

N° d'ordre : 4211

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

Julie COMMERE OUSTRIC

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**APPORTS NUTRITIONNELS EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 ET
ACTION CELLULAIRE DE LA VITAMINE A, EFFETS SUR LA PLASTICITÉ
CÉRÉBRALE ET LA MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LE RAT AGÉ**

Soutenue le 17 Décembre 2010

Après avis des rapporteurs :

Mme Monique LAVIALLE, Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas

M. Wojciech KREZEL, Chargé de recherche, INSERM, Strasbourg

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jacques MICHEAU, Professeur, Université Bordeaux 1 ***Président***

Mme Monique LAVIALLE, Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas ***Rapporteur***

M. Wojciech KREZEL, Chargé de recherche, INSERM, Strasbourg ***Rapporteur***

Mme Véronique PALLET, Professeur, IPB, Bordeaux ***Examineur***

M. Serge ALFOS, Ingénieur d'étude, IPB, Bordeaux ***Invité***

N° d'ordre : 4211

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

Julie COMMERE OUSTRIC

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**APPORTS NUTRITIONNELS EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 ET
ACTION CELLULAIRE DE LA VITAMINE A, EFFETS SUR LA PLASTICITÉ
CÉRÉBRALE ET LA MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LE RAT AGÉ**

Soutenue le 17 Décembre 2010

Après avis des rapporteurs :

Mme Monique LAVIALLE, Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas

M. Wojciech KREZEL, Chargé de recherche, INSERM, Strasbourg

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jacques MICHEAU, Professeur, Université Bordeaux 1

Président

Mme Monique LAVIALLE, Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas

Rapporteur

M. Wojciech KREZEL, Chargé de recherche, INSERM, Strasbourg

Rapporteur

Mme Véronique PALLET, Professeur, IPB, Bordeaux

Examineur

M. Serge ALFOS, Ingénieur d'étude, IPB, Bordeaux

Invité

A ma petite princesse, Lou-Anne.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : Monsieur le Professeur Jacques Micheau pour avoir accepté la présidence de ce jury, ainsi que Madame Monique Lavialle et Monsieur Wojciech Krezel, pour avoir corrigé attentivement mon travail. Leurs remarques et suggestions lors de la lecture de mon manuscrit m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce dernier.

Je remercie Monsieur le Professeur Paul Higuieret, directeur du laboratoire « Unité de Nutrition et Neurosciences », de m'avoir accueillie.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Professeur Véronique Pallet et Monsieur Serge Alfos qui ont dirigé ce travail de thèse et ont su me faire confiance.

Je voudrais également remercier Carole et Ludivine pour leur travail de master qu'elles ont mené avec beaucoup de sérieux et de maturité. Ce sera bientôt à ton tour Carole !

Mes remerciements vont aussi et bien sûr à mes parents qui m'ont permis d'en arriver jusque là, après un parcours scolaire accompagné de nombreux doutes et insatisfactions personnelles... mais ce n'est pas encore terminé !!!

Enfin, je remercie mon mari pour son soutien quotidien et son assiduité à son « poste » d'époux et de papa, en particulier au cours de la fin de ma thèse. Je te remercie également pour ton optimisme et ta confiance en moi (tu en as d'ailleurs manifestement plus que je n'en ai moi même !) pendant ces trois années de thèse ... et pour le futur. Tu m'as beaucoup aidé dans l'accomplissement de ce travail de thèse !

Evidemment, je remercie ma petite princesse. Tu m'as permis de positiver et relativiser dans certaines périodes de doute. Tu es le plus beau cadeau de mes trois années de thèse !

... et pour finir un petit clin d'œil au petit prince !

Résumé

APPORTS NUTRITIONNELS EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 ET ACTION CELLULAIRE DE LA VITAMINE A, EFFETS SUR LA PLASTICITÉ CÉRÉBRALE ET LA MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LE RAT ÂGÉ

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 jouent des rôles essentiels dans le fonctionnement du cerveau et notamment dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, altérés au cours du vieillissement. Il est maintenant bien admis que ces AGPI peuvent réguler la transcription génique en se liant à des récepteurs nucléaires spécifiques, les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), mais aussi aux récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinoïque, les RXR (retinoid X receptors). En tant que partenaires communs d'hétérodimérisation des PPAR et des RAR (récepteurs de l'acide tout-*trans* rétinoïque), les RXR sont des acteurs clés de la modulation de l'expression génique par les acides gras et les rétinoïdes.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était d'étudier, au cours du vieillissement chez le rat, les effets d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur l'activité des voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes, les processus de plasticité cérébrale (plasticité synaptique et neurogenèse) et la mémoire spatiale.

Nos principaux résultats montrent qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3, pendant 21 semaines chez des rats à mi-vie, maintient dans l'hippocampe les niveaux d'expression des ARNm codant pour RXR γ et GAP-43 (protéine synaptique) altérés au cours du vieillissement. De plus les rats âgés supplémentés en AGPI-LC n-3 présentent une augmentation du nombre de néo-neurones hippocampiques et une amélioration de la mémoire spatiale de travail, comparés aux rats âgés contrôle.

Les résultats de cette étude plaident en faveur d'un effet bénéfique des AGPI-LC n-3 sur la mémoire de travail au cours du vieillissement *via* notamment, une action sur la plasticité cérébrale. De plus, nos travaux suggèrent l'implication des RXR dans l'effet neuroprotecteur des AGPI-LC n-3, qui réguleraient l'expression de certains gènes cibles impliqués dans la plasticité synaptique et les processus de neurogenèse hippocampique.

Mots Clés : *acide gras polyinsaturés longue chaîne n-3 ; acide rétinoïque ; récepteurs nucléaires ; vieillissement ; plasticité synaptique ; neurogenèse hippocampique ; mémoire spatiale.*

N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS INTAKES AND CELLULAR ACTION OF VITAMIN A, EFFECTS ON CEREBRAL PLASTICITY AND SPATIAL MEMORY IN AGED RATS

Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) of the n-3 series play essential roles in brain functions, including brain plasticity and memory processes which are altered during aging. It is now well accepted that these PUFA regulate gene transcription through binding and activating specific nuclear receptors such as PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) and RXR (retinoid X receptors, which also bind 9-*cis* retinoic acid). As a common heterodimeric partner of both PPAR and RAR (all-*trans* retinoic acid receptors), RXR is a key factor in the modulation of gene expression by fatty acids and retinoids.

In this context, the purpose of this work was to study the effects of a n-3 LC-PUFA supplementation on fatty acid and retinoid signalling pathways and on cerebral plasticity and spatial memory processes.

Our main results show that n-3 LC-PUFA supplementation for 21 weeks in mid-life rats, maintains the mRNA levels of RXR γ and GAP-43 (synaptic protein) which were altered in aged rat hippocampus. Besides, supplemented aged rats exhibited increased numbers of newly generated neurons and improved spatial working memory, when compared with control aged rats.

To summarize, our results support the neuroprotective effects of n-3 LC-PUFA during aging, in particular on cerebral plasticity and working memory. Furthermore, our works suggest the implication of RXR in the set up of these effects through notably the regulation of some target genes involved in synaptic plasticity and hippocampal neurogenesis processes.

Key Words: *n-3 long chain polyunsaturated fatty acids; retinoic acid; nuclear receptors; aging; synaptic plasticity; hippocampal neurogenesis; spatial memory.*

*Table des
matières*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15

DONNES BIBLIOGRAPHIQUES

<i>I. DONNEES GENERALES SUR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET L'ACIDE RETINOÏQUE</i>	17
I.1. Les acides gras polyinsaturés	17
I.1.1. Présentation des acides gras polyinsaturés	17
I.1.2. Principales voies métaboliques des acides gras polyinsaturés	19
<i>I.1.2.1. Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés</i>	20
<i>I.1.2.2. Biosynthèse des AGPI à longue chaîne</i>	21
<i>I.1.2.3. Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs</i>	24
I.1.3. Données de consommation en acides gras polyinsaturés	28
<i>I.1.3.1. Sources alimentaires</i>	28
<i>I.1.3.2. Apports nutritionnels conseillés</i>	30
<i>I.1.3.3. Réalité de la consommation</i>	34
I.1.4. Mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés	38

I.1.4.1. <i>Les AGPI : précurseurs de médiateurs bioactifs</i>	38
I.1.4.2. <i>Les AGPI : modulateurs des propriétés membranaires</i>	39
I.1.4.3. <i>Les AGPI : modulateurs de l'expression génique</i>	40
I.1.5. Impacts physiologiques des acides gras polyinsaturés	41
I.2. L'acide rétinoïque : dérivé actif de la vitamine A	46
I.2.1. Présentation des rétinoïdes	46
I.2.2. Données de consommation en vitamine A	49
I.2.2.1. <i>Sources alimentaires</i>	49
I.2.2.2. <i>Apports nutritionnels conseillés</i>	49
I.2.3. Métabolisme général de la vitamine A	50
I.2.4. Mécanisme d'action de la vitamine A	54
I.2.5. Rôles génériques de la vitamine A et de l'acide rétinoïque	54
I.3. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque et des acides gras polyinsaturés	56
I.3.1. La superfamille des récepteurs nucléaires	56
I.3.1.1. <i>Généralités</i>	56
I.3.1.2. <i>Structure générale des récepteurs nucléaires</i>	58
I.3.1.3. <i>Mode d'action : éléments de réponse et cofacteurs</i>	60
I.3.2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque	62
I.3.2.1. <i>Les différents types de récepteurs</i>	62
I.3.2.2. <i>Régulation des récepteurs</i>	63
I.3.2.3. <i>Distribution tissulaire</i>	63
I.3.2.4. <i>Gènes cibles de l'acide rétinoïque dans le cerveau mature</i>	64

I.3.3. Les récepteurs des acides gras polyinsaturés	67
<i>I.3.3.1. Les différents types de récepteurs</i>	67
<i>I.3.3.2. Distribution tissulaire des PPAR</i>	73
<i>I.3.3.3. Gènes cibles des acides gras dans le cerveau mature</i>	74
<i>II. LE CERVEAU : ORGANE CIBLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DE L'ACIDE RETINOÏQUE</i>	76
II.1. Les acides gras polyinsaturés dans le cerveau	76
II.1.1. Données de composition	76
II.1.2. Phase d'accumulation	80
II.1.3. Mécanismes cellulaires contribuant à l'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales	81
<i>II.1.3.1. Conversion intracérébrale des précurseurs en dérivés à longue chaîne</i>	81
<i>II.1.3.2. Apports des AGPI-LC de la circulation sanguine au cerveau</i>	83
II.1.4. Rôles des AGPI dans le fonctionnement cérébral	86
<i>II.1.4.1. Modulation de la composition membranaire en DHA</i>	87
<i>II.1.4.2. Modulation de la plasticité cérébrale</i>	89
<i>II.1.4.3. Modulation des capacités mnésiques</i>	90
II.2. L'acide rétinolique dans le cerveau	92
II.2.1. Transport vers le cerveau et métabolisme cérébral	92
<i>II.2.1.1. Transport vers le cerveau</i>	92
<i>II.2.1.2. Métabolisme cérébral</i>	93
II.2.2. Rôles de l'acide rétinolique dans le fonctionnement cérébral	94

II.2.2.1. <i>Modulation de la plasticité cérébrale</i>	94
II.2.2.2. <i>Modulation des capacités mnésiques</i>	96
III. INTERACTIONS ENTRE LES VOIES DE SIGNALISATION DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DE L'ACIDE RETINOIQUE	97
IV. LE VIEILLISSEMENT CEREBRAL	100
IV.1. Données générales sur le vieillissement cérébral	100
IV.2. Vieillissement cérébral : rôle central de l'hippocampe dans les processus mnésiques et la plasticité cérébrale	102
IV.2.1. Processus mnésiques	102
IV.2.2. Plasticité cérébrale	102
IV.2.2.1. <i>Plasticité synaptique</i>	103
IV.2.2.2. <i>Neurogenèse</i>	104
IV.3. Vitamine A et vieillissement cérébral	112
IV.3.1. Conséquences du vieillissement aux niveaux métaboliques et nucléaires	112
IV.3.1.1. <i>Au niveau métabolique</i>	112
IV.3.1.2. <i>Au niveau nucléaire</i>	113
IV.3.2. Vitamine A et processus cognitifs au cours du vieillissement	113
IV.3.3. Vitamine A et plasticité cérébrale au cours du vieillissement	114

IV.4. Acides gras polyinsaturés et vieillissement cérébral	115
IV.4.1. Diminution du contenu en AGPI dans les membranes cérébrales au cours du vieillissement	115
IV.4.2. AGPI et processus cognitifs au cours du vieillissement	118
IV.4.3. AGPI et plasticité cérébrale au cours du vieillissement	120
OBJECTIFS	121

CHAPITRE I

Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique chez le rat âgé	125
---	------------

I. Introduction	125
II. Méthodologie	126
III. Principaux résultats	127
IV. Conclusion	127

<i>Article : Fish oil supplementation in aged rats restores retinoid and fatty acid signaling pathways and improves neurogenesis in the hippocampus</i>	129
---	------------

CHAPITRE II

Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire spatiale chez le rat âgé	163
--	------------

I. Introduction	163
-----------------	-----

II.	Méthodologie	164
III.	Principaux résultats	165
I.V.	Conclusion	165
	<i>Article : Fish oil supplementation in aged rats improves spatial working memory and increases GAP-43 and RXRγ mRNA expression in the hippocampus</i>	167
	DISCUSSION GENERALE	199
I.	Résumé des principaux résultats obtenus	201
	I.1. Première étude : Effets d'une supplémentation en huile de poisson sur l'activité des voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique, chez le rat âgé	201
	I.2. Deuxième étude : Effets d'une supplémentation en huile de poisson sur l'activité des voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire spatiale, chez le rat âgé	203
II.	Une supplémentation en AGPI-LC n-3 modifie l'activité cérébrale des voies de signalisation des rétinoides et des acides gras au cours du vieillissement	205
	II.1. Expression des récepteurs nucléaires des rétinoides et des acides gras dans l'hippocampe et le striatum au cours du vieillissement	205
	II.2. La supplémentation en AGPI-LC n-3 modifie les niveaux d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoides et des acides gras au cours du vieillissement	206
	II.3. La supplémentation en AGPI-LC n-3 module le niveau d'expression des protéines de transport cytosoliques FABP au cours du vieillissement	209

III. Les modifications de l'activité des voies de signalisation des rétinoides et des acides gras induites par les AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, contribuent à l'amélioration de la plasticité cérébrale et des capacités mnésiques	211
III.1. Altérations des processus de plasticité cérébrale au cours du vieillissement	212
III.2. Altérations des processus mnésiques au cours du vieillissement	214
III.3. Les modifications d'activité des voies de signalisation des rétinoides et des acides gras, induites par la supplémentation, contribuent à l'amélioration de la plasticité cérébrale au cours du vieillissement	215
III.4. Les modifications d'activité des voies de signalisation des rétinoides et des acides gras, induites par la supplémentation, contribuent à l'amélioration de la mémoire de travail au cours du vieillissement	218
IV. Perspectives	220
IV.1. Chez l'animal	220
IV.2. Chez l'Homme	221
CONCLUSION	223
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	225

