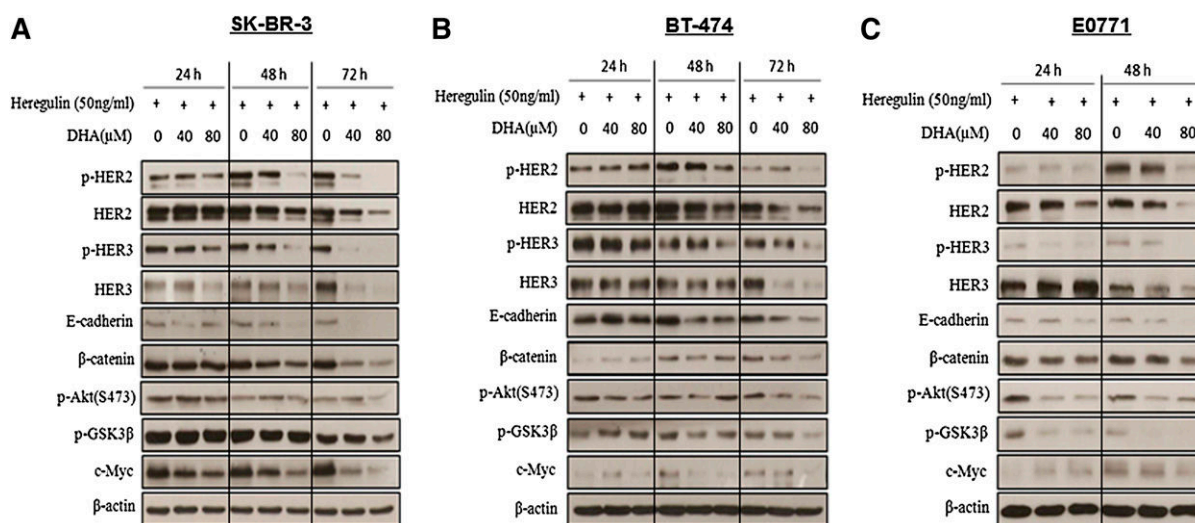
**Fig. 5.** Effects of DHA on viability of BC cells. The effect on cell viability of DHA in BT-474, SK-BR-3, and E0771 cells is assessed and quantified by MTT assay. Cells were treated with various concentrations of DHA. BT-474, SK-BR-3, and E0771 cells were seeded and cultured for 24 h in 96-well plates at a density of  $3 \times 10^3$  cells per well and cultured in medium supplemented with 10% FBS. After this period, the cells were washed twice with PBS and the medium was replaced with fresh medium with 0.5% FBS containing DHA at increasing concentrations (20–100  $\mu$ M) for a further 72 h. The number of viable cells exposed to DHA was evaluated by a colorimetric MTT assay. Data represent the mean of eight values and results are expressed as viability in comparison with controls (100%).

expression was not. These results suggest that DHA treatment not only impacts on HER2 and HER3 expression, but also on the formation of HER2/HER3 heterodimers. Given the critical role of  $\beta$ -catenin signaling in the mammary tumorigenesis, the potential effect of n-3 PUFAs on the  $\beta$ -catenin signaling was examined. As shown in Fig. 6, treatment with DHA reduced the  $\beta$ -catenin protein level in a time- and dose-dependent manner in cultured cells. Cytoplasmic  $\beta$ -catenin is controlled by a glycogen synthase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) containing destruction complex, in which GSK-3 $\beta$  is phosphorylated and inactivated leading to cytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin. To determine whether DHA treatment-induced degradation of  $\beta$ -catenin could be through inhibition of the phosphorylation of GSK-3 $\beta$  and its upstream kinase Akt, p-GSK-3 $\beta$  and p-Akt protein expressions were examined. We observed that DHA treatment downregulated GSK-3 $\beta$  and Akt phosphorylation in cultured cells. Moreover, this downregulation was more obvious in E0771 cells than in SK-BR3 and BT-474 cells. To

further validate whether DHA treatment-mediated degradation of  $\beta$ -catenin will repress the expression of target gene *c-Myc*, we examined the *c-Myc* protein level in cultured cells treated with DHA. Our results show that *c-Myc* expression was markedly downregulated in three BC cell lines treated with DHA for 48 h. We also examined the potential effect of DHA treatment on E-cadherin expression in cultured cells. Our results regarding E-cadherin protein expression indicate that E-cadherin is downregulated when E0771, BT-474, and SK-BR-3 cell lines are treated with DHA for at least 48 h. Together, our results provide evidence for the antitumor mechanism of n-3 PUFAs through inhibiting the HER2/HER3/ $\beta$ -catenin signaling pathway in BC cells.

#### In vitro validation of the relation of PUFA-derived mediators to HER2, HER3, and *c-Myc* expression

In order to validate the potential link between the observed differences in PUFA-derived mediators and the differential tumorigenicities of E0771 cells in the mice, we



**Fig. 6.** DHA inhibits HER2/HER3 expression and subsequent signaling pathway in SK-BR-3, BT-474, and E0771 cell lines. SK-BR-3 (A) and BT-474 (B) cells were treated with DHA at 40 and 80  $\mu$ M in medium supplemented with 0.5% FBS for 24, 48, and 72 h. E0771 (C) cells were treated with DHA at 40 and 80  $\mu$ M in medium supplemented with 0.5% FBS for 24 and 48 h. Heraguin  $\beta$ -1 (50 ng/ml) was added 1 h before harvest and lysates were immunoblotted as indicated for HER2, p-HER2, HER3, p-HER3, E-cadherin,  $\beta$ -catenin, p-Akt, p-GSK-3 $\beta$ , *c-Myc*, and  $\beta$ -actin protein expression.

studied the effects of PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, and 17-HDHA on the protein expression of HER2, HER3, and c-Myc in these cells in culture. As shown in Fig. 7, when HER2 protein expression was only downregulated by 17-HDHA, the HER3 protein level was highly decreased by both DHA mediators PGE<sub>3</sub> and 17-HDHA. Moreover, the exposure of E0771 cells to 1 μM PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, and 17-HDHA for 24 h dramatically decreased c-Myc expression. These data are consistent with our in vivo results suggesting that the higher levels in DHA-derived metabolites (particularly 17-HDHA) and n-3-derived PGE<sub>3</sub> in fat-1 tumors may, at least in part, mediate the antitumor effect observed in fat-1 transgenic mice.

## DISCUSSION

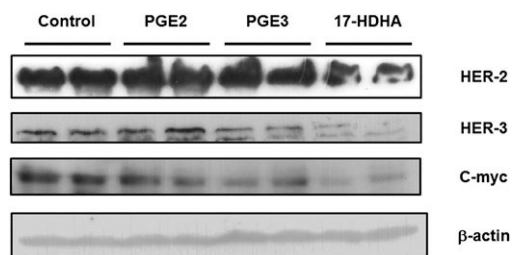
The role of PUFAs in BC development, progression, and prevention is not very well understood. PUFAs can mediate cancer development and progression through multiple mechanisms. For example, it has been shown that n-3 PUFAs, but not n-6 PUFAs, induced cell death in a mouse model of prostate cancer (28). Among important regulators of growth, survival, and apoptosis, n-3 PUFAs have been shown to induce growth inhibition of MDA-MB-231 cells by AKT phosphorylation and reduce DNA-binding activity of NF-κB (29). Similarly, treatment of BT-474 and SK-BR-3 BC cells with n-3 PUFAs suppresses the expression of HER2 oncoprotein via regulation of *HER2/neu* gene transcription (30).

Our study clearly demonstrates that the increase of endogenously synthesized n-3 PUFAs prevents BC development. Furthermore, the prevention of tumor growth is correlated with the formation of antitumor derivatives of n-3 PUFAs and with a downregulation of the HER2 signaling pathway.

A very recent study has shown that lifelong n-3 PUFA exposure was able to mitigate tumor development in an aggressive HER2-positive BC model, providing evidence that n-3 PUFAs can inhibit mammary tumorigenesis (15). Our results clearly demonstrate that more than decreasing the growth rate of the tumor, endogenous production of n-3 PUFAs in fat-1 mice induced mammary tumor regression (Fig. 1), whereas the xenografts in WT mice continued to

grow. Evidence in the literature suggests that n-3 PUFAs reduce the risk of BC, however these studies show that n-3 PUFA feeding was unable to mimic the phenotype observed in fat-1 mice (31, 32). Expression of the *fat-1* gene is a much more effective approach to modify fatty acid composition. By ubiquitously converting n-6 PUFAs to n-3 PUFAs, it significantly increases the absolute level of n-3 PUFAs as well decreases the level of n-6 PUFAs leading to a decreased ratio of n-6/n-3 PUFAs in mouse tissues, which cannot be achieved by conventional dietary intervention. Then, plasma and tumor tissue exhibited a reduced ratio of n-6 to n-3 PUFAs (Fig. 3A, B and Fig. 4A, B), compared with WT animals, in which the n-3 pathway is naturally compromised as n-3 and n-6 fatty acids share and compete for the same desaturase and elongase enzymes in their biosynthesis, which may also effect the levels of EPA- and DHA-derived metabolites.