*Table des
illustrations*

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Structure et nomenclature des principales familles d'acides gras.</i>	18
<i>Figure 2 : Catabolisme oxydatif des acides gras dans la mitochondrie.</i>	21
<i>Figure 3 : Biosynthèse des acides gras insaturés et familles d'acides gras.</i>	23
<i>Figure 4 : Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en acide linoléique/ acide α-linoléique sur la biosynthèse des AGPI à longue chaîne.</i>	23
<i>Figure 5 : Voies d'oxydation enzymatique des acides arachidonique et eicosapentaénoïque conduisant à la synthèse des prostanoïdes (voie des cyclo-oxygénases) et des leucotriènes (voie de la 5-lipoxygénase).</i>	26
<i>Figure 6 : Structure des principales classes de médiateurs oxygénés générés par voie enzymatique à partir des acides arachidonique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque.</i>	27
<i>Figure 7 : Effets des acides gras polyinsaturés sur la transcription de gènes du métabolisme lipidique au niveau des cellules hépatiques et de l'adipocyte.</i>	43
<i>Figure 8 : Formules chimiques de quelques rétinoïdes.</i>	47
<i>Figure 9 : Métabolisme cellulaire de l'acide rétinoïque.</i>	53
<i>Figure 10 : Structure et organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires.</i>	57
<i>Figure 11 : Architecture des récepteurs nucléaires.</i>	59
<i>Figure 12 : Exemples de dimères se fixant à des éléments de réponse formés par des séquences consensus directement répétées, séparées par 1 à 5 nucléotides.</i>	59
<i>Figure 13 : Interaction des récepteurs nucléaires avec les cofacteurs : exemple des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes.</i>	61
<i>Figure 14 : Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles.</i>	68
<i>Figure 15 : Représentation schématique de l'activité transcriptionnelle des différents dimères formés avec le RXR.</i>	72

<i>Figure 16 : Composition en acides gras du cortex frontal humain.</i>	79
<i>Figure 17 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.</i>	84
<i>Figure 18 : Représentation schématique des interactions entre les voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras.</i>	99
<i>Figure 19 : Etapes de la neurogenèse dans la formation hippocampique.</i>	107

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Composition moyenne en AGPI n-6 et n-3 de quelques aliments.</i>	29
<i>Tableau 2 : Actualisation des apports nutritionnels conseillés en acides gras pour l'adulte consommant 2000 kcal (Mars 2010).</i>	32
<i>Tableau 3 : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation de la population française.</i>	37
<i>Tableau 4 : Rapport oméga 6/oméga 3 dans plusieurs populations.</i>	37
<i>Tableau 5 : Effets des acides gras polyinsaturés sur les systèmes physiologiques.</i>	45
<i>Tableau 6 : Principales sources de vitamine A dans l'alimentation française.</i>	48
<i>Tableau 7 : Apports nutritionnels en vitamine A recommandés pour la population française.</i>	51
<i>Tableau 8 : Symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en vitamine A.</i>	55
<i>Tableau 9 : Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque.</i>	65
<i>Tableau 10 : Composition en acides gras de différents tissus d'origine humaine.</i>	78
<i>Tableau 11 : Composition en lipides du cerveau humain.</i>	78
<i>Tableau 12 : Facteurs régulant la neurogenèse.</i>	108

*Liste des
abréviations*

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	Alcool déshydrogénase
AG	Acides gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGPI-LC	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS	Acide gras saturé
AGT	Acide gras totaux
ALA	Acide α -linoléique, 18:3 n-3
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazole propionic acid
ANC	Apports nutritionnels conseillés
AR	Acide rétinoïque
ARA	Acide arachidonique, 20:4 n-6
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
COX	Cyclo-oxygénase
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
CRBP	Cellular retinol binding protein
DCX	Doublecortine
DGLA	Acide dihomogamma-linoléique, 20:3 n-6
DHA	Acide docosahexaénoïque, 22:6 n-3
DPA	Acide docosapentaénoïque, 22:5 n-6 ou n-3
EPA	Acide eicosapentaénoïque, 20:5 n-3
ER	Equivalent rétinol
FABP	Fatty acid binding protein
GAP-43	Neuromoduline
GD	Gyrus dentelé
HNF4	Hepatic nuclear factor 4
LA	Acide linoléique, 18:2 n-6
LOX	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
LXR	Liver X receptor
MA	Maladie d'Alzheimer
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Prostaglandine

PI	Phosphatidylinositol
PLT	Potentialisation à long terme
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
Ppib	Peptidylpropyl isomérase B
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PS	Phosphatidylsérine
PSD-95	Post-synaptic density protein-95
RAR	Retinoic acid receptor
RARE	Retinoic acid response element
RBP	Retinol binding protein
RC3	Neurogranine
RXR	Retinoid X receptor
SNC	Système nerveux central
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TrkA	Tropomyosin-related kinase A
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
UI	Unité internationale
ZSV	Zone sous ventriculaire

Introduction

INTRODUCTION

Chez l'Homme, le vieillissement est un processus complexe, lent et progressif, qui implique divers facteurs biologiques, psychologiques et sociaux. La définition la plus appropriée est celle de la sénescence : affaiblissement des capacités d'un individu, dû au vieillissement des tissus de son organisme et de son psychisme. Le vieillissement et l'augmentation d'espérance de vie ne constituent un gain de qualité de vie, que dans la mesure où ils sont associés à un état de santé satisfaisant, à des interactions nombreuses et à une capacité à maintenir un rôle social ; apparaît ainsi le concept de « vieillissement en bonne santé » ou « healthy ageing ».

Dans cette optique de vieillissement en bonne santé, l'alimentation constitue une stratégie de choix car il s'agit d'un facteur environnemental auquel l'individu est exposé tout au long de sa vie. De tout temps, l'alimentation a occupé une place primordiale dans la batterie de moyens de prévention des maladies. Depuis Hippocrate, né en 400 avant JC, qui considérait que « l'alimentation [était] notre première médecine », jusqu'aux recommandations nutritionnelles du Programme National Nutrition-Santé lancé en 2001, l'Homme a toujours eu conscience de l'importance de l'alimentation sur sa santé. Ainsi, parmi les nutriments d'intérêt pour notre état de santé, une attention grandissante est portée depuis quelques décennies aux acides gras polyinsaturés (AGPI). En effet, depuis peu, un ensemble de travaux mettent en évidence leur importance dans le cerveau, au cours du vieillissement.

Des données de plus en plus nombreuses font aujourd'hui état des effets bénéfiques des AGPI, notamment les AGPI de la série n-3, dans le fonctionnement cérébral, au cours de la période périnatale, mais aussi à l'âge adulte ; le cerveau étant parmi les organes les plus riches en AGPI n-3. Ainsi, la consommation d'aliments riches en AGPI n-3 a pu être corrélée à une diminution de la prévalence de nombreuses pathologies du système nerveux (dont la maladie d'Alzheimer) (Dyall and Michael-Titus, 2008). Parmi les différents rôles physiologiques cellulaires attribués à ces acides gras, il est fait mention de leur implication dans la modulation de l'expression génique. Cette action transcriptionnelle met en jeu des facteurs de transcription, notamment les récepteurs

nucléaires PPAR (peroxysome proliferator-activated receptors) et RXR (retinoid X receptor), qui régulent l'expression de gènes cibles sous forme d'hétérodimère PPAR/RXR. Les AGPI sont actuellement considérés comme des ligands du RXR, ainsi que l'acide 9-*cis* rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, qui était initialement décrit comme son unique ligand.

Il est maintenant établi que la vitamine A, joue un rôle majeur dans le fonctionnement du cerveau adulte, par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires RAR (retinoic acid receptor) et RXR, en régulant l'expression d'un grand nombre de gènes dont certains sont impliqués dans les processus de plasticité cérébrale, altérés au cours du vieillissement. Des données obtenues dans l'Unité de Nutrition et Neurosciences montrent que le vieillissement s'accompagne d'une baisse de l'activité cérébrale de la voie de signalisation de la vitamine A, laquelle participe à la mise en place de déficits cognitifs liés à l'âge, en induisant des altérations des processus de plasticité synaptique (Etchamendy et al., 2001).

L'obligation d'hétérodimérisation du PPAR avec RXR, a permis de mettre en évidence l'existence de relations extrêmement étroites entre les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A. A ce titre, des données de la littérature font état de l'importance de l'équilibre entre ces deux voies de signalisation dans l'étiologie de maladies neurologiques et psychiatriques (van Neerven et al., 2008). En plus, un travail récemment réalisé au laboratoire a mis en évidence des modifications du niveau d'expression cérébral des récepteurs nucléaires PPAR, RAR et RXR, associées à une altération de l'expression de marqueurs de la plasticité synaptique, chez des rats recevant un apport alimentaire déséquilibré en acides gras (« high fat diet »).

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif d'examiner le rôle des AGPI à longues chaînes n-3 d'origine alimentaire, sur l'activité des voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A et leurs conséquences sur les altérations de plasticité cérébrale et les déficits mnésiques au cours du vieillissement.

*Données
bibliographiques*

I. DONNEES GENERALES SUR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET L'ACIDE RETINOÏQUE

L'alimentation est un facteur environnemental auquel un individu est exposé tout au long de sa vie ; elle est aujourd'hui considérée comme un facteur de risque ou de prévention du développement de pathologies. Certains micronutriments indispensables au fonctionnement de l'organisme suscitent un intérêt particulier car leur absence ou leur présence en quantité trop faible dans la ration alimentaire entraîne des dysfonctionnements sévères pouvant conduire à l'apparition de pathologies. C'est le cas des **acides gras polyinsaturés** et de la **vitamine A**.

I.1. Les acides gras polyinsaturés

I.1.1. Présentation des acides gras polyinsaturés

Les lipides sont présents dans l'alimentation sous deux formes principales : les triglycérides (ou triacylglycérols qui représentent plus de 95% des lipides alimentaires) et les phospholipides, constitués eux-mêmes d'acides gras. Les molécules d'acides gras se composent d'une chaîne hydrocarbonée, dont la longueur varie le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbone, avec un groupement méthyle (CH₃) à l'une des extrémités et un groupement carboxyle (COOH) à l'autre. Lorsque l'acide gras (AG) ne comporte aucune double liaison dans sa chaîne hydrocarbonée, on dit qu'il est saturé (AGS). Si l'acide gras comporte une seule double liaison, il est dit monoinsaturé (AGMI), et s'il en comporte deux ou plus, polyinsaturé (ou AGPI). Deux familles d'AGPI se distinguent : la famille de l'acide linoléique ou oméga 6 (première double liaison située en 6^e position en comptant à partir de l'extrémité méthyle, également dénommée n-6) et celle de l'acide α -linoléique ou oméga 3 (3^e position en comptant à partir de l'extrémité méthyle, ou n-3). Signalons que les nutritionnistes utilisent la nomenclature « oméga », dans laquelle apparaissent successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la

Les précurseurs métaboliques des deux familles d'AGPI, l'acide linoléique (18:2 n-6, LA) pour la famille n-6 et l'acide α -linoléique (18:3 n-3, ALA) pour la famille n-3, sont des acides gras indispensables. Le caractère « indispensable » des AGPI n-6 a été démontré au début du 20^e siècle par les expériences de George et Mildred Burr qui décrivent des symptômes caractéristiques (retard de la croissance, chute de poils, dessèchement de la peau, desquamation, altérations de la reproductions, etc.) chez des rats recevant une alimentation totalement dépourvue d'acides gras (Burr and Burr, 1929). L'addition de LA à l'alimentation de ces animaux corrige leurs symptômes (Burr and Burr, 1930), suggérant que cet acide gras est indispensable. Chez l'Homme, le caractère indispensable des AGPI n-6 n'est admis qu'au début des années 60, après que les symptômes décrits précédemment soient observés chez des adultes alimentés (par voie parentérale) avec des préparations dépourvues de lipides et chez des nouveaux nés allaités avec des laits infantiles également dépourvus de graisse (Soderhjelm et al., 1970). En revanche, la possibilité que les AGPI n-3 puissent également exercer un rôle physiologique spécifique, distinct des AGPI n-6, n'est envisagée que plus tard. Ainsi, Holman et al. (1982) mettent en évidence lors d'une étude de cas, qu'une carence en ALA provoque des troubles neurologiques des systèmes sensoriels et moteurs (engourdissement, faiblesse musculaire, tristesse, problèmes de vu, etc.) qui peuvent être reversés par l'introduction d'ALA dans la solution nutritive. Le caractère indispensable des AGPI n-3 est alors admis en 1985.

Au cours du 20^e siècle, d'autres travaux ont permis d'approfondir la connaissance du métabolisme des AGPI, contribuant ainsi à la mise en évidence du caractère « essentiel » des acides gras dérivés des deux précurseurs.

I.1.2. Principales voies métaboliques des acides gras polyinsaturés

La digestion des lipides alimentaires (essentiellement triacylglycérols, phospholipides et stérols) est sous la dépendance des enzymes pancréatiques (triglycéride lipase et phospholipases) et des sels biliaires qui conduisent à la formation de micelles mixtes contenant des acides gras libres et des 2-mono-acylglycérols. Après leur absorption

(passive) par les entérocytes (intestin grêle), ils sont acheminés vers le réticulum endoplasmique où ils sont recombinaés en triacylglycérols. Les chylomicrons, lipoprotéines synthétisées dans les entérocytes, transportent alors les triglycérides vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux.

I.1.2.1. Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés

Le catabolisme des AGPI s'effectue par la voie de la β -oxydation, principalement dans les mitochondries et les peroxysomes. Auparavant, les triacylglycérols sont activés, pour cela ils sont hydrolysés par des lipases qui libèrent le glycérol et les acides gras. Ces acides gras sont ensuite thio-estérifiés en acyl-CoA qui vont réagir avec la carnitine pour donner l'acyl-carnitine grâce à une enzyme : la carnitine acyl transférase I (CAT-I). L'acyl-carnitine traverse la membrane mitochondriale (interne) et sous l'action de la CAT-II, l'acyl-CoA est reconstitué. Il devient alors le substrat de réactions qui vont se dérouler dans la matrice mitochondriale : c'est la β -oxydation proprement dite, dont un tour va conduire à un raccourcissement de deux carbones de l'acyl-CoA initial et à la libération d'un acétyl-CoA (Alessandri et al., 2009) (*figure 2*). En général, les acétyl-CoA entrent ensuite dans le cycle de Krebs où ils sont complètement oxydés en CO₂ ; mais dans le foie et dans certaines situations physiologiques particulières (jeûne, diabète) où la production d'acétyl-CoA excède les capacités du cycle de Krebs, il y a production de corps cétoniques.

Le catabolisme représente le principal devenir métabolique des AGPI indispensables (Cunnane, 2004). Il a même été montré que le LA et l'ALA sont plus activement dégradés (plus de 50 %) par β -oxydation mitochondriale que ne le sont les AGS et les AGMI, du fait de leur plus forte affinité pour la CAT-I (Clouet et al., 1989). Ainsi, le catabolisme représente une voie quantitativement 200 fois plus importante que la voie de bioconversion qui conduit à la synthèse des AGPI à très longue chaîne à partir de leurs précurseurs.