The interesting data observed by MacLennan et al. (15) on a mammary tumorigenesis model overexpressing HER2, suggested the involvement of n-3 PUFAs on HER2 pathway regulation. Then, mechanisms underlying such involvement needed to be explored: one of the notable results of the present study was the downregulation of HER2 oncoprotein and the HER2/HER3/β-catenin signaling pathway in tumor tissues from fat-1 mice compared with WT mice. *HER2/neu*, one of the most commonly analyzed oncogenes in BC studies, is a frequent target of mammary oncogenesis (33). This orphan tyrosine kinase receptor regulates biological functions as diverse as cellular proliferation, transformation, differentiation, motility, and apoptosis (34). Recent studies have shown that fish oil and α-linolenic (18:3n-3) acid also downregulate HER2 expression (30, 32). Similarly, BC cells injected into nude mice fed fish, flaxseed, or canola oil (rich in n-3 PUFAs) formed smaller tumors with lower cell proliferation (35) and lower HER2 expression. HER2 heterodimerizes with HER3 to form an oncogenic unit where HER3 activates the PI3K/Akt pathway (5). Indeed, the inactivation of HER2 in BC cell lines (using trastuzumab) leads to decreased HER3 tyrosine phosphorylation and PI3K signaling (5, 36). In agreement with these data, we found here that HER3 protein expression was dramatically decreased in tumor tissues of the fat-1 transgenic mice (Fig. 2). This latter finding is noteworthy, as high expression of HER3 has been shown to predict early escape from HER-targeted therapies, such as the use of the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (37), and is consistent with a recent report showing that genetic ablation of HER3, or its knock-down by EZN-3920, decreased PI3K signaling and tumor growth in the mouse mammary tumor virus, *MMTV-PyVmt*, model of BC (38). Regarding the impact of n-3 PUFAs on HER2 and HER3 signaling, our studies were then extended to cultured cell lines exhibiting moderate expression of HER2 (E0771) and overexpressing HER2 (BT-474 and SK-BR-3), in which we investigated whether DHA could modulate cell proliferation and the HER2 signaling pathway. Interestingly, DHA treatment hugely inhibits proliferation/viability of the three cell lines (Fig. 5); and in addition to this inhibition, we also observed a downregulation of



**Fig. 7.** Effects of PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, and 17-HDHA on HER2, HER3, and c-Myc expression in E0771 cells. After treatment of E0771 cells with PGE<sub>2</sub> (1 μM), PGE<sub>3</sub> (1 μM), 17-HDHA (1 μM), or DMSO as control, cells were harvested, and Western blotting was performed to detect HER2, HER3, c-Myc, and β-actin expression.



HER2 and HER3 and most importantly a DHA-dramatic decrease of p-HER2 and p-HER3 in the cell lines stimulated by the HER3-specific ligand heregulin (Fig. 6). This last result suggests that the formation of HER2/HER3 heterodimer might be hindered by DHA treatment. Additionally, two protein bands are seen for HER2 in both SK-BR-3 and BT-474 cells (Fig. 6) when only one band is observed in E0771. Recently, cancer-associated splice variants in several genes have been shown to be involved in tumorigenesis. A splice variant of HER2 (p68-HER2) has been shown to be involved in BC (39). Indeed, this spliced product of HER2 specifically prevents HER2/HER3 dimer phosphorylation by disrupting dimers formed with HER2, whereas it inhibits heregulin-dependent growth in BC cells.

In addition to the tumor regression observed in the transgenic animals, tumors of the fat-1 mice exhibit a higher level of cleaved PARP and a lower level of NF- $\kappa$ B protein expression compared with the WT mice. Moreover, treatment of the three BC cell lines with DHA for 72 h resulted in a concentration- and time-dependent inhibition of cell growth (Fig. 5). In regard to both in vivo and in vitro results, the n-3 PUFA-mediated effects involved apoptosis. One of the mechanisms of action attributed to the apoptosis augment in DHA/EPA-treated MDA-MB-231 cells was impairment of Akt phosphorylation and NF- $\kappa$ B activity (29). In fact, Akt directly promotes cell survival by phosphorylating and inactivating components of the apoptotic machinery. Akt also can activate transcription factors such as NF- $\kappa$ B, critical in tumorigenesis (40). In this sense, our in vitro results confirm our in vivo results, as we also observe a decrease of p-Akt in our DHA-treated cell lines (Fig. 6). In line with this, a recent in vivo study showed an increased apoptotic index of MCF-7 cells injected into flaxseed oil-fed nude mice (35), suggesting that it was probably due to the downregulation of tyrosine kinase receptors such as HER2, and the subsequent downregulation of Akt.

In addition, our results reveal a difference in the  $\beta$ -catenin expression pattern in tumors of fat-1 transgenic mice compared with the WT mice, in which E-cadherin is significantly upregulated. Moreover, we found reduced protein expression of  $\beta$ -catenin, p-GSK3  $\beta$ , and *c-Myc* (a pro-oncogene of breast tumors) in all DHA-treated cell lines.  $\beta$ -catenin plays a crucial role in morphogenesis and human cancer through its dual function in cell-cell interactions, and as a transcriptional regulator in numerous signaling pathways (26). Besides the regulation of  $\beta$ -catenin signaling by Wnt, a number of adhesion molecules and other signaling pathways are involved in the control of  $\beta$ -catenin signaling (41). E-cadherin is a potent invasion/tumor suppressor.  $\beta$ -catenin can form a complex with E-cadherin through binding to the cytoplasmic tail of E-cadherin, which sequesters it at the plasma membrane and hinders its nucleus translocation (42). We hypothesize that the upregulation of E-cadherin observed in the tumors of fat-1 transgenic mice could play at least two potential roles: 1) it may inhibit tumor cell growth because E-cadherin has been established as both a tumor suppressor and an invasive suppressor in BCs (43); and 2) the

change in the  $\beta$ -catenin expression profile in the fat-1 tumor tissues and the huge decrease in expression of its target gene *c-Myc*, suggest that increased expression of E-cadherin reduces the availability of cytoplasmic  $\beta$ -catenin by holding it in the plasma membrane, and thereby blocking its signaling to the nucleus. This would prevent, in the nucleus, the binding of  $\beta$ -catenin to the transcription factor T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (LEF/TCF) that induces transcription of important downstream target genes implicated in cell proliferation, differentiation, and apoptosis such as *c-Myc* (44, 45). Results from Bonvini et al. (46), showing that inactivation of HER2 increases binding of  $\beta$ -catenin to E-cadherin leading to a decrease in  $\beta$ -catenin-mediated gene transcription, strengthens our results regarding E-cadherin upregulation in tumors of fat-1 mice and its potential roles played in these tissues. With regard to what we observe in the tumors of the transgenic mice, we failed to observe the upregulation of E-cadherin in cells treated with DHA (Fig. 6). This might be due to the fact that DHA-treated cell lines exhibit shrinkage and membrane rupture (data not shown) leading to decreased junctions of adhesion, which is responsible for the decrease of E-cadherin protein expression. Indeed, it has been shown that E-cadherin expression is triggered upon cell contacts being established and E-cadherin interaction will increase the E-cadherin level (47).

Another significant finding of the current study is large differences in the levels of EPA metabolites (notably 15-, 12-, and 18-HEPE) and DHA-derived mediators (particularly 17-HDHA) in the tumors of fat-1 mice compared with controls (Fig. 3C). 15-HEPE and 17-HDHA have already been linked to antitumorigenic properties (48, 49) via 15-lipoxygenase activity. These observations can be related to the marked difference in the n-6/n-3 PUFA ratio between the fat-1 and WT mice (Fig. 3A, B). As 17-HDHA is the precursor of the neuroprotectin D1, which has been reported to promote cell apoptosis (50), it is possible that the high levels of 17-HDHA in the tumors of the fat-1 mice could be an indicator of increased formation of the unstable intermediate peroxy-metabolite, 17-HpDHA, which was shown to be directly cytotoxic to fast-growing tumor cells (48), contributing to the antitumor effect beyond the mechanisms described in the above paragraph. Moreover, the tumor PUFA-derived metabolite analysis reveals an increased level of PGE3, derived from the n-3 fatty acid EPA, in the fat-1 mice compared with the WT mice, when the level of PGE2 is unchanged (Fig. 3C). When PGE2 has been shown to promote cancer development (51, 52), PGE3 has been found to have anticancer effects (53). Our results suggest that PGE3 and 17-HDHA might be anticancer metabolites, and these generated metabolites from EPA and DHA respectively may underlie the antitumor effect observed in the fat-1 transgenic mice. However, the concentration of PGE3 in the tumors of the fat-1 animals did not reach that of PGE2 suggesting that there is a role for AA-derived lipid mediators that cannot be totally replaced by EPA-derived lipid metabolites, EPA competing with AA as substrate for metabolite production. Interestingly, our in vitro experiments showed that addition of

17-HDHA downregulated HER2 and HER3 protein expression. Moreover, *c-Myc* expression was dramatically decreased by PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, and 17-HDHA exposure.

These results suggest that PGE<sub>3</sub> and 17-HDHA are anti-cancer mediators, and generation of PGE<sub>3</sub> and 17-HDHA from n-3 PUFAs may underlie the antitumor effect observed in fat-1 transgenic mice. Thus, our data demonstrate a tumorigenesis effect of n-3 fatty acids, at least in part through activation of HER2/HER3/*c-Myc* signaling pathway mediated by n-3 PUFA-derived mediators.

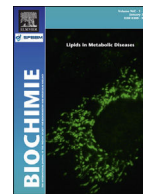
Taken together, our results provide the first evidence that expression of the *fat-1* gene, leading to tissue enrichment of n-3 PUFAs, prevents mammary tumor development. This prevention might occur by downregulating the HER2/HER3/Akt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and promoting synthesis of antitumor n-3 PUFA-derived lipid mediators in the tumors of fat-1 mice versus WT mice. These results provide encouraging preclinical evidence and molecular mechanisms by which n-3 PUFAs may regulate the malignant behavior of BC cells. In combination with conventional treatments, supplementing the diet with n-3 PUFAs may be a nontoxic means to synergistically improve cancer treatment outcomes for BC in which *HER2/neu* is overexpressed and may slow or prevent recurrence of cancer. Moreover, our study shows that used alone, an n-3 supplement may be a useful dietary alternative therapy for patients who are not candidates for standard toxic cancer therapies. **Fig**

J.B. thanks Joseph Gresti (UMR Physiopathologie des Dyslipidémies, Dijon, France) for his experience in chromatography and his help in lipid analysis, and Amandine Bataille, Amandine Chlémaire, and André Bouchot for their great expertise in histology. He also greatly thanks Laurence Decocq and Raymond Berges for taking care of the animals. A.N. and K.A.M. thank Andrew Healey (Analytical Centre, University of Bradford) for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Sliwkowski, M. X., G. Schaefer, R. W. Akita, J. A. Lofgren, V. D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B. M. Fendly, R. A. Cerione, R. L. Vandlen, and K. L. Carraway 3rd. 1994. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**: 14661–14665.
2. Gschwind, A., O. M. Fischer, and A. Ullrich. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **4**: 361–370.
3. Sithanandam, G., L. W. Fornwald, J. Fields, and L. M. Anderson. 2005. Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncogene.* **24**: 1847–1859.
4. Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B. J. Ratzkin, M. Sela, et al. 1996. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* **15**: 2452–2467.
5. Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C.F. Barbas 3rd, and N. E. Hynes. 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 8933–8938.
6. Burgess, A. W., H. S. Cho, C. Eigenbrot, K. M. Ferguson, T. P. Garrett, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, M. X. Sliwkowski, C. W. Ward, and S. Yokoyama. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell.* **12**: 541–552.
7. Yu, D., and M. C. Hung. 2000. Role of erbB2 in breast cancer chemosensitivity. *Bioessays.* **22**: 673–680.
8. Sørlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. J. Jeffrey, et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 10869–10874.
9. Travis, A., S. E. Pinder, J. F. Robertson, J. A. Bell, P. Wencyk, W. J. Gullick, R. I. Nicholson, D. N. Poller, R. W. Blamey, C. W. Elston, et al. 1996. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br. J. Cancer.* **74**: 229–233.
10. Gianni, L., T. Pienkowski, Y. H. Im, L. Roman, L. M. Tseng, M. C. Liu, A. Lluch, E. Staroslawska, J. de la Haba-Rodriguez, S. A. Im, et al. 2012. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **13**: 25–32.
11. Schoeberl, B., A. C. Faber, D. Li, M. C. Liang, K. Crosby, M. Onsum, O. Burenkova, E. Pace, Z. Walton, L. Nie, et al. 2010. An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res.* **70**: 2485–2494.
12. Campbell, M. R., D. Amin, and M. M. Moasser. 2010. HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **16**: 1373–1383.
13. MacLean, C. H., S. J. Newberry, W. A. Mojica, P. Khanna, A. M. Issa, M. J. Suttrop, Y. W. Lim, S. B. Traina, L. Hilton, R. Garland, et al. 2006. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA.* **295**: 403–415.
14. Sun, H., Y. Hu, Z. Gu, R. T. Owens, Y. Q. Chen, and I. J. Edwards. 2011. Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis.* **32**: 1518–1524.
15. MacLennan, M. B., S. E. Clarke, K. Perez, G. A. Wood, W. J. Muller, J. X. Kang, and D. W. Ma. 2013. Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* **24**: 388–395.
16. Schley, P. D., D. N. Brindley, and C. J. Field. 2007. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.* **137**: 548–553.
17. Menendez, J. A., S. Ropero, R. Lupu, and R. Colomer. 2004. Dietary fatty acids regulate the activation status of Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene in breast cancer cells. *Ann. Oncol.* **15**: 1719–1721.
18. Terry, P. D., T. E. Rohan, and A. Wolk. 2003. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 532–543.
19. Holmes, M. D., D. J. Hunter, G. A. Colditz, M. J. Stampfer, S. E. Hankinson, F. E. Speizer, B. Rosner, and W. C. Willett. 1999. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA.* **281**: 914–920.
20. Hardy, S., Y. Langelier, and M. Prentki. 2000. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* **60**: 6353–6358.
21. Chatterjee, M., M. Janarthan, R. Manivannan, A. Rana, and M. Chatterjee. 2010. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and l $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Chem. Biol. Interact.* **188**: 102–110.
22. Kang, J. X., J. Wang, L. Wu, and Z. B. Kang. 2004. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature.* **427**: 504.
23. Bellenger, J., S. Bellenger, L. Clément, S. Mandard, C. Diot, J. P. Poisson, and M. Narce. 2004. A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J.* **18**: 773–775.
24. Masoodi, M., and A. Nicolaou. 2006. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 3023–3029.
25. Masoodi, M., A. A. Mir, N. A. Petasis, C. N. Serhan, and A. Nicolaou. 2008. Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related

- hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**: 75–83.
26. Nelson, W. J., and R. Nusse. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* **303**: 1483–1487.
27. Cao, Y., and M. J. Karin. 2003. NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **8**: 215–223.
28. Berquin, I. M., Y. Min, R. Wu, J. Wu, D. Perry, J. M. Cline, M. J. Thomas, T. Thornburg, G. Kulik, A. Smith, et al. 2007. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J. Clin. Invest.* **117**: 1866–1875.
29. Schley, P. D., H. B. Jijon, L. E. Robinson, and C. J. Field. 2005. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **92**: 187–195.
30. Menéndez, J. A., A. Vázquez-Martín, S. Ropero, R. Colomer, and R. Lupu. 2006. HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in breast cancer cells: the “fat features” of the “Mediterranean diet” as an “anti-HER2 cocktail”. *Clin. Transl. Oncol.* **8**: 812–820.
31. Rose, D. P., J. M. Connolly, J. Rayburn, and M. Coleman. 1995. Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 587–592.
32. Yee, L. D., D. C. Young, T. J. Rosol, A. M. Vanbuskirk, and S. K. Clinton. 2005. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids inhibit HER-2/neu-induced breast cancer in mice independently of the PPARgamma ligand rosiglitazone. *J. Nutr.* **135**: 983–988.
33. Allred, D. C., G. M. Clark, R. Molina, A. K. Tandon, S. J. Schnitt, K. W. Gilchrist, C. K. Osborne, D. C. Tormey, and W. L. McGuire. 1992. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.* **23**: 974–979.
34. Daly, R. J. 1999. Take your partners, please—signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth Factors.* **16**: 255–263.
35. Truan, J. S., J. M. Chen, and L. U. Thompson. 2010. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**: 1414–1421.
36. Motoyama, A. B., N. E. Hynes, and H. A. Lane. 2002. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res.* **62**: 3151–3158.
37. Smith, B. L., D. Chin, W. Maltzman, K. Crosby, G. N. Hortobagyi, and S. S. Bacus. 2004. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br. J. Cancer.* **91**: 1190–1194.
38. Cook, R. S., J. T. Garrett, V. Sánchez, J. C. Stanford, C. Young, A. Chakrabarty, C. Rinehart, Y. Zhang, Y. Wu, L. Greenberger, et al. 2011. ErbB3 ablation impairs PI3K/Akt-dependent mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* **71**: 3941–3951.
39. Koletsis, T., I. Kostopoulos, E. Charalambous, B. Christoforidou, E. Nenopoulou, and V. Kotoula. 2008. A splice variant of HER2 corresponding to Herstatin is expressed in the noncancerous breast and in breast carcinomas. *Neoplasia.* **10**: 687–696.
40. Nicholson, K. M., and N. G. Anderson. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* **14**: 381–395.
41. Polakis, P. 2002. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr. Biol.* **12**: R499–R501.
42. Orsulic, S., O. Huber, H. Aberle, S. Arnold, and R. Kemler. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* **112**: 1237–1245.
43. Berrx, G., A. M. Cleton-Jansen, F. Nollet, W. J. de Leeuw, M. van de Vijver, C. Cornelisse, and F. van Roy. 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* **14**: 6107–6115.
44. Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* **127**: 469–480.
45. Gordon, M. D., and R. Nusse. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**: 22429–22433.
46. Bonvini, P., W. G. An, A. Rosolen, P. Nguyen, J. Trepel, A. Garcia de Herreros, M. Dunach, and L. M. Neckers. 2001. Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription. *Cancer Res.* **61**: 1671–1677.
47. Conacci-Sorrell, M., I. Simcha, T. Ben-Yedidia, J. Blechman, P. Savagner, and A. Ben-Ze'ev. 2003. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* **163**: 847–857.
48. Gleissman, H., R. Yang, K. Martinod, M. Lindskog, C. N. Serhan, J. I. Johnsen, and P. Kogner. 2010. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. *FASEB J.* **24**: 906–915.
49. Weylandt, K. H., L. F. Krause, B. Gomolka, C. Y. Chiu, S. Bilal, A. Nadolny, S. F. Waechter, A. Fischer, M. Rothe, and J. X. Kang. 2011. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- $\alpha$ . *Carcinogenesis.* **32**: 897–903.
50. Ariel, A., P. L. Li, W. Wang, W. X. Tang, G. Fredman, S. Hong, K. H. Gotlinger, and C. N. Serhan. 2005. The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J. Biol. Chem.* **280**: 43079–43086.
51. Rose, D. P., and J. M. Connolly. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr. Cancer.* **37**: 119–127.
52. Wu, T. 2005. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin signaling in cholangiocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta.* **1755**: 135–150.
53. Xia, S., Y. Lu, J. Wang, C. He, S. Hong, C. N. Serhan, and J. X. Kang. 2006. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 12499–12504.



## Mini-review

## n-3 polyunsaturated fatty acids and HER2-positive breast cancer: Interest of the fat-1 transgenic mouse model over conventional dietary supplementation



Zuquan Zou <sup>a, b, 1</sup>, Célia Bidu <sup>a, b</sup>, Sandrine Bellenger <sup>a, b</sup>, Michel Narce <sup>a, b</sup>, Jérôme Bellenger <sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Université de Bourgogne, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> INSERM UMR U866 Lipides Nutrition Cancer, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 April 2013

Accepted 23 August 2013

Available online 6 September 2013

## Keywords:

n-3 fatty acids

Fat-1 transgenic mouse model

HER2-positive breast cancer

## ABSTRACT

Overexpression of the tyrosine kinase receptor ErbB2/HER2/Neu, occurs in 25%–30% of invasive breast cancer (BC) with poor patient prognosis. Even if numerous studies have shown prevention of breast cancer by n-3 fatty acid intake, the experimental conditions under which n-3 fatty acids exert their protective effect have been variable from study to study, preventing unifying conclusions. Due to confounding factors, inconsistencies still remain regarding protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on BC. When animals are fed with dietary supplementation in n-3 fatty acids (the traditional approach to modify tissue content and decrease the n-6/n-3 ratio) complex dietary interactions can occur among dietary lipids (antioxidants, vitamins...) that can modulate the activity of n-3 fatty acids. So, what are the specific roles of these n-3 PUFA in reducing breast cancer risk and particularly preventing HER2-positive breast cancer? In this review, we discuss crucial points that may account for discrepancies of results and provide a highly effective genetic approach that can eliminate confounding factors of diet for evaluating the molecular mechanisms of n-3 PUFA in HER2 signaling pathway regulation. The fat-1 transgenic mouse model is capable of converting n-6 to n-3 fatty acids leading to an increase in n-3 fatty acid content with a balanced n-6/n-3 fatty acid ratio in all tissues. The fat-1 mouse model allows well-controlled studies in HER2-positive breast cancer prevention to be performed, without the conflict of potential confounding factors of diet.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer in woman. Considered as one of the cancers of better prognosis, it however remains, with a current mortality rate of 40%, one of the most threatening mortality factors throughout the world despite significant advancements in early detection techniques and relevant therapeutic approaches. Breast cancer is a highly heterogeneous disease in its clinical and histologic forms. Five subtypes of breast cancer are proposed according to molecular analysis: 1) Normal-like, 2) Luminal A and luminal B, both of which being estrogen receptor (ER)-positive; 3) basal (ER-negative) and HER2-overexpressing [1]. HER2 is a member of the epidermal growth factor family of transmembrane receptors (ErbB family) which are

known to be potent mediators of normal cell growth and development [2,3]. The individual HER proteins have nonredundant functions and unique attributes, and heterodimerization constitutes the predominant mode of signaling in this family [4]. So, binding of small peptide ligand molecules to HER receptors triggers homo- or heterodimerization and autophosphorylation, which results in enhanced cell proliferation, migration and invasion [5,6] via PI3K/AKT/ $\beta$ -catenin downstream signaling pathway [7]. The HER2/HER3 heterodimer is considered to be the most active HER dimer and is crucial for signaling in tumors containing amplification of HER2 [8,9] with respect to strength of interaction, ligand-induced tyrosine kinase phosphorylation and downstream signaling [8,10] and functions as an oncogenic unit.

### 1. HER2/HER3 process in breast cancer

HER2 has no defined ligand but possesses an active tyrosine kinase domain [11] whilst, in contrast, HER3 has several ligands, including the neuregulins (NRG) 1–4, but lacks intrinsic tyrosine

\* Corresponding author. UMR 866 "Lipides Nutrition Cancer", Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 39 38 57; fax: +33 3 80 39 63 30.

E-mail address: [jerome.bellenger@u-bourgogne.fr](mailto:jerome.bellenger@u-bourgogne.fr) (J. Bellenger).

<sup>1</sup> Medical School, Ningbo University, Fenghua Road 818, Ningbo, 315211 Zhejiang, China.

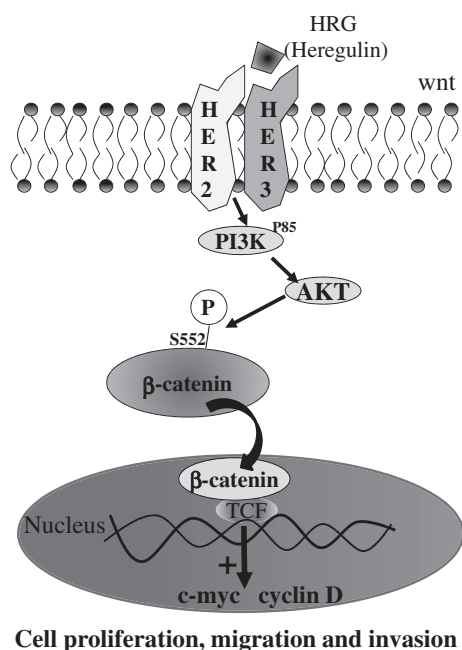
kinase activity. HER2 amplification and overexpression have been reported in a number of human tumors, occurs in 25%–30% of invasive BCs [12] and is associated with a more aggressive phenotype and a poor patient prognosis [13] because of a high incidence of metastasis [14] and intrinsic resistance to endocrine and conventional chemotherapy [15,16]. HER3 is often expressed together with HER2 in this disease [17]. While both receptors are considered promising targets for therapy, the overemphasis on HER2 has shadowed the important role of HER3 in resistance to HER2-targeted therapies [18,19]. HER3 seems to be the preferred dimerization partner when signaling occurs through the PI3K pathway [3] and, as such, is emerging as a key target for inhibition of ErbB signaling. The HER2/HER3 dimer is crucial for HER2-mediated signaling in tumors containing amplifications of HER2 [8–10]. Moreover, HER3 is as crucial as HER2 in maintaining cell proliferation in BC cells overexpressing HER2 [20,21]. In three-dimensional culture and in xenograft BC models, loss of HER3 function results in a reduced Akt phosphorylation of 50% and a rapid tumor regression.