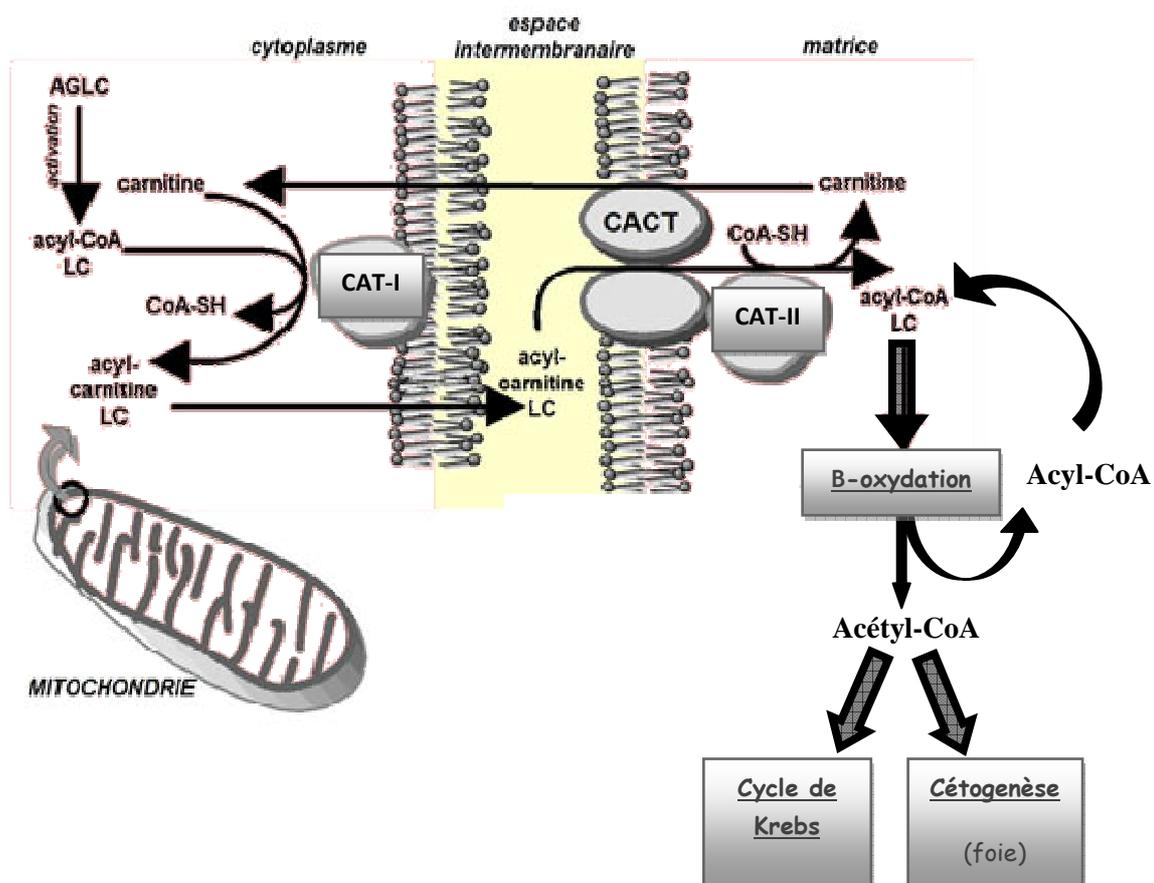


Figure 2 : Catabolisme oxydatif des acides gras dans la mitochondrie.

AGLC : acide gras longue chaîne ; CAT-I : Carnitine Acyl transférase I ; CAT-II : Carnitine Acyl transférase II ; CACT : Carnitine Acylcarnitine Translocase.

I.1.2.2. Biosynthèse des AGPI à longue chaîne

Les précurseurs métaboliques des deux familles d'AGPI, le LA pour la famille oméga 6 et l'ALA pour la famille oméga 3, sont des acides gras dits indispensables. En effet, les cellules des mammifères sont dans l'incapacité métabolique de les synthétiser car elles ne possèdent pas, contrairement aux cellules végétales, les désaturases permettant d'introduire des doubles liaisons à l'extrémité méthyle, à savoir les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases

qui génèrent successivement le 18:2 n-6 et le 18:3 n-3 à partir de l'acide oléique (18:1 n-9). Ensuite, ces deux acides gras précurseurs conduisent à la synthèse de dérivés à plus longue chaîne par une succession de désaturations et d'élongations localisée dans le réticulum endoplasmique de la cellule. Les doubles liaisons et atomes de carbone supplémentaires sont ajoutés du côté de l'extrémité carboxyle, conservant ainsi la structure n-6 et n-3 des précurseurs d'origine végétale (*figure 3*). Les principaux AGPI dérivés à longue chaîne ainsi formés dans les organismes animaux sont les acides dihomog γ -linoléique (20:3 n-6, ou DGLA) et arachidonique (20:4 n-6, ou ARA) pour la famille des oméga 6, et les acides eicosapentaénoïque (20:5 n-3, ou EPA) et docosahexaénoïque (22:6 n-3, ou DHA) pour la famille des oméga 3. Il est maintenant admis qu'une étape de rétroconversion peroxysomale (β -oxydation) est requise pour la synthèse du DHA (Voss et al., 1991 ; Sprecher, 2000) : l'acide docosapentaénoïque n-3 (22:5 n-3, ou DPA) est d'abord allongé en acide tétracosapentaénoïque (24:5 n-3, ou TPA), lequel est désaturé en position 6 à partir de l'extrémité carboxyle (action de la Δ 6 désaturase), ce qui produit l'acide tétracosahexaénoïque (24:6 n-3, ou THA). Le THA est ensuite transféré dans les peroxysomes pour y subir un seul cycle de β -oxydation générant ainsi une molécule raccourcie de deux atomes de carbone, le DHA.

Les deux familles d'AGPI, n-6 et n-3, ne sont pas inter-convertibles mais elles entrent en compétition pour la voie de désaturation-élongation, ce qui implique un équilibre métabolique entre ces deux familles (Barcelo-coblijn and Murphy, 2009). De plus, en situation d'apport alimentaire équilibré, la voie de biosynthèse des oméga 6 s'arrête à l'ARA. Elle se poursuit au-delà lorsque cet apport est déficient en oméga 3, conduisant à la synthèse d'acide docosapentaénoïque (22:5 n-6, ou DPA) en compensation de la diminution de la synthèse du DHA (*figure 4*). L'importance relative de ces deux voies de synthèse dans l'organisme est donc largement contrôlée par l'apport nutritionnel et la disponibilité relative de chaque précurseur (Nakamura and Nara, 2004). Des données ont ainsi montré que l'ALA a un effet inhibiteur sur la conversion du LA, et vice versa (Lemarchal, 1989). Cependant signalons que la Δ 6 désaturase possède une plus forte affinité pour l'ALA, qui est ainsi préférentiellement désaturé en dérivés à longue chaîne (Bézar et al., 1994).

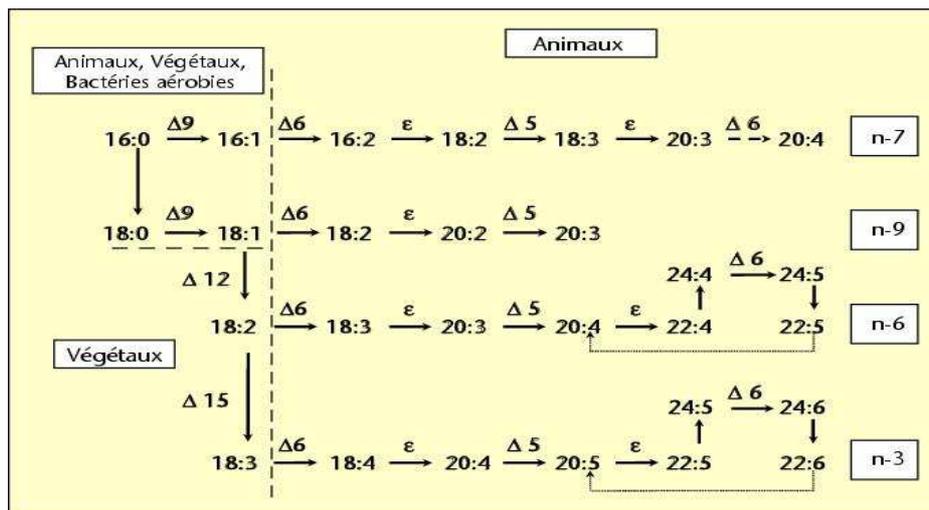


Figure 3 : Biosynthèse des acides gras insaturés et familles d'acides gras.

Source : Legrand et al., 2004

Le symbole Δ indique une désaturation, avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole ϵ indique une élongation. Les familles n-7 et n-9 ne sont pas essentielles car leur précurseur est synthétisable par l'Homme (et l'animal). Les acides gras des familles n-6 et n-3 constituent les acides gras essentiels.

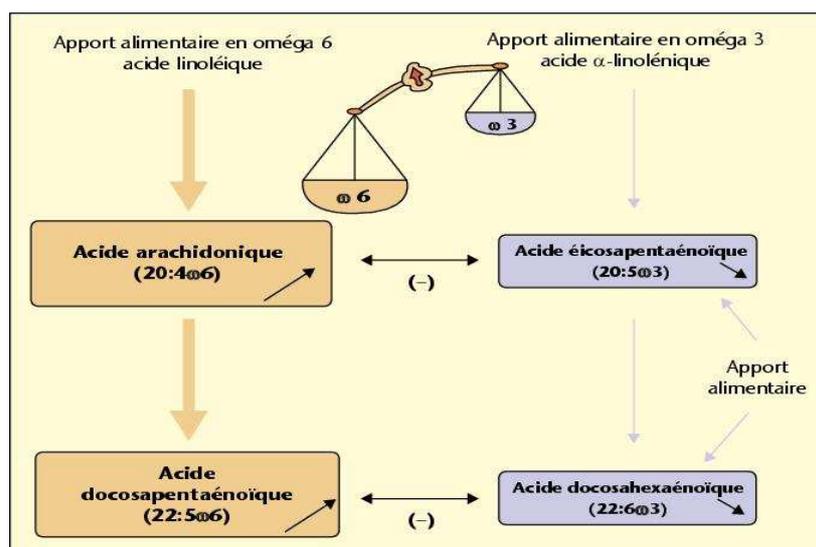


Figure 4 : Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en acide linoléique/acide α -linoléinique sur la biosynthèse des AGPI à longue chaîne.

Source : Guesnet et al., 2005

Par ailleurs, il a été montré chez le rat, qu'un régime riche en EPA et DHA administré pendant 3 semaines, diminue d'environ 50 % l'activité $\Delta 6$ -désaturase hépatique vis à vis du LA, mais influence peu la conversion de l'ALA (Christiansen et al., 1991).

De nombreux travaux montrent que le taux de conversion de l'ALA en DHA est très faible chez l'Homme (< 1 %), suggérant que le précurseur est une source trop limitée pour satisfaire la totalité des besoins en DHA des tissus humains (Burdge and Calder, 2005 ; Arterburn et al., 2006 ; Williams and Burdge, 2006 ; Plourde and Cunnane, 2007). D'autre part, des études cliniques ont mis en évidence qu'une supplémentation alimentaire avec des doses croissantes d'ALA induit l'accumulation des dérivés intermédiaires (EPA et DPA n-3) dans le plasma sans élever pour autant la teneur plasmatique en DHA (Arterburn et al., 2006). Enfin précisons que chez la femme, comparée à l'homme, une plus faible proportion d'ALA est utilisée pour la β -oxydation (effet probable de la différence de masse musculaire), tandis que la fraction convertie en dérivés à longue chaîne EPA et DHA est supérieure (effet probable du statut hormonal et des œstrogènes), et ce d'autant plus lors de la grossesse (Alessandri et al., 2009 ; Burdge, 2004 ; Williams and Burdge, 2006). Ceci permettrait de répondre à des besoins physiologiques spécifiques, notamment pendant la grossesse et l'allaitement, et aux besoins en oméga 3 du fœtus puis du nouveau né.

I.1.2.3. Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs

Trois des AGPI à 20 atomes de carbone formés par la voie de désaturation-élongation peuvent entrer dans les voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation conduisant à la formation de puissants médiateurs dénommés eicosanoïdes. Il s'agit du DGLA et de l'ARA pour la famille des oméga 6, et de l'EPA pour la famille des oméga 3. Ainsi, l'ARA et l'EPA sont les principaux précurseurs d'eicosanoïdes dans la plupart des tissus (Simopoulos, 2002). L'action de la phospholipase A2 au niveau des phospholipides membranaires libère ces AGPI dans le cytoplasme, qui peuvent alors entrer dans deux voies métaboliques distinctes : (1) la voie des cyclo-oxygénases (ou COX) générant les prostanoides, c'est à dire les prostaglandines (PG), les

prostacyclines (PGI) et les thromboxanes (TX), (2) la voie des lipoxygénases (ou LOX) produisant les leucotriènes (LT) et les acides gras hydroperoxydés et hydroxylés (*figure 5*). Les prostanoïdes sont des AGPI cyclisés et hydroxylés, renfermant un cycle constitué de 5 ou 6 atomes de carbone sur lequel sont fixés des groupes carbonyle ou époxyde. Ces AGPI sont synthétisés dans la plupart des tissus tels que le cœur, les poumons, le rein, l'endothélium vasculaire, les plaquettes, le cerveau, le tissu adipeux... Les leucotriènes sont des molécules portant toujours 3 doubles liaisons conjuguées (« triènes »), 1 ou 2 groupes hydroxyles (LTA et LTC) ou 1 groupement époxyde (LTB) et pour les plus complexes, un groupement sulfure sur lequel est fixé un acide aminé (LTC, LTD et LTE). Les leucotriènes sont principalement synthétisés par les cellules participant au processus inflammatoire : monocytes, macrophages, basophiles, mastocytes, neutrophiles. Pour chaque famille de molécule, on distingue trois séries selon la nature de l'AGPI qui en est la source. Ainsi, pour les prostanoïdes, les séries 1, 2 et 3 dérivent respectivement du DGLA, de l'ARA et de l'EPA ; pour les leucotriènes, les séries 3, 4 et 5 dérivent également de ces trois AGPI, respectivement. Chaque tissu possède l'équipement enzymatique conduisant à la synthèse de l'une ou l'autre de ces molécules.

Signalons également que le DHA n'est pas un substrat des cyclo-oxygénases, mais un inhibiteur puissant de ces enzymes. Par contre, il peut être métabolisé par les lipoxygénases, conduisant ainsi à la production de docosanoïdes. Ces dérivés oxygénés à partir du DHA comprennent les docosatriènes, résolvines et protectines (Serhan, 2005). L'étude des docosanoïdes a permis notamment l'identification de la neuroprotectine D1 (NPD1), produit de la catalyse du DHA par la 15-LOX, et qui joue des rôles dans le système nerveux central (SNC) sur les processus d'apoptose et d'inflammation (Niemoller and Bazan, 2010).

Les structures des principales classes de médiateurs oxygénés sont représentées dans la *figure 6*.