Interfering with signaling through the HER2/HER3 dimer offers an alternative therapeutic strategy to targeting HER2 alone. Then, Anti-ErbB tyrosine kinase inhibitors might block HER3-dependent signaling through the PI3K-Akt pathway [22], requisite step in the ability of HER3 to interact with and activate downstream components of the PI3K-Akt pathway (Fig. 1). Xenograft studies with tumors generated using breast cancer cell lines or mouse embryonic fibroblasts transformed with HER2 indicated that targeting HER2 with murine monoclonal antibodies is a lasting approach for inhibiting HER2 and leading to anti-tumor activity [23,24]. The monoclonal antibody Trastuzumab binds to the extracellular membrane portion of HER2 and suppresses HER2 signaling activity, resulting in inhibition of downstream signaling pathways, cell arrest and a reduction in angiogenesis [25–27]. It has been suggested that the anti-signaling effect of trastuzumab might be

mediated through the inhibition of PI3K-Akt pathway activation [28,29].

## 2. Breast cancer prevention by n-3 polyunsaturated fatty acids

As tumors overexpressing HER2 are generally resistant to therapeutic agents, nutrition interventions might be promising therapeutic strategies in preventing and treating this aggressive subtype of cancer, by ablating HER2/HER3 expression and/or interfering with the interaction of HER2/HER3 heterodimers. Among other factors, changes in food patterns are more often associated with an increased incidence of cancers, as illustrated in migrant studies [30] and nutritional recommendations are followed by a decreased incidence of BC [31]. The contribution to mammary carcinogenesis of the specific fatty acid (FA) composition of the diet has received considerable attention in the literature. Among the FA, n-3 and n-6 FA have been suggested to respectively decrease and increase breast cancer risk [32]. Sources of n-3 FA include cold-water fish [rich in eicosapentaenoic, EPA (20:5) and docosahexaenoic acid, DHA (22:6)], seeds (flax) and nuts, and some vegetable oils (soy bean) [rich in  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3)]. Sources of n-6 FA are vegetable oils (corn or safflower oils) containing linoleic acid (LA, 18:2). Epidemiological and preclinical studies suggest a protective effect of fish oil towards breast cancer [33,34]. Numerous experimental studies indicate that n-3 FA may exert an antitumor action by altering the cell-membrane phospholipid composition and, consequently, affecting the expression and function of numerous receptors, proteins, and lipid-derived signaling molecules. In addition, *in vivo* studies demonstrate that n-3 fatty acids or their metabolites are able to reduce cellular proliferation and increase apoptosis in BC models [35]. Several of them show that animals treated with n-3 or its metabolites exhibit mammary tumor prevention [36–38], with increments of reactive oxygen species formation [38] and lipid peroxidation [39]. Akt is able to protect from apoptosis by activating antiapoptotic genes [40] and directly promoting cell survival by phosphorylating and inactivating components of the apoptotic machinery. Akt also can activate transcription factors such as NF- $\kappa$ B. In line of this, *in vivo* studies show an increased apoptotic index of MCF-7 cells injected into flaxseed oil-fed nude mice. This effect was probably due to the downregulation of tyrosine kinase receptors such as EGFR and HER2, and the subsequent downregulation of Akt [41]. It has also been reported that n-3 FA suppressed HER2/neu signaling pathways involved in the pathogenesis of BC [42,43]. Moreover, a very recent report showed that mice expressing MMTV-neu(nd1)-YD5 (Mouse Mammary Tumor Virus) an aggressive HER-2-positive BC model, and endogenously synthesizing n-3 PUFA from n-6 can mitigate tumor development [44]. Nevertheless, when the lifelong tumor development has been investigated in this mammary tumorigenesis model over-expressing HER2, mechanisms underlying such anti-cancer role of n-3 PUFA have not been elucidated. Then, the relevance of HER2 pathway involvement remains to be explored, as inhibitory dietary effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids – the two main n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) found in fish oils – have been reported on HER family members [45,46].



**Fig. 1.** Proposed schematic HER2/HER3/ $\beta$ -catenin signaling pathway. Binding of small peptide ligand molecules (Heregulin) to HER receptors triggers HER2/HER3 heterodimerization to form an oncogenic unit activating the PI3K/Akt downstream signaling pathway which phosphorylates  $\beta$ -catenin. When phosphorylated,  $\beta$ -catenin translocates to the nucleus and binds to the transcription factor TCF/LEF that induces transcription of important downstream target genes implicated in cell proliferation, differentiation and apoptosis such as *c-Myc* e.g.

## 3. Conflicting data and discrepancies regarding n-3-related studies in breast cancer

Despite research providing evidence that dietary or exogenously derived fatty acids may play a beneficial role in the etiology, evolution and/or progression of BC, many inconsistencies and discrepancies preclude definitive conclusions [47]. So, epidemiologic

studies have been inconclusive relative to the protective effects of n-3 FA against breast cancer development [33]. In regards to these observations, no recommendation can be proposed to women about n-3 FA ingestion for reduction of BC risk. Preclinical studies tend to support a protective effect of n-3 fatty acids in breast cancer prevention [39,43], but other studies showed no protection with increasing n-3 fatty acid intake [48,49], and some reported promotion of mammary carcinogenesis by fish oil [39,50–52]. Moreover, Holmes MD et al. [53], found an increased risk of BC associated with higher dietary marine n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in a cohort study with 88,795 women.

Most of the discrepancies described above (no protection, protection or promotion of BC by n-3 FA) may be explained by the fact that the experimental conditions (source of fatty acids, doses, duration of diet...) under which n-3 fatty acids exert their protective effect have been variable from study to study, preventing regular conclusions. Although feeding animals with dietary supplementation in n-3 PUFA is a traditional and safe approach to modify tissue nutrient composition and to establish an n-6/n-3 ratio close to 2–5:1, it has a number of limitations.

One of the first limitations is the variability in n-3 fatty acid content of the diet which is likely to have introduced significant experimental variability among studies, because n-3 FA levels differ among fish species, as well as within same species, owing to their developmental age, the season, and their diet at time of harvest, thus making it difficult to compare them to another [54]. Such variations may be biologically important if the beneficial effect of fish oil is restricted to a narrow n-6/n-3 ratio or to specific FA. Therefore, it appears that DHA is more active than EPA in inhibiting mammary tumorigenesis by interfering with prostaglandin metabolism [55,56].

Feeding animals fish oil supplement by gavage instead of mixing it in the diet [57,58] could modify the biological efficiency of the n-3 fatty acids.

Feeding animals with different diets that consist of many components with different materials can bring in many variations between experimental groups. So, these variations act as confounding factors and may contribute to inconsistent or conflicting results. For example, fish oils and plant seed or vegetable oils are generally used to provide n-3 and n-6 FA, respectively. These FA are derived from different sources and probably contain other bioactive compounds that may interact and therefore add further complexity to their evaluation and affect the study outcomes of interest. Indeed, marine oils, generally used in nutritional studies contain EPA and DHA but also other fatty acids and are particularly rich in vitamin D. Thus, it has been shown that oleic acid (18:1n-9) activates phosphatidylinositol 3-kinase, promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 BC cells [59] and Chatterjee M and colleagues [58] showed, in a multitargeted approach, that the combination of vitamin D with Max-epa (a fish oil supplement) was twice as effective as the individual treatments in reducing tumor incidence and multiplicity. Consequently, it is still very difficult to understand the specific roles of n-3 PUFAs on BC prevention regarding the numerous variables arising from the diets.

To achieve a significant increase of n-3 PUFA in tissue concentration *in vivo* requires a chronic intake of high doses of n-3 PUFA for a period of several weeks. It is well recognized that the polyunsaturated fatty acids are highly unstable and susceptible to oxidation. Therefore many variables arising from the diet and feeding procedure can potentially impose confounding factors. Moreover, dietary fatty acid bioavailability to cells involves a series of physiological processes including fatty acid digestion, absorption, transport, and metabolism which are altered in cancer.

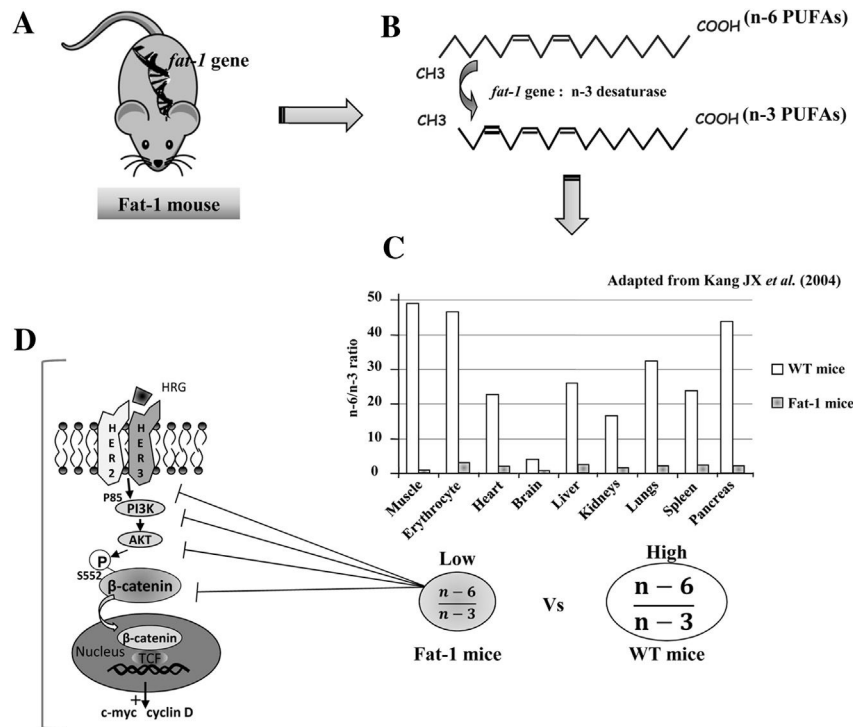
It looks clear that diets and particularly n-3 FA supplementations bring many other components that may interfere and also add

further complexity to their evaluation. Nevertheless, factors such as oil origin, preparation and storage of the diets, feeding procedures are not often discussed in n-3-related studies. Thus, the use of a mouse genetic model would allow to modify tissue essential fatty acid composition and particularly balanced the n-6/n-3 ratio under well-controlled conditions and be essential for identifying the specific roles of n-3 PUFA and addressing nutrient–gene interactions.

#### 4. The fat-1 transgenic mouse model

Although mammals contain the enzymatic activity to convert LA (18:2n-6) and ALA (18:3n-3) to the longer-chain PUFA (where the rate of conversion is limiting), they lack the 12- and 15-desaturase activities necessary to synthesize the precursor (parent) PUFA, LA, and ALA [60,61]: so these last must be present in our diet. Furthermore, the n-3 and n-6 PUFA are not interconvertible in mammalian cells [62]. Thus, LA, ALA and their elongation and desaturation products are considered essential fatty acids in mammalian and particularly in humans [63]. In 1997, a *fat-1* gene encoding a n-3 fatty acid desaturase has been cloned from the roundworm *Caenorhabditis elegans* [64]. Interestingly, this enzyme, when expressed in the plant *Arabidopsis*, can catalyze the conversion of n-6 PUFA to n-3 PUFA by introducing a n-3 double bond into their hydrocarbon chains. A study has demonstrated clearly that the *fat-1* gene can be expressed functionally in mammalian cells, and its expression could confer cells capability of converting n-6 PUFA to corresponding n-3 PUFA, leading to a balanced n-6/n-3 ratio and a change in eicosanoid production [65]. Thus, this *fat-1* gene has been used to create a transgenic mouse model [66] – the fat-1 mouse – able of converting n-6 to n-3 fatty acids (Fig. 2). By the use of a diet rich in n-6 PUFA and containing very little n-3 PUFA (similar to the western diet), fat-1 mice exhibit a tissue lipid profile very different from that of the wild-type mice: tissues of the wild-type mice are essentially constituted by n-6 PUFA (especially LA and AA) and have little n-3 PUFA in their tissues as the animals cannot naturally produce n-3 from n-6 FA, these n-3 FA resulting exclusively from food supply. On the other hand, tissues of the fat-1 mice are rich in n-3 PUFA (especially ALA, EPA and DHA derived from n-6 fatty acids). The n-6 PUFA tissue levels of these mice are strongly reduced compared to those observed in the wild type mice [67]. The fat-1 mice n-6 PUFA are massively converted into n-3 PUFA changing their n-6/n-3 ratio from 20 to 50:1 to approximately 1:1. This n-3-rich profile with drastic decrease of the n-6/n-3 ratio can be observed in all the organs and tissues such as liver, heart, kidneys, brain, muscles, and lungs [64] without changing the mass of tissue fatty acids [67]. These data clearly show that, contrary to the wild-type animals, the transgenic mice expressing the *fat-1* gene are able to produce n-3 FA from n-6 FA leading to a n-3 tissue enrichment without the need of dietary n-3 supply, source of confounding factors.

Thus, the use of fat-1 transgenic mice is such a desirable animal model that can quickly and effectively evidence therapeutic and disease-preventive effects of n-3 fatty acids in breast cancer, without the need of ingestion of supplements or change in dietary habits. In comparison with conventional dietary intervention, this approach is more effective in balancing the n-6 to n-3 ratio not only because it does elevate tissue concentrations of n-3 PUFA, but also because it does decrease the levels of excessive endogenous n-6 PUFA [66] that is ideal for identifying the specific roles of n-3 PUFA and addressing nutrient–gene interactions. Then, this mouse model would represent a useful *in vivo* system for giving new insights of the role of n-6/n-3 fatty acid ratio in breast cancer tumorigenesis. We very recently examined the impact of enhanced n-3 PUFA production, by inducing xenografts in the fat-1



**Fig. 2.** Alteration of HER2 signaling pathway by balancing n-6/n-3 fatty acid ratio: the *fat-1* transgenic mouse model. The transgenic mouse model was genetically engineered to carry a gene from the roundworm *Caenorhabditis elegans*, namely *fat-1*, which encodes a n-3 fatty acid desaturase (A). The n-3 desaturase (that does not exist in mammalian cells) can catalyze introduction of a double bond into n-6 fatty acids at the n-3 position of their hydrocarbon chain to form n-3 fatty acids (B). The wild-type animals exhibit little or no n-3 fatty acids in their tissues, whereas the *fat-1* transgenic mice have significant amounts of n-3 fatty acids and their resulting n-6/n-3 fatty acid ratio is close to 1 in all of their organs/tissues (C). The *fat-1* transgenic mouse model would be a useful *in vivo* system for giving new insights of the role of a balanced n-6/n-3 fatty acid ratio and the impact of enhanced n-3 PUFA production toward the development of breast cancer and more particularly the regulation of HER2/HER3/ $\beta$ -catenin/c-Myc signaling pathway (D).

transgenic mice, toward the development of breast cancer and observed that the tumors totally disappeared by day 15 in *fat-1* mice when they continued to grow up in the wild-type. Our results indicate that modulation of breast cancer development by n-3 fatty acids seems to be mediated in part through HER2 signaling pathway downregulation and formation of significant levels of n-3 PUFAs derived bioactive mediators in the tumor of *fat-1* mice compared to wild-type (unpublished results). Altogether, these data provide encouraging preclinical evidence and molecular mechanisms by which n-3 PUFAs may regulate the malignant behavior of BC cells.

## 5. Conclusion

The use of the *fat-1* transgenic mice in the study of n-3 fatty acids on breast cancer risk can eliminate the need of feeding animals a diet supplemented with n-3 fatty acids and thereby avoid the potential confounding factors (as type and bioavailability of n-3 fatty acids, n-6/n-3 fatty acid ratio, timing of diet...) derived from dietary supplementation. Thus, this mouse model can provide a well-controlled experimental condition for addressing the roles of n-3 fatty acids in HER2 signaling pathway regulation, and would be an important addition to the conventional methods used in this field.