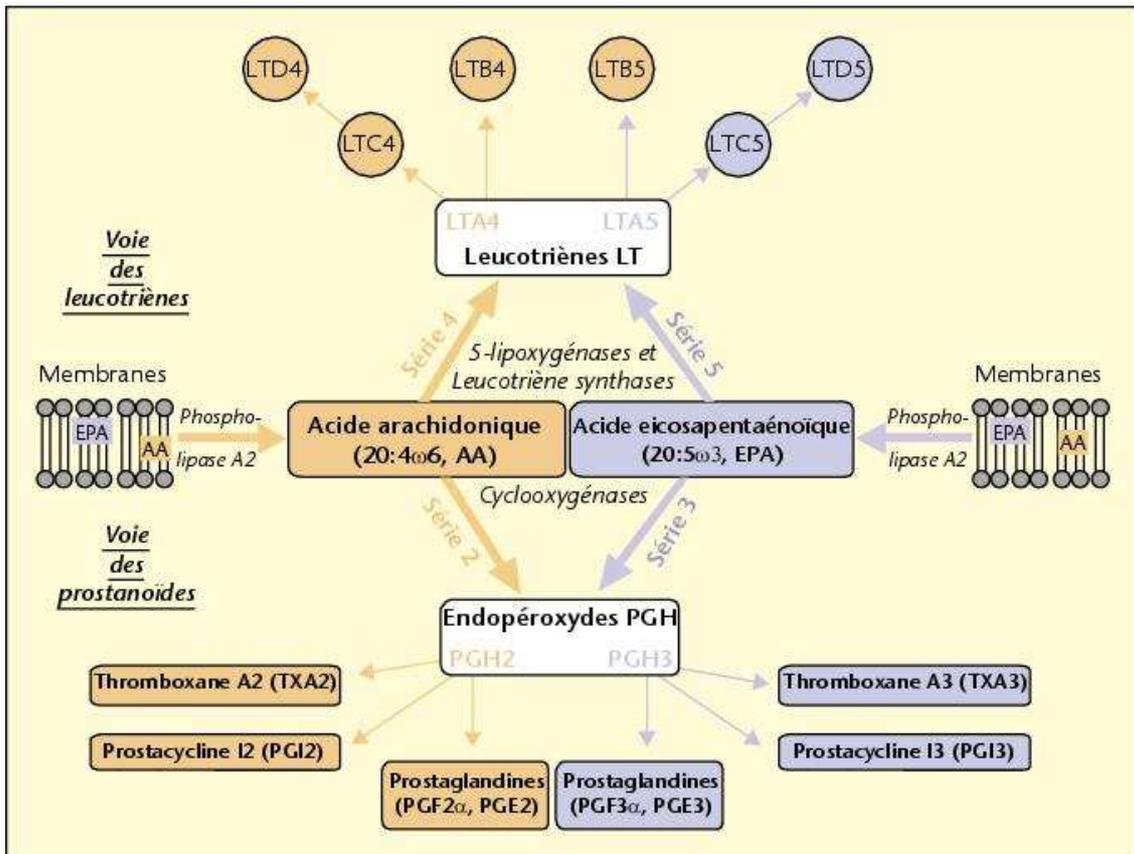


Figure 5 : Voies d'oxydation enzymatique des acides arachidonique et eicosapentaénoïque conduisant à la synthèse des prostanoides (voie des cyclo-oxygénases) et des leucotriènes (voie de la 5-lipoxygénase).

Source : Guesnet et al., 2005

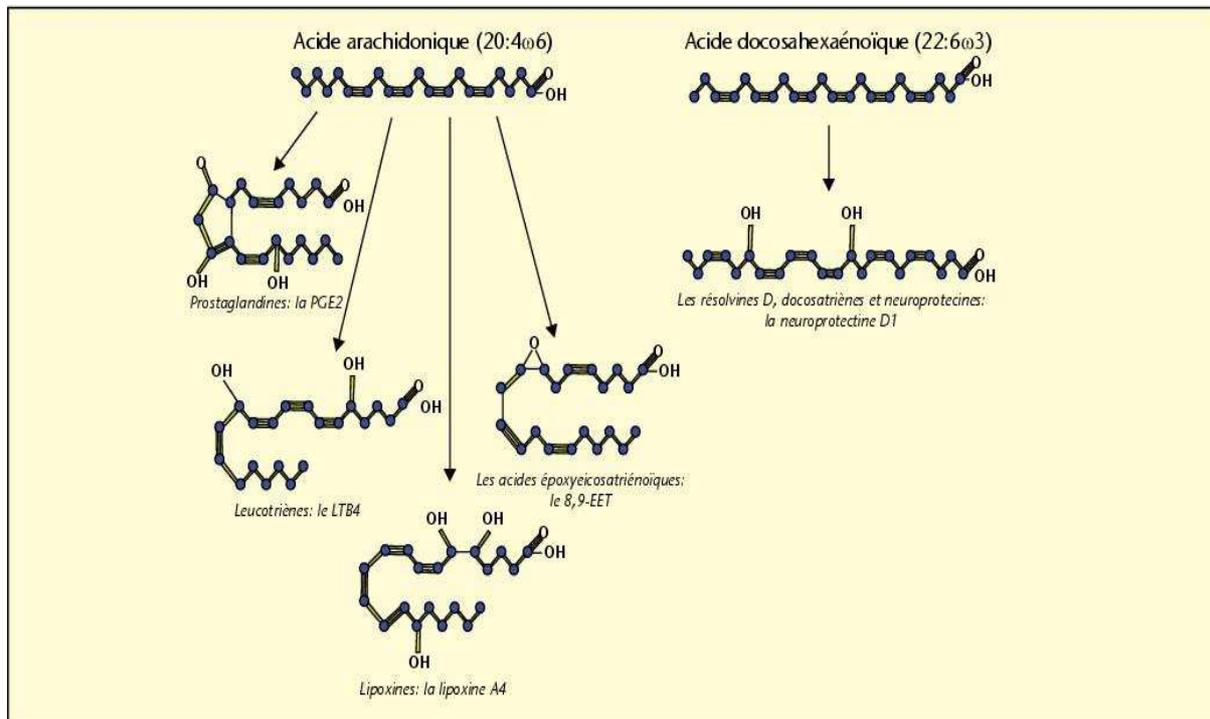


Figure 6 : Structure des principales classes de médiateurs oxygénés générés par voie enzymatique à partir des acides arachidonique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque.
Source : Guesnet et al., 2005

Pour obtenir la structure des prostanoides (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), des leucotriènes et lipoxines dérivant de l'acide eicosapentaénoïque, il suffit de rajouter dans les molécules dérivant de l'acide arachidonique, une insaturation supplémentaire en position 3 à compter du groupement méthyle terminal.

Précisons, que d'autres voies d'oxygénation enzymatique et d'oxydation non enzymatique des AGPI à 20 et 22 carbones ont été découvertes. C'est le cas de la synthèse :

- des hydroperoxydes d'AGPI oméga 6 et 3 à partir de l'ARA et de l'EPA par l'action des 5-, 8-, 12-, et 15-lipoxygénases (Yamamoto, 1992) ;
- des acide époxyeicotriénoïques (EET) issus de la peroxydation des AGPI à 20 atomes de carbone par la voie du cytochrome P450 (Spector et al., 2004) ;
- des isoprostanes et neuroprostanes dérivant d'un processus de peroxydation non-enzymatique de l'ARA et du DHA (Roberts et al., 2005).

Les fonctions exercées par les molécules présentées dans cette partie seront détaillées dans le paragraphe *I.1.4.1*.

I.1.3. Données de consommation en acides gras polyinsaturés

I.1.3.1. Sources alimentaires

Dans notre alimentation, les AGPI n-6 et n-3 peuvent être apportés par des sources végétales et animales.

Les huiles végétales sont particulièrement riches en AGPI précurseurs : LA et ALA. Ainsi, les huiles de tournesol et d'arachide sont particulièrement riches en LA (respectivement 64 % et 30 % en moyenne des acides gras totaux (AGT)), l'huile de tournesol étant même qualifiée de « linoléique » compte tenu de sa forte teneur en LA. L'ALA est majoritairement retrouvée dans les huiles de noix, colza et soja (respectivement 12, 10 et 8 % en moyenne des AGT) qui sont qualifiées d'huiles « linoléiques ». Ainsi, les huiles « linoléiques » possèdent un ratio n-6/n-3 très élevé, tandis que le ratio des huiles « linoléiques » est plus faible (< 10).

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

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

		<i>AGPI n-3</i>			<i>AGPI n-6</i>		
	AGT	ALA (18:3)	EPA (20:5)	DHA (22:6)	LA (18:2)	ARA (20:4)	n-6/n-3
	<i>g/100g</i>	<i>g/100g des AGT</i>			<i>g/100g des AGT</i>		
Huiles							
tournesol	100	0,1	-	-	77,0	-	770
arachide	100	0,0	-	-	30,5	-	-
colza	100	10,0	-	-	23,0	-	2
soja	100	8,0	-	-	54,0	-	7
olive	100	0,5	-	-	10,0	-	20
Poissons							
saumon <i>(Pacifique)</i>	5,2	1,1	13,5	18,9	1,6	0,7	0,07
truite	9,6	1,7	7,0	20,4	4,8	0,8	0,09
thon	1,2	1,6	11,3	19,4	1,6	3,2	0,15
Viandes							
poulet	3,1	0,9	0,3	0,6	12,2	0,5	7,06
bœuf	8,8	0,3	trace	trace	2,1	0,4	8,33
porc	1,6	0,5	trace	0,4	8,1	0,5	9,56

AGT : acides gras totaux ; AGPI : acides gras polyinsaturés

Les compositions en AGT sont données en g/100g d'aliments.

Les compositions en AGPI n-6 et n-3 sont données en g/100g du contenu en acides gras totaux.

En outre, signalons que les produits animaux terrestres (viande, lait, œuf) fournissent des quantités plus ou moins importantes de LA et d'ALA. De plus, certains légumes verts feuillus (épinard, mâche, pourpier) sont également des sources d'ALA.

En ce qui concerne les AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) de la famille oméga 6, dans notre alimentation courante ils sont apportés par la consommation de produits animaux terrestres (viande, œuf, lait) et de lait maternel. Les AGPI-LC oméga 3 quant à eux, sont issus principalement des poissons gras (hareng, maquereau, saumon, thon, sardines) et autres produits animaux marins, ainsi que du lait maternel. Notons que les produits animaux d'origine terrestre (viande, volaille, œufs et lait) contiennent majoritairement des dérivés n-6 et des quantités variables de n-3 selon le régime de ces animaux (Simopoulos, 2001).

La composition en acides gras des lipides du lait maternel n'échappe pas à l'influence de l'alimentation maternelle. Ainsi la composition lipidique du lait humain varie à l'intérieur et entre les populations, de moins de 0,1 % à un peu plus de 1,0 % de DHA, du fait de la différence de consommation en poissons et fruits de mer (Innis, 2004). Le lait maternel assure la couverture des besoins en AGPI n-3 (DHA essentiellement) pendant les premiers mois de la vie : le statut en AGPI n-3 du nouveau né est donc très dépendant de celui de sa mère. Concernant les laits infantiles en France, leur composition doit obéir à l'Arrêté du 11 Avril 2008. Celui-ci stipule que le ratio LA/ALA doit être compris entre 5 et 15 ; en revanche, la présence d'AGPI-LC (20 et 22 carbones) n'est pas obligatoire. Ainsi, seulement certains laits infantiles contiennent du DHA, en dépit du rôle primordial de cet acide gras dans les fonctions cérébrales.

La composition moyenne en AGPI de quelques aliments est donnée dans le *tableau 1*.

I.1.3.2. Apports nutritionnels conseillés

Les valeurs des apports nutritionnels conseillés (ANC) ont été fixées dans un objectif d'optimisation des apports, compte tenu de l'état des connaissances scientifiques. Ainsi en 2001, des ANC pour les acides gras ont été défini par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) (Martin, 2001). Aujourd'hui ces ANC ont presque

10 ans et l'Afssa vient d'actualiser les valeurs recommandées en lipides en prenant en compte les résultats d'études récentes. *(Signalons que depuis la parution de ces nouvelles recommandations, l'Afssa a fusionné avec l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) pour donner naissance, le 1^{er} Juillet 2010, à l'Anses)*

La 3^{ème} édition des apports nutritionnels conseillés pour la population française (Martin, 2001) préconisait que les lipides de la ration alimentaire devaient fournir 30-35 % de l'apport énergétique total (AET), ou plus précisément 33 %. Désormais, l'Afssa recommande que les lipides représentent 35 à 40 % de l'AET.

Chez un sujet adulte en bonne santé (homme ou femme), consommant 2000 kcal/j, l'apport en LA représente toujours 4 % de l'AET, mais l'apport en ALA a été élevé à 1 % (contre 0,8 %) de l'AET pour obtenir un rapport LA/ALA strictement inférieur à 5 (*tableau 2*), et ainsi éviter que les acides gras oméga 6 n'induisent une compétition excessive vis-à-vis des acides gras oméga 3. Les ANC pour le DHA, constituant majeur de la structure et du fonctionnement cérébral et visuel ont également été modifiés. Ils sont désormais fixés à 250 mg/j, valeur deux fois plus élevée que celle proposée en 2001, compte tenue de la confirmation par de récents travaux de la très faible conversion de l'ALA en DHA. Auparavant, il n'existait pas d'ANC pour l'EPA, car les données étaient insuffisantes. Aujourd'hui un ANC pour l'EPA a été défini, sur la base des données bibliographiques regroupant souvent EPA+DHA. Ainsi, un ANC de 250 mg/j est recommandé pour l'EPA, par soustraction à partir de la valeur de 500 mg/j pour la somme EPA+DHA. Parmi les acides gras saturés, l'Afssa distingue à présent un sous groupe « acide laurique, myristique et palmitique », athérogène en cas d'excès. Les ANC pour ce sous groupe ont été fixés à 8 % de l'AET, et globalement l'Afssa considère prudent de maintenir un apport en AGS totaux inférieur à 12 % (contre 8 % en 2001). L'acide oléique est désormais bien identifié, et doit représenter 15 à 20 % de l'AET. La limite inférieure d'apport est justifiée par le risque lié à la substitution de cet acide gras par les AGS « athérogènes en excès ».

Tableau 2 : Actualisation des apports nutritionnels conseillés en acides gras pour l'adulte consommant 2000 kcal (Mars 2010).

D'après l'avis de l'Afssa relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les acides gras (1^{er} Mars 2010).

		AG indispensables			AG non indispensables				Total	
		LA	ALA	DHA	EPA	Acide oléique	AGS totaux	Dont AGS athérogènes		Autres AG
Besoin physiologique minimal		2	0,8	250 mg	-	-	-	-	-	30
Prévention du risque	Syndrome métabolique – diabète - obésité	2	0,8	500 mg	-	-	-	-	-	30-40
	Pathologies cardiovasculaires	5	1	500-750 mg	≤ 20	≤ 12	≤ 8	-	-	35-40
	Cancers : sein et colon	2	0,8	500 mg	-	≤ 12	-	-	-	35-40
	Pathologies neuro-psychiatriques	2	0,8	≥ 200-300 mg	-	-	-	-	-	35-40
	DMLA	≤ 4	0,8	500 mg	-	-	-	-	-	< 40
ANC 2010		4	1	250 mg	250 mg	15-20	≤ 12	≤ 8	-	35-40

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

LA : acide linoléique ; ALA : acide alpha linoléique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; EPA : acide docosapentaénoïque ; AGS : acides gras saturés ; AGS athérogènes = Acide laurique (12:0) + Acide myristique (14:0) + Acide palmitique (16:0) ; Autres AG : acides gras monoinsaturés, polyinsaturés, acides gras trans et conjugués ; DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge.

Enfin, les nouveaux ANC font apparaître un dernier groupe « autre acides gras non indispensables » qui intègre un ensemble d'AG variés : polyinsaturés, monoinsaturés, *trans* et conjugués ; dont le total représente environ 2 % de l'AET. Il s'agit en fait d'AG dont les données disponibles sont actuellement insuffisantes pour définir un besoin physiologique et un ANC.

Précisons que les ANC détaillés ci-dessus, sont valables pour le sujet adulte pour un apport énergétique total moyen de 2000 kcal, et sont également applicables au sujet âgé. Pourtant en 2001, les ANC recommandaient un apport énergétique plus faible (1700 kcal) pour les sujets âgés de plus de 65 ans.

Comme auparavant, des ANC spécifiques ont été déterminés pour la femme enceinte et allaitante. En effet, la teneur en AGPI précurseurs, et dérivés à longue chaîne des séries n-6 et n-3 de l'alimentation maternelle influence le développement cérébral du nouveau-né (en particulier au cours du dernier trimestre de grossesse et pendant l'allaitement) et la santé de la mère. Concernant le DHA, des travaux épidémiologiques et cliniques ont évalué les répercussions de l'apport alimentaire en DHA et/ou EPA sur les paramètres de la grossesse et sur le développement visuel et cognitif du jeune enfant. De plus, étant donné les faibles capacités de conversion de l'ALA en DHA chez la mère et le fœtus (Williams and Burdge, 2006), les teneurs en DHA des membranes cellulaires dépendent fortement de l'apport alimentaire en DHA. Aussi, l'ANC en DHA a-t-il été fixé à 250 mg/j et l'ANC en EPA+DHA à 500 mg/j chez la femme enceinte consommant 2050 kcal et la femme allaitante consommant 2250 kcal. Précisons que les ANC pour le LA et l'ALA sont respectivement de 4 % et 1 % de l'AET (comme pour l'adulte).

D'après les recommandations de l'Afssa, la part des lipides dans l'AET du jeune enfant (0 à 3 ans) devrait représenter 40-45 % et diminuer à 35-40 % chez l'enfant et l'adolescent.

Chez l'enfant nouveau né, et jusqu'à l'âge de 3 ans, les recommandations concernant le LA et l'ALA sont fixées respectivement à un minimum de 2,7 % et 0,45 % de l'AET. Puis chez l'enfant âgé de 3 à 9 ans et l'adolescent, ce sont les ANC de l'adulte

qui s'appliquent pour ces mêmes acides gras. De façon cohérente avec les diverses recommandations internationales actuelles, un ANC pour le DHA a été fixé à 0,32 % des AG totaux chez les nourrissons de moins de 6 mois. On peut alors supposer que la réglementation sur la composition des laits infantiles en France (*cf. I.1.3.1*) évoluera vers une obligation d'une teneur minimale en DHA. Chez le nourrisson de plus de 6 mois et l'enfant en bas âge (1 à 3 ans), l'ANC pour le DHA a été fixé à 70 mg par jour, pour assurer la continuité de l'accumulation de cet AGPI dans les membranes cérébrales. Pour les enfants de plus de 3 ans, l'ANC retenu est de 125 mg/j pour le DHA et 250 mg pour EPA+DHA, compte tenu d'apports énergétiques réduits de moitié par rapport à ceux des adolescents dont l'ANC recommandé correspond à celui de l'adulte.

Le caractère novateur des ANC 2010 tient également au fait que l'ANC de chaque AG étudié a été établi à partir des besoins physiologiques minimaux et en considérant des aspects physiopathologiques (diabète, obésité, maladies cardiovasculaires, cancers, etc.). Ainsi, les valeurs proposées pour les ANC couvrent des réalités différentes pour chaque AG considéré, en fonction notamment de l'état physiopathologique du sujet et du caractère indispensable ou non des AG. Par rapport aux ANC de 2001, l'Afssa a fait évoluer ses recommandations nutritionnelles : globalement plus de lipides et d'AG oméga 3, et une attention particulière portée à un groupe d'AGS spécifiques, considéré comme athérogène en excès. Les conseils concrets qui en découlent sont de privilégier les huiles végétales riches en ALA et présentant un rapport LA/ALA proche de 5, ainsi que les poissons gras, et de modérer la consommation des graisses industrielles et animales, dans la limite de l'apport énergétique conseillé.

I.1.3.3. Réalité de la consommation

Depuis une dizaine d'années, l'apport quantitatif en lipides des français s'est stabilisé à 35-38 % de l'AET (Malvy et al., 1999, Astorg et al., 2004). Autrefois supérieure aux recommandations (*cf. ANC, 2001*), cette consommation en lipides totaux est à présent dans la nouvelle marge proposée par l'Afssa (35-40 %). Cependant d'un point de vue qualitatif, la réalité de la consommation en AG ne correspond pas aux recommandations préconisées. En effet, les AGS sont consommés en excès et représentent quasiment la

moitié de notre alimentation lipidique (46,5 %), alors que l'Afssa recommande une consommation inférieure à 32 % (de l'apport lipidique total).

Concernant les apports en AGPI, les données ont mis en évidence un déséquilibre des apports entre AGPI n-6 et n-3, traduit par la valeur du rapport de leurs précurseurs respectifs LA/ALA. En raison de la compétition existant entre ces deux AGPI, les ANC recommandent un ratio strictement inférieur à 5 ; or, en France, ce rapport évolue entre 11 et 14 (Combe and Boué, 2001 ; Astorg et al., 2004). Notons, qu'au Japon où l'utilisation d'huiles de colza et de soja est courante, le rapport LA/ALA varie de 4 à 8 (Kuriki et al., 2003). Différentes études ont permis de fournir des éléments sur les niveaux de consommation en LA et ALA pour la population française : Transfair (Hulshof et al., 1999), Aquitaine (Combe and Boué, 2001), SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Anti-oxydants) (Hercberg et al., 2004) et INCA (INSuffisance CARDIAque) (Razanamahefa et al., 2005). Il ressort de ces études que l'apport moyen en ALA (environ 0,6 g/j pour Transfair, 0,7g/j pour Aquitaine, 1 g/j pour SU.VI.MAX et 0,1 g/j pour INCA) est insuffisant et très loin de couvrir l'ANC défini pour cet acide gras (2,2 g/j). Par opposition, les apports moyens en LA sont plus de dix fois supérieurs aux apports en ALA ; de ce fait, le rapport LA/ALA prend des valeurs trop élevées (*tableau 3*).

Concernant les apports en AGPI-LC, notamment de la série oméga 3, il existe très peu de données de consommation pour la population française. L'étude SU.VI.MAX a permis de montrer sur la cohorte étudiée (4884 sujets) que l'apport moyen en EPA était de 150 mg/j pour les hommes et 118 mg/j pour les femmes (contre 250 mg préconisé par les ANC 2010). Quant au DHA, la consommation moyenne était de 273 mg/j et 226 mg/j pour l'homme et la femme respectivement (Astorg et al., 2004). La consommation moyenne en DHA rapportée dans cette étude semble assez proche des recommandations (250 mg DHA/j). Cependant, il existe dans la population étudiée une très grande variabilité dans les niveaux d'apports en DHA, suggérant que ce résultat n'est peut être pas représentatif de l'ensemble de la population française.

A la vue de ces données, il convient de signaler que ces estimations d'apport en AGPI n-3 dans la population française doivent être considérées avec précaution, compte-tenu des limites des tables de composition nutritionnelle souvent incomplètes pour ce

nutriment, ainsi que des biais liés aux reports de consommation d'un nutriment consommé en faible quantité et de façon très variable d'un jour à l'autre. En dépit de ces imprécisions, les données convergent et permettent d'affirmer que la population française est en situation d'insuffisance d'apports en ALA, pouvant être assimilée à un risque de déficience. Notons que dans la majorité des sociétés occidentales, le rapport global oméga 6/oméga 3 n'a cessé d'augmenter au cours du siècle dernier (Musket et al., 2004 ; Simopoulos, 2008) ; conséquence de changements de modes de consommation (*tableau 4*).

Le ratio LA/ALA est un déterminant important de l'homéostasie et du développement. Ainsi, l'excès d'apport en AGPI n-6 par rapport aux AGPI n-3, tel qu'il est rencontré dans nos sociétés occidentales, est préjudiciable pour notre santé car il semble contribuer à l'étiologie d'un grand nombre de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose, les maladies inflammatoires et auto-immunes, l'obésité ou le diabète. A l'inverse, un ratio LA/ALA faible, favorisé par un apport accru en AGPI n-3, semble participer à la prévention de ces mêmes pathologies (Simopoulos, 2006).

Tableau 3 : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation de la population française.

Etudes	Population	Rapport LA/ALA
Transfair (1995-1996) (Hulshof et al., 1999)	300 hommes 463 femmes	> 13,8 pour les 2 sexes
Aquitaine (1996-1999) (Combe and Boué, 2001)	61 femmes parturientes 79 femmes non parturientes (18 – 50 ans)	15
SU.VI.MAX (1994-2002) (Hercberg et al., 2004)	2119 hommes (45-60 ans) 2889 femmes (35-60 ans)	Hommes : 11,1 Femmes : 10,8
INCA (1998-1999) (Razanamahefa et al., 2005)	1985 adultes (> 15 ans) 1018 enfants (3-14 ans)	Hommes : 11,5 Femmes 12,7

Tableau 4 : Rapport oméga 6/oméga 3 dans plusieurs populations.

Source : Simopoulos, 2008

Population	Oméga 6/oméga 3
Paléolithique	0,79
Grèce (avant 1960)	1,00 – 2,00
Japon (actuel)	4,00
Inde rurale (actuelle)	5 – 6,1
Inde urbaine (actuelle)	38-50
Angleterre et Europe du nord (actuelles)	15,00
Etats Unis (actuels)	16,74

I.1.4. Mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés

Les différents mécanismes d'action identifiés pour les AGPI illustrent la grande diversité des fonctions régulées par ces nutriments. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les AGPI, actuellement présentés dans la littérature (Alessandri, 2004), font l'objet des paragraphes suivants.

I.1.4.1. Les AGPI : précurseurs de médiateurs bioactifs

Cette voie d'action des AGPI se déclenche avec la libération des AG depuis les phospholipides membranaire suite à l'action de la phospholipase A2. Une fois libérés de la membrane, les AGPI à 20 atomes de carbone (ARA, EPA et DGLA) engendrent par oxygénation des médiateurs bioactifs : les eicosanoïdes. Rappelons que les prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes des séries 1, 2 et 3 sont produit par la voie COX à partir respectivement, du DGLA de l'ARA et de l'EPA. La 5-LOX conduit aux leucotriènes de la série 4 à partir de l'ARA et à ceux de la série 5 à partir de l'EPA (*cf. I.1.2.3.*). Il existe donc une compétition entre les différentes séries vis-à-vis des enzymes COX et 5-LOX. Ainsi, les précurseurs des endoperoxydes des séries 1 et 3 entrent en compétition avec leur homologue de la série 2, et le précurseur des leucotriènes de la série 5 s'oppose à celui de la série 4. L'équilibre alimentaire entre les acides gras n-6 et n-3 détermine donc la balance métabolique, qui influe sur la synthèse de molécules bioactives dont les propriétés sont généralement opposées (Calder, 2002 ; Schmitz and Ecker, 2008). En effet, l'ARA génère des médiateurs proagrégants, vasoconstricteurs (endoperoxydes de la série 2) et pro-inflammatoires (leucotriènes de la série 4). A l'opposé, les eicosanoïdes dérivés de l'EPA ont des propriétés anti-agrégantes, vasodilatatrices (endoperoxydes de la série 3) et non inflammatoires (leucotriènes de la série 5). Notons également que les eicosanoïdes dérivés de l'ARA sont capables d'activer des facteurs de transcription tels que les récepteurs aux proliférateurs de peroxysomes (PPAR), comme cela sera détaillé dans un prochain paragraphe (*cf. I.1.4.4. et I.3.3.*). Enfin, le DHA est également le précurseur de docosanoïdes bioactifs (résolvines, docosatriènes, neuroprotectines et

neuroprostanes), particulièrement importants dans le cerveau où ils ont une action anti-inflammatoire et neuroprotectrice (Bazan, 2006 ; Laye, 2010).

I.1.4.2. Les AGPI : modulateurs des propriétés membranaires

✧ Les « radeaux lipidiques » (lipid rafts)

Depuis le modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicholson en 1972, le concept de domaine membranaire évolue. Les interactions entre protéines, dans le plan membranaire et de part et d'autre de la membrane, apparaissent de plus en plus clairement dépendre de la qualité de l'environnement lipidique. La théorie des « radeaux lipidiques », ou « lipid rafts », propose que des protéines trans-membranaires maintenues en paquet par une gangue de lipides à effet rigidifiant, les « rafts » (acide gras saturé, glycosphingolipides et cholestérol), ont des possibilités d'interactions différentes de celles de protéines individualisées contenues dans un micro-environnement peu ordonné et flexible (riche en AGPI) et autorisant une plus grande liberté de mouvement (Lee, 2001 ; Levental et al., 2010).

L'exemple du DHA, de part sa concentration élevée dans les membranes excitables du cerveau et de la rétine, illustre bien les propriétés physiques exercées par les AGPI au sein des membranes nerveuses, induisant la ségrégation des rafts (Alessandri and Guesnet, 2005 ; Stillwell et al., 2005). Ainsi au niveau des cellules photoréceptrices de la rétine, la réception du photon et sa transduction en signal électrique nécessitent des changements conformationnels de la rhodopsine. Ces changements sont directement modulés par la composition phospholipidique des membranes photoréceptrices, notamment par la concentration en DHA qui favorise la ségrégation des rafts.

✧ Les vésicules de neurotransmetteurs

Un autre processus membranaire, directement impliqué dans le fonctionnement du système nerveux, concerne la libération synaptique de neurotransmetteurs. Le rôle des

AGPI en tant que constituant des membranes vésiculaires a fait l'objet d'une attention toute particulière. Ainsi le modèle de rat carencé en AGPI n-3 a permis de mettre en évidence des perturbations du processus de stockage et de libération présynaptique de plusieurs neurotransmetteurs. En effet, des travaux ont montré une augmentation de la libération spontanée (en l'absence de stimulation nerveuse) de dopamine dans le noyau accumbens (Zimmer et al., 2000), d'acétylcholine (Aid et al., 2003) ou de sérotonine (Kodas et al., 2004) dans l'hippocampe. En revanche, la libération chimiquement induite de ces neurotransmetteurs est significativement réduite, comparée à celle mesurée chez des rats témoins. Il a alors été suggéré une « fuite » basale de neurotransmetteur dans l'espace synaptique qui réduirait le stock contenu dans les vésicules. Lors de la stimulation nerveuse, générée par exemple en situation d'apprentissage, la quantité de neurotransmetteur libérée serait alors réduite et conduirait ainsi à une moindre efficacité de l'influx nerveux. Ainsi, le déficit membranaire en AGPI n-3, en particulier en DHA, affecterait de manière générale le stockage des neurotransmetteurs et leur libération dans la fente synaptique ; mais ces résultats restent encore controversés. Néanmoins, ces processus pourraient contribuer à expliquer les perturbations comportementales observées chez les animaux carencés en AGPI n-3 (Moriguchi et al., 2000 ; Fedorova and Salem, 2006) (*cf. II.1.3.3.*).