In combination with standard treatments, supplementing the diet with n-3 fatty acids may be a nontoxic means to synergistically improve cancer treatment outcomes for breast cancer in which HER2 is overexpressed and may slow or prevent recurrence of cancer. Moreover, used alone, a n-3-supplement may be a useful dietary alternative for patients who are not candidates for standard toxic cancer therapies.

## Acknowledgments

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021.

## References

- [1] J. Ferlay, P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, P. Boyle, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006, *Ann. Oncol.* 18 (3) (2007) 581–592.
- [2] J. Mendelsohn, J. Baselga, Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 2787–2799.
- [3] N.E. Hynes, H.A. Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 341–354.
- [4] M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *EMBO J.* 19 (2000) 3159–3167.
- [5] M.X. Sliwkowski, G. Schaefer, R.W. Akita, J.A. Lofgren, V.D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B.M. Fendly, R.A. Cerione, R.L. Vandlen, K.L. Carraway 3rd, Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14661–14665.
- [6] A. Gschwind, O.M. Fischer, A. Ullrich, The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 361–370.
- [7] G. Sithanandam, L.W. Fornwald, J. Fields, L.M. Anderson, Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549, *Oncogene* 24 (2005) 1847–1859.
- [8] R. Pinkas-Kramarski, L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B.J. Ratzkin, M. Sela, Y. Yarden, Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions, *EMBO J.* 15 (1996) 2452–2467.
- [9] T. Holbro, R.R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C.F. Barbas 3rd, N.E. Hynes, The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 8933–8938.
- [10] E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunagaran, S. Lavi, B.J. Ratzkin, Y. Yarden, A hierarchical network of interreceptor interactions

- determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 5276–5287.
- [11] A.W. Burgess, H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P. Garrett, D.J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward, S. Yokoyama, An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors, *Mol. Cell.* 12 (2003) 541–552.
- [12] M.A. Owens, B.C. Horten, M.M. Da Silva, HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues, *Clin. Breast Cancer* 5 (2004) 63–69.
- [13] A. Citri, K.B. Skaria, Y. Yarden, The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3, *Exp. Cell. Res.* 284 (2003) 54–65.
- [14] L.E. Carlson, M. Angen, J. Cullum, E. Goodey, J. Koopmans, L. Lamont, J.H. MacRae, M. Martin, G. Pelletier, J. Robinson, J.S. Simpson, M. Speca, L. Tillotson, B.D. Bultz, High levels of untreated distress and fatigue in cancer patients, *Br. J. Cancer* (2004) 2297–2304.
- [15] D. Yu, M.C. Hung, Role of erbB2 in breast cancer chemosensitivity, *Bioessays* 22 (2000) 673–680.
- [16] T. Sørli, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10869–10874.
- [17] A. Travis, S.E. Pinder, J.F. Robertson, J.A. Bell, P. Wencyk, W.J. Gullick, R.I. Nicholson, D.N. Poller, R.W. Blamey, C.W. Elston, I.O. Ellis, C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators, *Br. J. Cancer* 74 (1996) 229–233.
- [18] B. Schoeberl, A.C. Faber, D. Li, M.C. Liang, K. Crosby, M. Onsum, O. Burenkova, E. Pace, Z. Walton, L. Nie, A. Fulgham, Y. Song, U.B. Nielsen, J.A. Engelman, K.K. Wong, An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation, *Cancer Res.* 70 (2010) 2485–2494.
- [19] L. Gianni, T. Pienkowski, Y.H. Im, L. Roman, L.M. Tseng, M.C. Liu, A. Lluch, E. Staroslawska, J. de la Haba-Rodriguez, S.A. Im, J.L. Pedrini, B. Poirier, P. Morandi, V. Semiglazov, V. Srirumunnimit, G. Bianchi, T. Szado, J. Ratnayake, G. Ross, P. Valagussa, Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial, *Lancet Oncol.* 13 (2012) 25–32.
- [20] M.R. Campbell, D. Amin, M.M. Moasser, HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 1373–1383.
- [21] S.T. Lee-Hoeflich, L. Crocker, E. Yao, T. Pham, X. Munroe, K.P. Hoeflich, M.X. Sliwkowski, H.M. Stern, A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy, *Cancer Res.* 68 (2008) 5878–5887.
- [22] B. Gril, D. Palmieri, J.L. Bronder, J.M. Herring, E. Vega-Valle, L. Feigenbaum, D.J. Liewehr, S.M. Steinberg, M.J. Merino, S.D. Rubin, P.S. Steeg, Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain, *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (2008) 1092–1103.
- [23] J.A. Drebin, V.C. Link, M.J. Greene, Monoclonal antibodies reactive with distinct domains of the neu oncogene-encoded p185 molecule exert synergistic anti-tumor effects in vivo, *Oncogene* 2 (1988) 273–277.
- [24] R.M. Hudziak, G.D. Lewis, M. Winget, B.M. Fendly, H.M. Shepard, A. Ullrich, p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1165–1172.
- [25] Y. Izumi, L. Xu, E. di Tomaso, D. Fukumura, R.K. Jain, Tumour biology: heceptin acts as an anti-angiogenic cocktail, *Nature* 416 (2002) 279–280.
- [26] X.F. Le, F.X. Claret, A. Lammayot, L. Tian, D. Deshpande, R. LaPushin, A.M. Tari, R.C. Bast Jr., The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23441–23450.
- [27] K.E. Longva, N.M. Pedersen, C. Haslekås, E. Stang, I.H. Madshus, Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2, *Int. J. Cancer* 116 (2005) 359–367.
- [28] M. Cuello, S.A. Ettenberg, A.S. Clark, M.M. Keane, R.H. Posner, M.M. Nau, P.A. Dennis, S. Lipkowitz, Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2, *Cancer Res.* 61 (2001) 4892–4900.
- [29] K. Berns, H.M. Horlings, B.T. Hennessy, M. Madiredjo, E.M. Hijmans, K. Beelen, S.C. Linn, A.M. Gonzalez-Angulo, K. Stenke-Hale, M. Hauptmann, R.L. Beijersbergen, G.B. Mills, M.J. van de Vijver, R. Bernards, A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer, *Cancer Cell* 12 (2007) 395–402.
- [30] N.J. Nelson, Migrant studies aid the search for factors linked to breast cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 436–438.
- [31] P. Puska, The north Karelia Project: 30 years success-fully preventing chronic diseases, *Diabetes Voice Spec. Issue* 53 (2008) 26–29.
- [32] K.K. Carroll, L.M. Braden, Dietary fat and mammary carcinogenesis, *Nutr. Cancer* 6 (1984) 254–259.
- [33] C.H. MacLean, S.J. Newberry, W.A. Mojica, P. Khanna, A.M. Issa, M.J. Suttorp, Y.W. Lim, S.B. Traina, L. Hilton, R. Garland, S.C. Morton, Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review, *JAMA* 295 (2006) 403–415.
- [34] D. Engeset, E. Alsaker, E. Lund, A. Welch, K.T. Khaw, F. Clavel-Chapelon, A. Thiébaud, V. Chajès, T.J. Key, N.E. Allen, P. Amiano, M. Dorronsoro, A. Tjønneland, C. Stripp, P.H. Peeters, C.H. van Gils, M.D. Chirlaque, G. Nagel, J. Linseisen, M.C. Ocké, H.B. Bueno-de-Mesquita, C. Sacerdote, R. Tumino, E. Ardanaz, M.J. Sánchez, S. Panico, D. Palli, A. Trichopoulou, V. Kalopothaki, V. Benetou, J.R. Quirós, A. Agudo, K. Overvad, L. Bjerregaard, E. Wirfält, M. Schulz, H. Boeing, N. Slimani, E. Riboli, Fish consumption and breast cancer risk. The European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC), *Int. J. Cancer* 119 (2006) 175–182.
- [35] H. Sun, Y. Hu, Z. Gu, R.T. Owens, Y.Q. Chen, I.J. Edwards, Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway, *Carcinogenesis* 32 (2011) 1518–1524.
- [36] D.P. Rose, J.M. Connolly, J. Rayburn, M. Coleman, Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 587–592.
- [37] W.E. Hardman, C.P. Avula, G. Fernandes, I.L. Cameron, Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2041–2049.
- [38] S.C. Larsson, M. Kumlin, M. Ingelman-Sundberg, A. Wolk, Dietary long chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 935–945.
- [39] S.E. Olivo, L. Hilakivi-Clarke, Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1563–1572.
- [40] K.M. Nicholson, N.G. Anderson, The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cell Signal.* 14 (2002) 381–395.
- [41] J.S. Truan, J.M. Chen, L.U. Thompson, Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1414–1421.
- [42] J.A. Menendez, R. Lupu, R. Colomer, Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells, *Eur. J. Cancer Prev.* 14 (2005) 263–270.
- [43] L.D. Yee, D.C. Young, T.J. Rosol, A.M. Vanbuskirk, S.K. Clinton, Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids inhibit HER-2/neu-induced breast cancer in mice independently of the PPARgamma ligand rosiglitazone, *J. Nutr.* 135 (2005) 983–988.
- [44] M.B. MacLennan, S.E. Clarke, K. Perez, G.A. Wood, W.J. Muller, J.X. Kang, D.W. Ma, Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 388–395.
- [45] J.A. Menendez, S. Roperio, R. Lupu, R. Colomer, Dietary fatty acids regulate the activation status of Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene in breast cancer cells, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 1719–1721.
- [46] P.D. Schley, D.N. Brindley, C.J. Field, (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells, *J. Nutr.* 137 (2007) 548–553.
- [47] P.D. Terry, T.E. Rohan, A. Wolk, Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 532–543.
- [48] L.A. Cohen, J.Y. Chen-Backlund, D.W. Sepkovic, S. Sugie, Effect of varying proportions of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion, *Lipids* 28 (1993) 449–456.
- [49] N. Wei, B. Wang, Q.Y. Zhang, M.T. Mi, J.D. Zhu, X.P. Yu, J.L. Yuan, K. Chen, J. Wang, H. Chang, Effects of different dietary fatty acids on the fatty acid compositions and the expression of lipid metabolic-related genes in mammary tumor tissues of rats, *Nutr. Cancer* 60 (2008) 810–825.
- [50] G.J. Hopkins, T.G. Kennedy, K.K. Carroll, Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis induced in Sprague–Dawley rats by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, *J. Natl. Cancer Inst.* 66 (1981) 517–522.
- [51] E. Lok, W.M. Ratnayake, F.W. Scott, R. Mongeau, S. Fernie, E.A. Nera, S. Malcolm, E. McMullen, P. Jee, D.B. Clayton, Effect of varying the type of fat in a semi-purified AIN-76A diet on cellular proliferation in the mammary gland and intestinal crypts in female Swiss Webster mice, *Carcinogenesis* 13 (1992) 1735–1741.
- [52] T. Sasaki, Y. Kobayashi, J. Shimizu, M. Wada, S. In'nami, Y. Kanke, T. Takita, Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats, *Nutr. Cancer* 30 (1998) 137–143.
- [53] M.D. Holmes, D.J. Hunter, G.A. Colditz, M.J. Stampfer, S.E. Hankinson, F.E. Speizer, B. Rosner, W.C. Willett, Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer, *JAMA* 281 (1999) 914–920.
- [54] M.C. Teale, Omega 3 Fatty Acid Research, Nova Science Publishers, New York, 2008.
- [55] K. Moriguchi, T. Yuri, K. Yoshizawa, K. Kiuchi, H. Takada, Y. Inoue, T. Hada, M. Matsumura, A. Tsubura, Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats, *Exp. Eye Res.* 77 (2003) 167–173.
- [56] T. Yuri, N. Danbara, M. Tsujita-Kyutoku, K. Fukunaga, H. Takada, Y. Inoue, T. Hada, A. Tsubura, Dietary docosahexaenoic acid suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats more effectively than eicosapentaenoic acid, *Nutr. Cancer* 45 (2003) 211–217.
- [57] S. Manna, T. Chakraborty, S. Damodaran, K. Samanta, B. Rana, M. Chatterjee, Protective role of fish oil (Maxepa) on early events of rat mammary carcinogenesis by modulation of DNA-protein crosslinks, cell proliferation and p53 expression, *Cancer Cell. Int.* 7 (2007) 6.