I.1.4.3. Les AGPI : modulateurs de l'expression génique

En 1990, il est découvert que des médicaments utilisés chez l'Homme pour le traitement d'hyperlipidémies, provoquent la prolifération des peroxysomes chez les rongeurs *via* l'activation de facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, ainsi nommés les « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPAR (Issemann and Green, 1990). Un peu plus tard, il a été mis en évidence que les acides gras et leurs dérivés oxygénés étaient les activateurs naturels des PPAR, et régulaient ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes (Kliwer et al., 1997). En réalité, plusieurs autres facteurs de transcription activés par les acides gras et leurs dérivés ont été identifiés, parmi lesquels RXR (retinoid X receptor), SREBP-1 (stérol regulatory element-binding protein 1), HNF4 (Hepatic Nuclear Factor 4) et LXR (Liver X Receptor). Une

description détaillée de ces récepteurs et de leurs mécanismes d'action fera l'objet du chapitre I.3.

I.1.5. Impacts physiologiques des acides gras polyinsaturés

L'apport alimentaire en AGPI des familles oméga 6 et oméga 3 est le principal déterminant du niveau de biosynthèse et d'incorporation des AGPI dans les phospholipides des membranes cellulaires (Barcelo-Coblijn and Murphy, 2009). Du fait de la compétition de ces deux familles pour les enzymes de bioconversion (élongases, désaturases), un excès d'apport en LA au détriment de l'ALA, provoque l'augmentation de l'incorporation de l'ARA dans les phospholipides membranaires, au détriment des dérivés supérieurs oméga 3. Ce remplacement, s'effectue alors dans l'ensemble des membranes cellulaires des tissus : cellules circulantes, foie, tissu nerveux, etc. Pour cette raison, le rapport LA/ALA, est un déterminant important de l'équilibre nutritionnel en AGPI oméga 6 et oméga 3.

Un déséquilibre d'apport alimentaire en oméga 6 et oméga 3 peut avoir de nombreuses conséquences sur :

- *les phénomènes d'agrégation plaquettaire, inflammatoire et immunitaire* : les dérivés oxygénés de l'ARA favorisent les processus de thrombose, d'allergie et d'inflammation. De plus, ces dérivés sont synthétisés en plus grande quantité que ceux issus de la famille oméga 3 et possèdent une grande efficacité biologique à des faibles concentrations. L'ingestion d'un régime équilibré en AGPI oméga 3 a des effets bénéfiques (1) en réduisant par inhibition compétitive l'incorporation de l'ARA dans les membranes cellulaires ainsi que la synthèse de ses médiateurs bioactifs ; et (2) en produisant des dérivés oxygénés (issus de l'EPA ou du DHA), qui exercent des propriétés antagonistes à ceux issus de l'ARA, ou sont biologiquement moins actifs. Ainsi l'apport alimentaire en AGPI peut influencer sur l'incidence des maladies cardiovasculaires (athérosclérose, maladies coronaires et maladies cérébrovasculaires) et inflammatoires (Barcelo-Coblijn and Murphy, 2009). Dans la population inuit, où la consommation de graisses animales se fait exclusivement par

l'apport d'animaux marins, très riches en EPA et DHA, l'incidence de maladies cardiovasculaires et inflammatoires est très faible.

- *la régulation du métabolisme lipidique hépatique et de l'adipogenèse* : le métabolisme lipidique, mettant en jeu les voies de lipogenèse, de désaturation-élongation, de synthèse des triglycérides et de sécrétion des VLDL (very low density lipoprotein), et de β -oxydation et de cétoxydation des acides gras, est régulée par les AGPI au niveau du foie *via* la voie des récepteurs nucléaires (PPAR et SREBP-1c) (*figure 7*). Il a cependant été montré que les oméga 3 répriment plus efficacement que les oméga 6 les voies de synthèse des triglycérides et d'assemblage des VLDL, réduisant ainsi la sécrétion de ces lipoprotéines dans la circulation sanguine et le risque d'hypertriglycéridémie qu'elles représentent (Clarke, 2001). Ainsi chez l'Homme, la consommation d'oméga 3 à longue chaîne entraîne une baisse notable de la triglycéridémie, en particulier chez les sujets hypertriglycéridémiques (Bays et al., 2008). De plus, il a été mis en évidence que les oméga 6, en particulier l'ARA, sont de puissants activateurs de la différenciation adipocytaire, contrairement aux oméga 3 qui contrecarrent les effets proadipogéniques des oméga 6 (Ailhaud et al., 2006). Ainsi l'accroissement du rapport oméga 6/oméga 3 dans le lait maternel (lequel peut atteindre des valeurs supérieures à 20) est susceptible de moduler le développement du tissu adipeux pendant la période périnatale, physiologiquement critique, et donc de favoriser le risque d'obésité dès les premières années de la vie.

- *la physiologie nerveuse* : chez l'animal, la diminution de la teneur en DHA, s'accompagne d'une réduction des capacités d'apprentissage (Moriguchi et al., 2000 ; Hashimoto et al., 2002) et de discrimination visuelle (Neuringer et al., 1986). Chez le nouveau-né humain, il a été mis en évidence que la consommation de laits infantiles, pauvres en oméga 3, conduit rapidement à la diminution de la concentration en DHA dans les membranes érythrocytaires et cérébrales, et à un retard de maturation des fonctions visuelles, comparativement à des enfants allaités au sein consommant ainsi du DHA (Jensen and Heird, 2002 ; Innis, 2009 ; Guesnet and Alessandri, 2010).

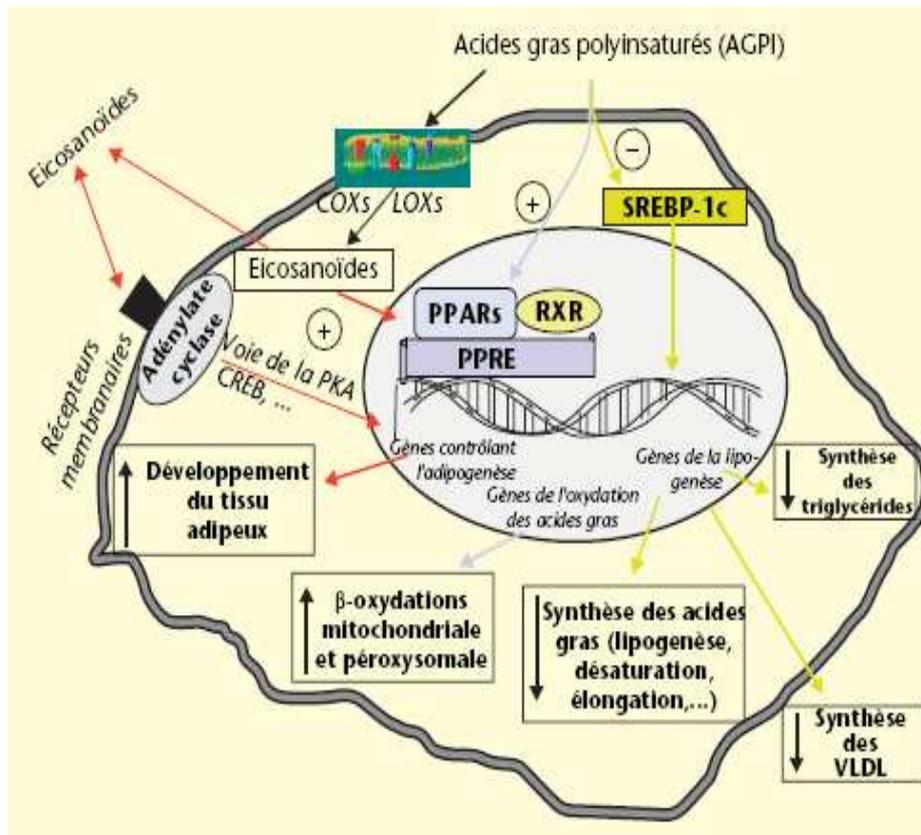


Figure 7 : Effets des acides gras polyinsaturés sur la transcription de gènes du métabolisme lipidique au niveau des cellules hépatiques et de l'adipocyte.

Source : Guesnet et al., 2005

COX : cyclo-oxygénases ; CREB : élément de liaison protéique répondant au cAMP (cAMP-responsive element binding protein) ; LOX : lipoxigénases ; PKA : protéine kinase a ; PPAR : récepteur aux proliférateurs de peroxyssomes ; PPRE : élément de réponse au PPAR ; RXR : récepteur aux rétinoïdes ; SREBP-1c : protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols ; VLDL : very low density lipoprotein.

Ainsi un grand nombre de travaux ont mis en évidence l'implication des AGPI dans de nombreuses fonctions physiologiques fondamentales, comme en témoigne le *tableau 5* (liste non exhaustive). Un ratio oméga 6/oméga 3 élevé, rencontré dans l'alimentation occidentale, favorise l'incidence de nombreuses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires (Leaf et al., 2003), les cancers (Maillard et al., 2002), l'inflammation (Laye, 2010), le diabète ou l'obésité (Storlien et al., 1998), l'ostéoporose (Salari et al., 2008), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Serini et al., 2009), la dépression (Liperoti et al., 2009), la maladie d'Alzheimer (MA) (Cunnane et al., 2009 ; Jicha and Markesbery, 2010), etc.

A la vue de ces données, un déséquilibre des apports en AGPI oméga 6 et oméga 3 n'est donc pas sans conséquences sur l'ensemble des systèmes physiologiques de notre organisme. En effet les AGPI oméga 6 et oméga 3 jouent des rôles souvent opposés, dans de nombreuses fonctions physiologiques comme constituants des membranes cellulaires, précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs et régulateurs de facteurs de transcription, et interfèrent ainsi sur l'étiologie d'un grand nombre de pathologies.

Dans la suite de cette introduction bibliographique, nous nous attacherons à présenter un autre nutriment, essentiel au maintien de nombreuses fonctions biologiques : la vitamine A et son métabolite actif l'acide rétinoïque.

Tableau 5 : Effets des acides gras polyinsaturés sur les systèmes physiologiques.

Adapté de Jump, 2004.

Systèmes	Effets
Système nerveux central	Fonctions cognitives Plasticité synaptique Neurogenèse Apoptose neuronale
Rétine	Activité des photorécepteurs
Système cardiovasculaire	Arythmie Athérosclérose
Foie	Lipogenèse <i>de novo</i> Synthèse et sécrétion de VLDL Oxydation des acides gras Métabolisme du cholestérol
Système immunitaire	Activation des cellules T Inflammation
Muscle squelettique	Sensibilité à l'insuline
Plusieurs types cellulaires	Production d'eicosanoïdes Production de cytokines Croissance cellulaire et différenciation

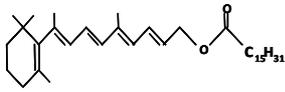
I.2. L'acide rétinoïque : dérivé actif de la vitamine A

I.2.1. Présentation des rétinoïdes

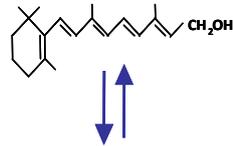
La vitamine A ou rétinol (en référence à son action au niveau de la rétine) compte de nombreux dérivés métaboliques, composés naturels ou synthétiques, rassemblés sous le terme de « rétinoïdes », parmi lesquels certains sont illustrés sur la *figure 8*. Dans la cellule cible, à partir du rétinol, un métabolisme oxydatif conduit à la production de rétinol, qui peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque (AR). La fonction alcool (-OH) du rétinol peut également être estérifiée par un acide gras, le plus souvent l'acide palmitique, pour former des esters de rétinol, ou rétinyl esters. Ceux-ci constituent la forme de stockage de la vitamine A dans l'organisme. Ainsi les principaux métabolites actifs de la vitamine A sont le 11-*cis*-rétinal, molécule essentielle pour la vision, et l'AR (acide 9-*cis* rétinoïque et acide tout-*trans* rétinoïque), puissant régulateur de l'expression génique. Outre leurs rôles dans la physiologie de la cellule normale, les rétinoïdes possèdent des propriétés thérapeutiques. A titre d'exemple, l'acide 13-*cis* rétinoïque, composé synthétique, est utilisé en dermatologie dans le traitement de l'acné, sous le nom d'Accutane (Bershad, 2001).

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

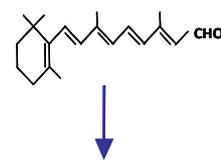
Rétinyl esters



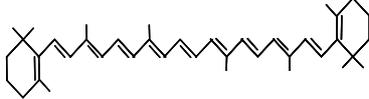
Rétinol



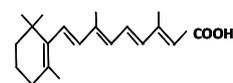
Rétinal



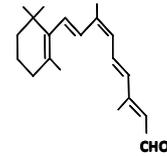
β -carotène



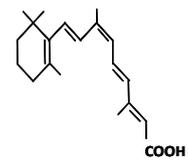
Acide tout-*trans*



9-*cis* rétinol



Acide 9-*cis* rétinolique



Acide 13-*cis* rétinolique

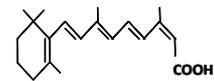


Figure 8 : Formules chimiques de quelques rétinoïdes.

Tableau 6 : Principales sources de vitamine A dans l'alimentation française.

Source : Martin, 2001

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

ER : équivalent rétinol : 6 μg de β -carotène ont la même activité vitaminique que 1 μg de rétinol, soit 1 ER.

I.2.2. Données de consommation en vitamine A

I.2.2.1. Sources alimentaires

La vitamine A est apportée à l'organisme sous forme d'esters de rétinol par des produits d'origine animale : l'huile de foie de poissons, la viande, le lait entier, le beurre, les œufs, les fromages, etc. Les végétaux contiennent essentiellement des provitamines A, appelées caroténoïdes, qui sont des précurseurs que l'organisme est capable de transformer en rétinol au niveau de l'intestin. Certains fruits et légumes, en contiennent de grandes quantités : les abricots, les mangues, les carottes, les légumes verts foncés, etc. Parmi les principaux caroténoïdes, il semblerait que le β -carotène soit le plus efficace des précurseurs, pourvu d'activités biologiques étendues. Les principales sources de vitamine A de l'alimentation française sont présentées dans le *tableau 6*.

I.2.2.2. Apports nutritionnels conseillés

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

Les apports recommandés en vitamine A sont exprimés en équivalent rétinol (ER) (1ER = 1 μ g de rétinol = 6 μ g de β -carotène). Les ANC pour la population française (Martin, 2001) varient en fonction de l'âge et de l'état physiologique (grossesse,

allaitement) (*tableau 7*) de 350 ER à 950 ER par jour. De plus, il est d'usage de conseiller qu'environ 60 % de l'apport en vitamine A provienne des caroténoïdes.

Les états de carence franche en vitamine A se rencontrent dans les pays en développement, se traduisant notamment par des atteintes de la sphère oculaire et une cécité irréversible, mais restent rares dans les pays industrialisés. Ces derniers sont plutôt le siège d'états précarentiels ou subcarentiels, qui sont souvent sans expression clinique révélatrice, ce qui les rend difficiles à diagnostiquer. En France, les populations à risques concernent pour la majeure partie les personnes âgées de plus de 65 ans. A l'opposé, l'hypervitaminose A peut également avoir de graves conséquences : augmentation de la pression intracrânienne, nausées, troubles hépatiques, malformation fœtale, etc. Ainsi, une limite de sécurité a été fixée à 1000 ER par jour.

I.2.3. Métabolisme général de la vitamine A

La conversion des caroténoïdes pro-vitaminiques A en rétinol a lieu essentiellement dans la muqueuse intestinale. Le rétinol nouvellement formé est ensuite estérifié en rétinyl esters et transporté, *via* les chylomicrons, vers le foie qui assure la mise en réserve de ces rétinyl esters. En fonction des besoins de l'organisme, le rétinyl ester sera alors hydrolysé en rétinol libre qui sera sécrété dans le plasma, véhiculé par un complexe protéique, composé de la retinol binding protein (RBP) et de la préalbumine ou transthyrétine (TTR), jusqu'au tissu cible. Signalons que le rétinol constitue le rétinoïde le plus abondant dans le sang (95 % du rétinol sont liés aux protéines vectrices permettant leur transport). Le flux de rétinol libéré par le foie est très finement régulé de manière à maintenir une concentration constante de rétinol dans le plasma (2 $\mu\text{mol/L}$). Au delà des besoins immédiats, la vitamine A alimentaire sert à constituer des réserves hépatiques qui seront ensuite utilisées au cours des périodes d'apports insuffisants (Theodosiou et al., 2010).

Tableau 7 : Apports nutritionnels en vitamine A recommandés pour la population française.

Source : Martin, 2001

Catégorie	Vitamine A (ER par jour)
Nourrisson	350
Enfants de 1 à 3 ans	400
Enfants de 4 à 6 ans	450
Enfants de 7 à 9 ans	500
Enfants de 10 à 12 ans	550
Adolescents de 13 à 15 ans	700
Adolescentes de 13 à 15 ans	600
Adolescents de 16 à 19 ans et hommes adultes	800
Adolescents de 16 à 19 ans et hommes adultes	800
Adolescentes de 16 à 19 ans et femmes adultes	600
Femmes enceintes (3ième trimestre)	700
Femme allaitantes	950
Personnes âgées de plus de 75 ans	700 (hommes) 600 (femmes)

ER : équivalent rétinol : 6 µg de β-carotène ont la même activité vitaminique que 1 µg de rétinol, soit 1 ER.

Au niveau de la cellule cible, il semble que la RBP soit reconnue par un récepteur trans-membranaire nommé STRA6, qui prendrait en charge le rétinol en le faisant entrer dans la cellule (Kawaguchi et al., 2007). A l'intérieur, le rétinol peut alors subir un métabolisme non oxydatif, produisant des rétinyl esters, rétinyl-phosphate, 3-déhydrorétinol, ainsi qu'un métabolisme oxydatif donnant du rétinol (aussi appelé rétinolaldéhyde) puis de l'acide rétinoïque (AR), métabolite actif de la vitamine A. L'oxydation du rétinol en AR est un processus enzymatique, qui se déroule en deux étapes, et dont le rétinol est le métabolite intermédiaire. La première oxydation est réversible, tandis que la deuxième est irréversible. La formation du composé intermédiaire, le rétinol, peut être catalysée par des enzymes cytosoliques ou microsomales appelées rétinol déshydrogénases (RDH) (Gottesman et al., 2001 ; Pares et al., 2008). Ces RDH peuvent ainsi appartenir à la famille des alcool déshydrogénases (ADH), enzymes cytosoliques, ou à la famille des déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR), enzymes microsomales (Pares et al., 2008). Le rétinol peut ensuite être converti de manière irréversible en AR par des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) cytosoliques (Duester, 2008). Par ailleurs, il a également été montré, *in vitro*, qu'une variété de cytochromes P450 (CYP) étaient impliqués dans l'oxydation microsomale du rétinol en AR (Collins and Mao, 1999). Enfin signalons, que le CYP26 permet la dégradation et l'élimination de l'AR tout-*trans* spécifiquement, et contribue ainsi au contrôle du signal rétinoïde (Petkovich, 2001). La *figure 9* décrit les processus du métabolisme cellulaire de l'AR détaillés dans ce paragraphe.

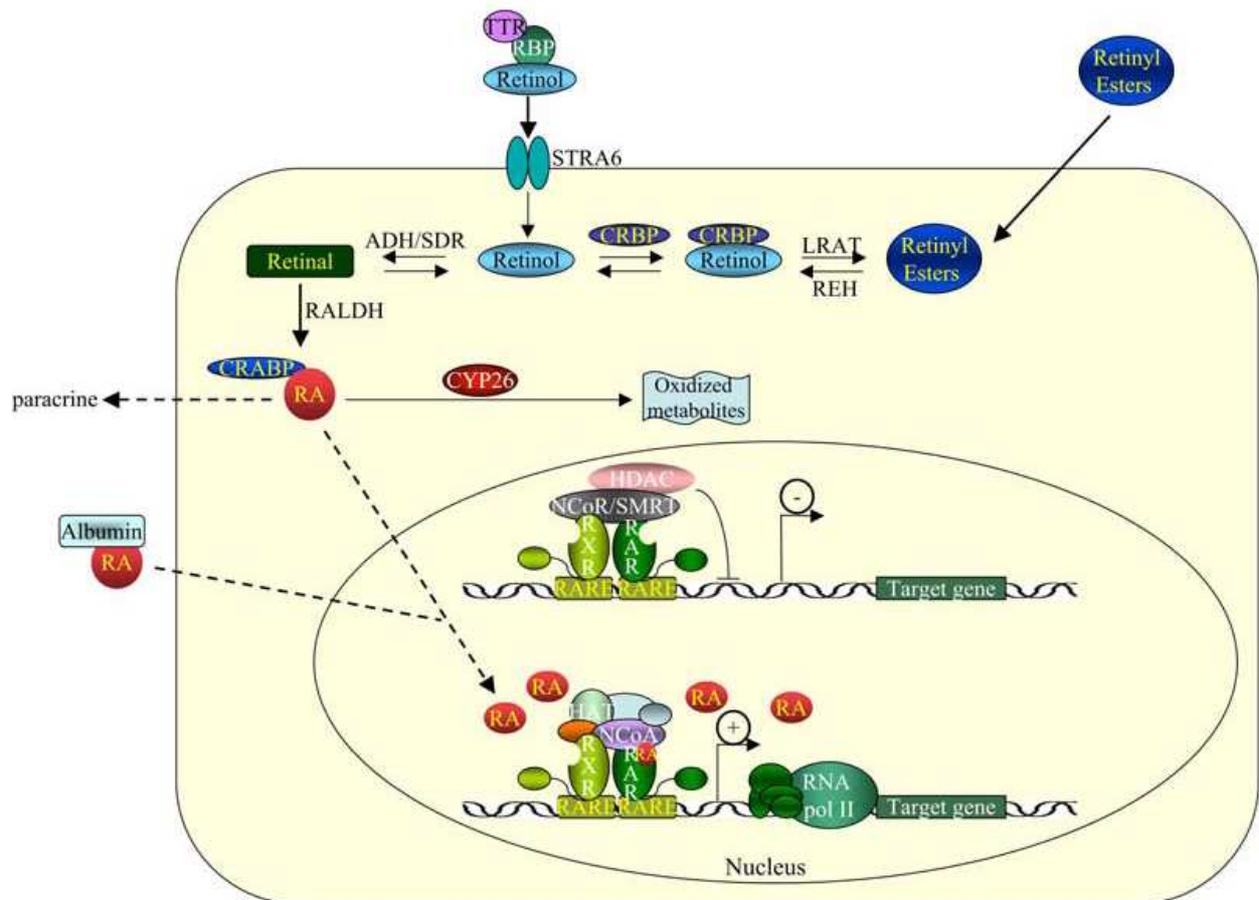


Figure 9 : Métabolisme cellulaire de l'acide rétinoïque.

Source : Theodosiou et al., 2010

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

1.2.4. Mécanisme d'action de la vitamine A

La vitamine A, et plus particulièrement son métabolite actif l'acide rétinoïque, joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression du génome. Tout comme les acides gras polyinsaturés, le mode d'action nucléaire de la vitamine A s'apparente à une action hormonale. L'acide rétinoïque va agir directement dans le noyau en se liant à des facteurs de transcription, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ainsi l'acide tout-*trans* rétinoïque et son isomère 9-*cis* sont des ligands spécifiques des récepteurs nucléaires RARs (Retinoic Acid Receptors) tandis que l'acide 9-*cis* rétinoïque uniquement, lie les RXRs (Retinoid X Receptors). Signalons cependant, que la présence de l'acide 9-*cis* rétinoïque dans les tissus n'a pas pu être détectée *in vivo* (Wolf, 2006). Finalement, l'activation des récepteurs nucléaires par l'AR permet leur fixation sur des zones déterminées de l'ADN, ce qui va inhiber ou stimuler l'expression de gènes cibles situés en aval de ces zones. Une description détaillée de la régulation génique par l'AR, des mécanismes et acteurs mis en jeu, fera l'objet du chapitre I.3.

1.2.5. Rôles génériques de la vitamine A et de l'acide rétinoïque

Au cours de ces dernières années, les connaissances sur les fonctions cellulaires de la vitamine A et de l'AR se sont fortement accrues. Les incidences physiologiques marquées d'une carence en vitamine A ou à l'inverse d'une intoxication par excès d'apports révèlent l'étendue de l'action des rétinoïdes. Le *tableau 8* indique les principaux signes cliniques observés en cas de déséquilibre d'apport en vitamine A.

Les fonctions très variées des rétinoïdes sont assurées par trois métabolites actifs essentiels : le 11-*cis* rétinol, l'acide tout-*trans* rétinoïque et l'acide 9-*cis* rétinoïque. Le 11-*cis* rétinol est l'hème de la rhodopsine, pigment visuel photosensible des cellules en bâtonnet de la rétine, et assure donc un rôle essentiel dans la vision. L'acide tout-*trans* rétinoïque et l'acide 9-*cis* rétinoïque ont une action génomique. Plus de 500 gènes ont été proposés comme répondant à l'acide rétinoïque ; ce qui explique les effets pléiotropiques de cette molécule.

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

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

I.3. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque et des acides gras polyinsaturés

Parmi les mécanismes d'action des AGPI n-3 au sein du SNC précédemment évoqués (paragraphe I.1.4.), nous avons porté notre intérêt sur leur rôle de modulateurs de la transcription de gènes *via* l'activation de facteurs de transcription, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le mode d'action génomique des acides gras a fait l'objet d'un grand nombre de recherches depuis plusieurs années (Khan and Vanden Heuvel, 2003 ; Jump, 2004 ; Pegorier et al., 2004).

De manière similaire, l'acide rétinoïque joue un rôle important dans la régulation génique *via* l'activation de facteurs de transcription appartenant à la même superfamille.

Cette partie du manuscrit sera donc consacrée à la présentation de données relatives à la description des récepteurs nucléaires activés par les AG et l'AR.

I.3.1. La superfamille des récepteurs nucléaires

I.3.1.1. Généralités

Les récepteurs nucléaires sont des protéines transrégulatrices capables de se fixer principalement sous forme de dimères, au niveau de sites spécifiques de l'ADN, appelés éléments de réponse et situés en amont du gène cible (occasionnellement dans les introns) (Evans, 2005). Il existe une forte homologie de structure entre les membres de la famille des récepteurs nucléaires, qui comprend les récepteurs de différents ligands hydrophobes tels que les hormones stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les dérivés hydroxylés de la vitamine D, l'acide rétinoïque ou encore les acides gras et eicosanoïdes (Huang et al., 2010). Cependant certains récepteurs n'ont pas encore à ce jour de ligands connus, ce sont les récepteurs orphelins. La *figure 10* présente les principaux membres de la superfamille.

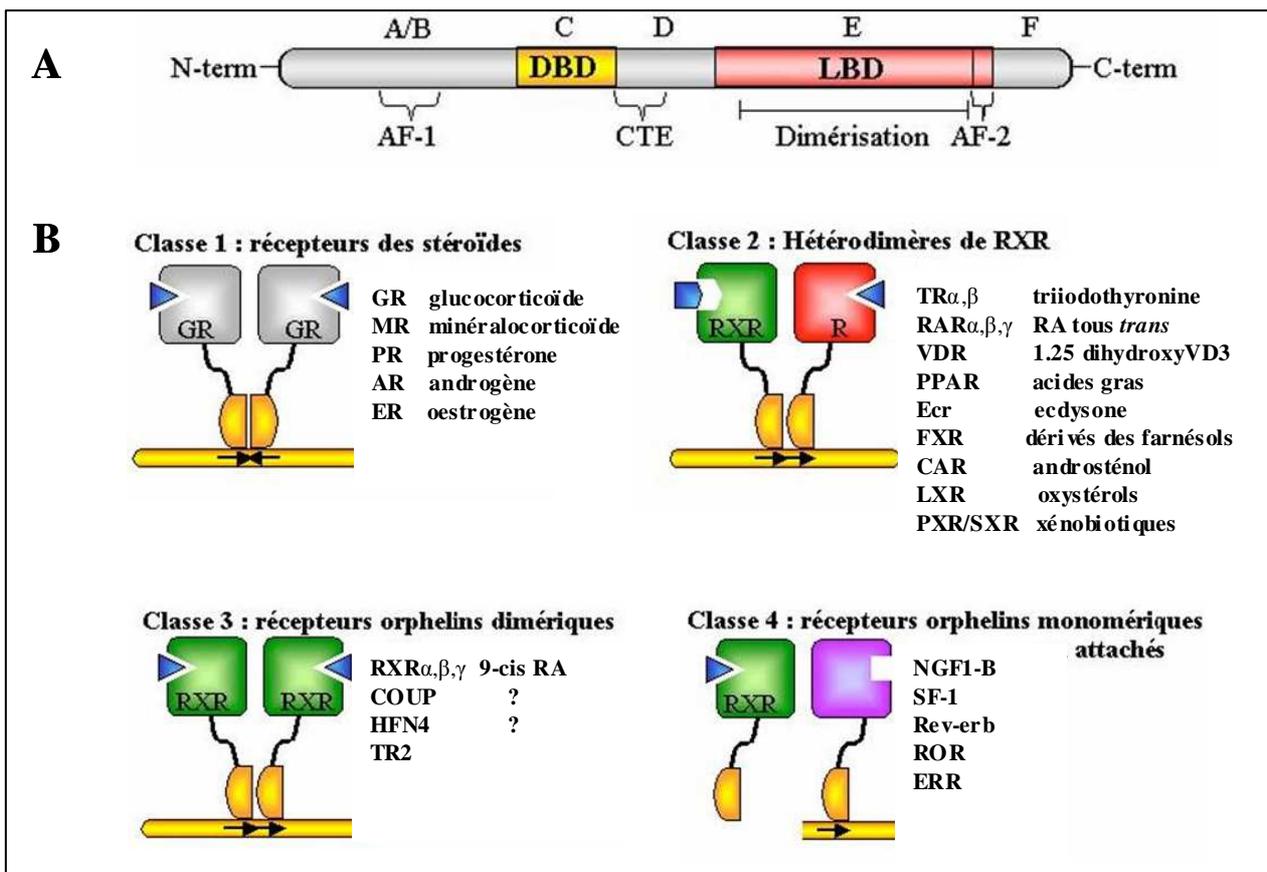


Figure 10 : Structure et organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Source : Olefsky, 2001

A : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels. AF : région portant la fonction de l'activation dépendante ou non de la présence du ligand ; CTE : constitutive transport element. DBD : domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) ; LBD : domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain).