- [58] M. Chatterjee, M. Janarthan, R. Manivannan, A. Rana, M. Chatterjee, Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats, *Chem. Biol. Interact* 188 (2010) 102–110.
- [59] S. Hardy, Y. Langelier, M. Prentki, Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects, *Cancer Res.* 60 (2000) 6353–6358.
- [60] D.S. Knutzon, J.M. Thurmond, Y.S. Huang, S. Chaudhary, E.G. Bobik Jr., G.M. Chan, S.J. Kirchner, P. Mukerji, Identification of Delta5-desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29360–29366.
- [61] J.X. Kang, From fat to fat-1: a tale of omega-3 fatty acids, *J. Membr. Biol.* 206 (2005) 165–172.
- [62] S.H. Goodnight Jr., W.S. Harris, W.E. Connor, The effects of dietary omega 3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study, *Blood* 58 (1981) 880–885.
- [63] M.T. Clandinin, C.J. Field, K. Hargreaves, L. Morson, E. Zsigmond, Role of diet fat in subcellular structure and function, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63 (1985) 546–556.
- [64] J.P. Spsychalla, A.J. Kinney, J. Browse, Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1142–1147.
- [65] Z.B. Kang, Y. Ge, Z. Chen, J. Cluette-Brown, M. Laposata, A. Leaf, J.X. Kang, Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4050–4054.
- [66] J.X. Kang, J. Wang, L. Wu, Z.B. Kang, Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids, *Nature* 427 (2004) 504.
- [67] J. Bellenger, S. Bellenger, A. Bataille, K.A. Massey, A. Nicolaou, M. Rialland, C. Tessier, J.X. Kang, M. Narce, High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition, *Diabetes* 60 (2011) 1090–1099.

## ABSTRACT

Obesity is associated with chronic low-grade inflammatory state and secondary metabolic disorders, such as insulin-resistance, glucose intolerance and hepatic steatosis. Gut microbiota seems to play an important role in these obesity features. Moreover, microbiota dysbiosis has been shown to be associated with increased systemic lipopolysaccharides levels, called metabolic endotoxemia. N-3 PUFAs are anti-obesity and anti-inflammatory molecules able to modulate gut microbiota and prevent metabolic endotoxemia. We showed that fat-1 transgenic mice, endogenously synthesizing n-3 PUFAs, resist to obesity development and comorbidities when submitted to diet-induced obesity for 18 weeks. These mice exhibit a maintained intestinal barrier function and a prevention of metabolic endotoxemia. Moreover, cecal microbiota analysis revealed an increase of Akkermansia phylum. Microbiota transplantation of fat-1 mice to wild type mice was shown to exert protective effects against diet-induced obesity and associated disorders. Thus, increasing gut microbiota *Akkermansia* population by appropriate n-3 PUFAs may represent a promising strategy to prevent obesity, insulin-resistance, glucose intolerance and hepatic steatosis.

Key words: Obesity ; intestinal permeability ; metabolic endotoxemia ; gut microbiota ; n-3 PUFAs ; fat-1 mice

## RÉSUMÉ

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade ainsi qu'à des complications métaboliques secondaires telles que l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et la stéatose hépatique. La composition bactérienne intestinale semble tenir une place importante dans l'apparition de ces complications. Il a en effet été montré qu'une altération du microbiote par un régime obésogène était associée à une endotoxémie métabolique caractérisée par une augmentation des concentrations circulantes de lipopolysaccharides bactériens. Les AGPI en n-3 possèdent des propriétés anti-obésogènes et anti-inflammatoires qui pourraient passer par une modulation du microbiote intestinal et une prévention de l'endotoxémie métabolique. Nous avons montré que des souris transgéniques fat-1, présentant des teneurs tissulaires en AGPI en n-3 élevées, soumises durant 18 semaines à un régime obésogène, étaient résistantes à l'obésité et aux troubles métaboliques associés. Ces animaux présentent un maintien de la fonction barrière intestinale et une prévention de l'endotoxémie métabolique. De plus, une analyse du microbiote caecal révèle une augmentation du phylum *Akkermansia*. Enfin, nous avons montré qu'un transfert de matériel fécal de souris fat-1 à des souris sauvages maintenues sous régime obésogène protège ces dernières du développement d'une obésité et des comorbidités associées. Ainsi, une augmentation de la teneur en *Akkermansia* au niveau intestinal par les AGPI en n-3, peut représenter une stratégie intéressante de prévention de l'obésité, ainsi que de l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et la stéatose hépatique qui lui sont associées.

Mots-clés : Obésité ; perméabilité intestinale ; endotoxémie métabolique ; microbiote intestinale ; AGPI en n-3 ; souris transgéniques fat-1