B : Classification des récepteurs nucléaires. AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur de l'œstrogène ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans* ; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ; TR : récepteur de la triiodothyronine ; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération peroxysomale ; EcR : récepteur de l'ecdysone ; FXR : récepteur des acides biliaires ; CAR : récepteur de l'androstane ; LXR : récepteur de l'oxystérol ; PXR/SXR : récepteur de xénobiotiques ; VDR : récepteur de la vitamine D₃ ; divers récepteurs orphelins dont ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène ; HNF4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte ; TR2 : récepteur testiculaire.

I.3.1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie dans leur structure protéique, avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (*figures 10 et 11*) (Chambon, 2005 ; Germain et al., 2006c) :

- le domaine A/B: impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand (AF-1), est faiblement conservé et correspond à l'extrémité N-terminale (-NH₂) de la protéine codée (Nagpal et al., 1992);
- le domaine C: domaine de liaison à l'ADN (aussi appelé DBD pour DNA binding domain), montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Deux motifs en doigt de zinc jouent un rôle complémentaire dans la liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles. Ce domaine participe également à la dimérisation des récepteurs (Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001 ; Rastinejad, 2001) ;
- le domaine D: est une région charnière entre les domaines C et E et permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles. Il pourrait être impliqué dans la localisation nucléaire des récepteurs (Germain et al., 2006c) ;
- le domaine E: domaine de liaison au ligand (aussi appelé LBD pour ligand binding domain), possède une structure complexe et longue en acides aminés. Il est le site où les ligands se fixent et où les complexes de coactivateurs interagissent (Greschik et al., 2002). Dans certains cas, le LBD peut aussi constituer une surface de dimérisation (Moras and Gronemeyer, 1998 ; Bourguet et al., 2000). Enfin dans la plus part des LBD, se trouve la fonction AF-2 qui joue un rôle dans la régulation de la transcription dépendante du ligand ;
- le domaine F: certains membres de la superfamille (RARs, ERs, TRs) possèdent ce domaine C-terminal dont la taille est variable et la fonction reste encore inconnue (O'Malley, 1990).

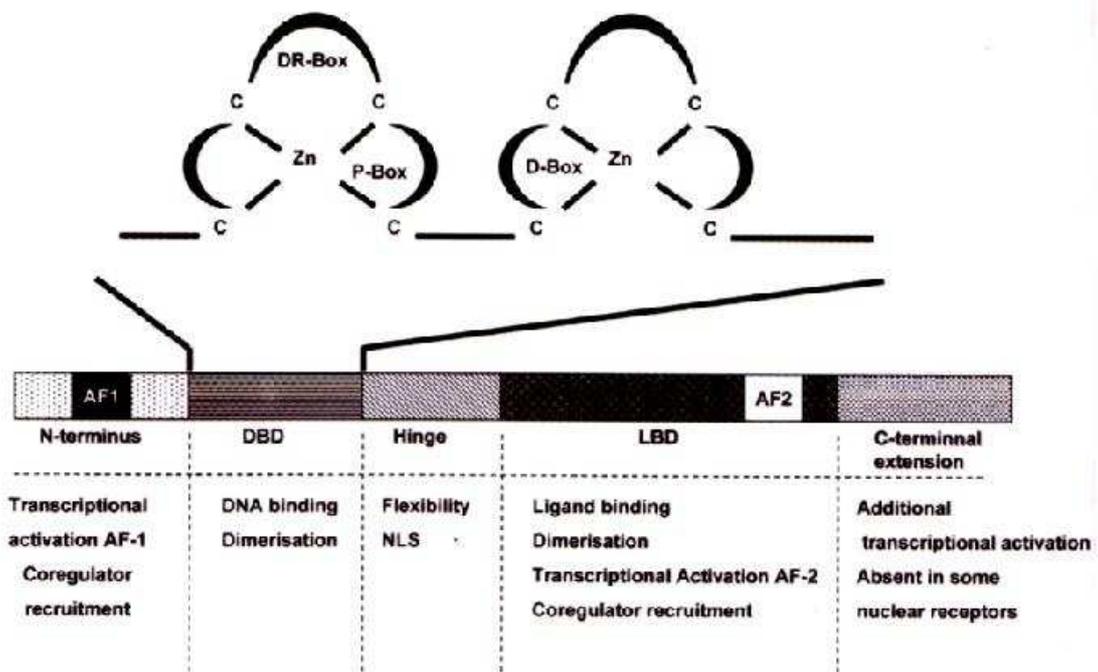


Figure 11 : Architecture des récepteurs nucléaires.

Source : Novac and Heinzl, 2004

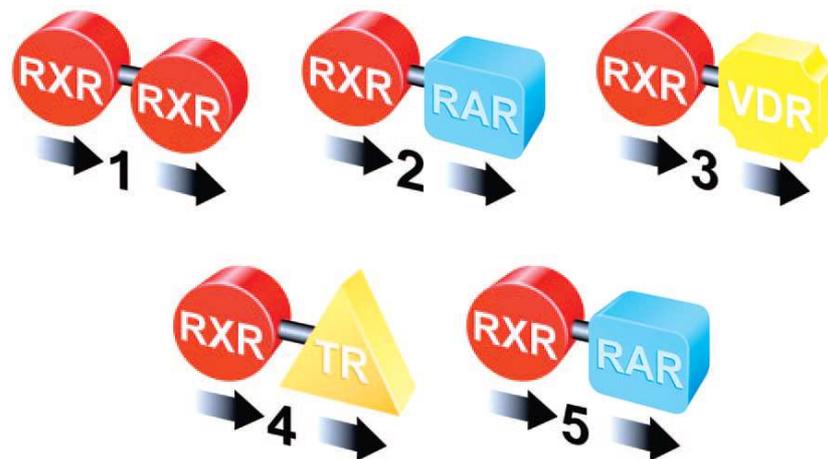


Figure 12 : Exemples de dimères se fixant à des éléments de réponse formés par des séquences consensus directement répétées, séparées par 1 à 5 nucléotides.

Source : Evans, 2005.

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-trans ; RXR : récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque ; TR : récepteur de la triiodothyronine ; VDR : récepteur de la vitamine D₃.

I.3.1.3. Mode d'action : éléments de réponse et cofacteurs

Les récepteurs nucléaires liés à leur ligand fonctionnent de manière similaire (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Ce sont des protéines capables de se fixer, généralement sous forme de dimères (homo- ou hétérodimères), au niveau de séquences spécifiques de l'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones (HRE, Hormone Response Element) situées en amont du gène cible. Il existe différents HRE selon le récepteur responsable de l'activation de la transcription (par exemple, PPRE pour Peroxisome Proliferator Response Element et RARE pour Retinoic Acid Response Element). Néanmoins leur structure est généralement basée sur un même principe : deux demi-sites, pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétée (DR), mais parfois plus complexe, séparés de 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus. Notons que plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription différemment régulée (Evans, 2005) (*figure 12*).

Il est important de signaler que les récepteurs nucléaires agissent au cœur d'un système de régulation très complexe, et que la fixation du ligand n'est pas suffisante pour activer la transcription du gène cible (Germain et al., 2006c). En effet, dans la plupart des cas, une fois le ligand fixé au récepteur nucléaire, la nouvelle conformation spécifique de ce dernier (due à un changement de conformation du LBD) va permettre le recrutement de co-activateurs. Notons que de nouveaux coactivateurs sont constamment découverts (il en existe aujourd'hui plus de 100) ; une liste non exhaustive peut être trouvée dans de nombreuses revues, telle que celle de Cosma (2002). Les coactivateurs vont ensuite permettre l'activation de la transcription en favorisant le recrutement et/ou l'activation de la machinerie transcriptionnelle.

Par contre, lorsque le ligand n'est pas fixé au récepteur nucléaire, ou bien dans certains cas, quand le récepteur est lié à un antagoniste, une interaction avec des co-répresseurs a été mise en évidence, induisant la répression de la transcription (Germain et al., 2006c).

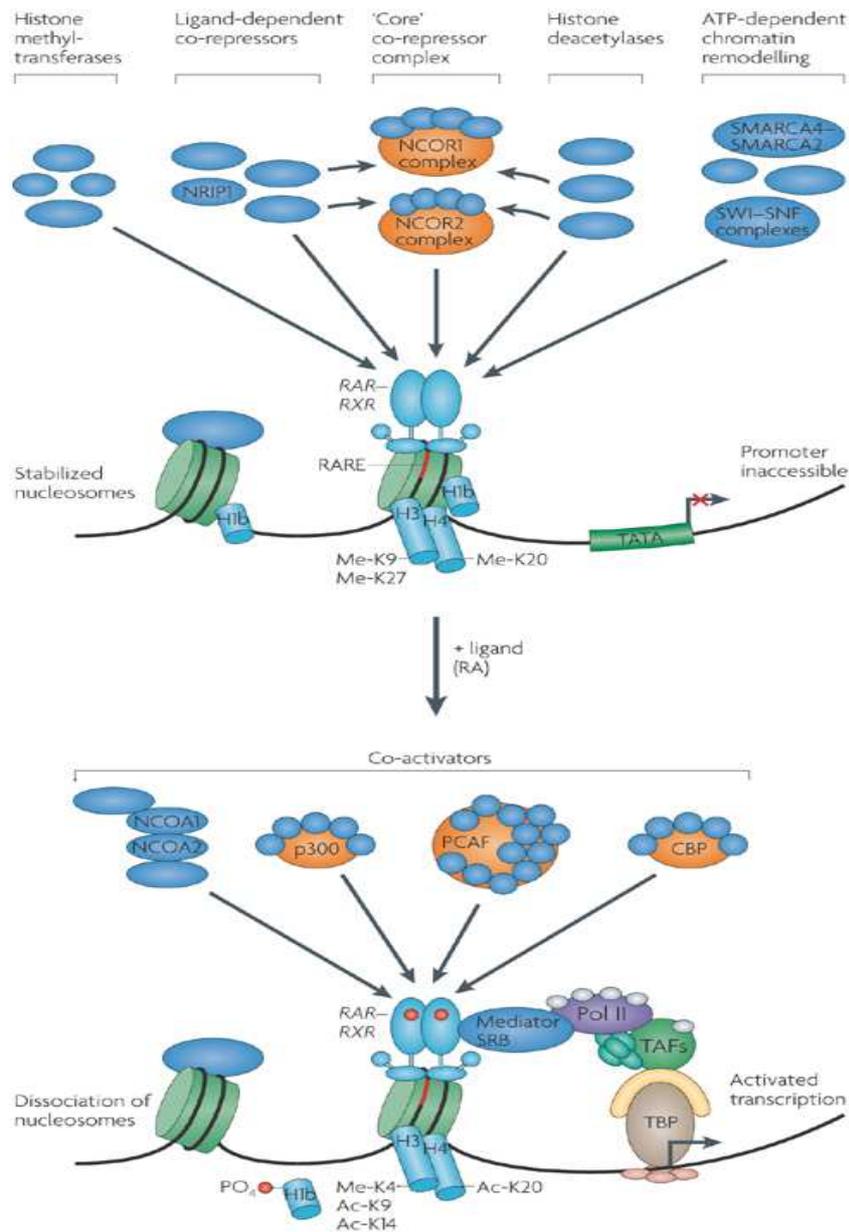


Figure 13 : Interaction des récepteurs nucléaires avec les cofacteurs : exemple des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes.

Source : Niederreither and Dollé, 2008

En l'absence de ligand, l'hétérodimère RAR (retinoic acid receptor) – RXR (retinoid X receptor) se lie à l'élément de réponse RARE (RA response element) et recrute des co-répresseurs. Ces co-répresseurs répriment la transcription en recrutant des complexes histones déacétylases et méthyl-transférases qui rendent l'ADN inaccessible pour la transcription.

La liaison de l'AR au RAR conduit des changements conformationnels du LBD (ligand-binding domain) qui entraînent la libération des co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs (tels que p300 et CBP). Les co-activateurs interagissent avec la machinerie transcriptionnelle et induisent un remodelage de la chromatine, ce qui active la transcription.

Ainsi, par l'ensemble de ces mécanismes, représentés dans la *figure 13*, les récepteurs nucléaires modulent en tant que facteurs de transcription l'expression d'un grand nombre de gènes cibles (Evans, 2005).

I.3.2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque

I.3.2.1. Les différents types de récepteurs

Il existe deux types de récepteurs de l'AR (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Le premier type comprend les récepteurs RAR (Retinoic Acid Receptor) qui peuvent lier l'acide tout-*trans* rétinoïque et l'acide 9-*cis* rétinoïque. Le deuxième type comprend les RXR (Retinoid X Receptor) découverts par Mangelsdorf et al. (1990), dont l'affinité est élevée pour l'acide 9-*cis* rétinoïque, mais plus faible pour l'acide tout-*trans* rétinoïque (Levin et al., 1992 ; Chambon, 1996). La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50 kDa, et comme la plupart des récepteurs aux hormones, ils possèdent une structure composée des 6 régions. Pour chacun de ces deux récepteurs, trois types de protéines ont été isolées, codées par trois gènes distincts : RAR α , β , γ et RXR α , β , γ (Chambon, 1996). Les séquences d'acides aminés de ces trois formes sont très similaires dans les domaines B, C, D et E mais diffèrent dans les domaines A et F. Seul le domaine C de liaison à l'ADN est très conservé entre les différentes classes de RAR et RXR. Les récepteurs de l'AR agissent comme des facteurs de transcription, s'associant sous forme d'homodimères de RXR, ou d'hétérodimères RAR-RXR. Ils se lient à des séquences génomiques, respectivement RXRE et RARE, localisées dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. RARE est un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la séquence hexanucléotidique (AGGTCA) séparées par 5 nucléotides (DR5) ou parfois seulement 1 ou 2 (DR1 et DR2), tandis que RXRE est typiquement un élément de réponse de type DR1 (*figure 12*).

Notons que le RXR joue un rôle central dans la régulation génique puisqu'il est considéré comme le partenaire commun de dimérisation d'autres membres de la superfamille, dont les PPARs (Germain et al., 2006b). Ainsi l'hétérodimérisation du RXR

avec les différents membres de la superfamille implique une interaction, voire une compétition, entre les différentes voies nucléaires de signalisation.

I.3.2.2. Régulation des récepteurs

La concentration cellulaire en AR détermine le niveau d'expression des gènes codant pour ses propres récepteurs : on parle dans ce cas d'autorégulation. C'est le cas des trois isotypes du RXRs (Wan et al., 1994 ; Duprez et al., 1996). Pour ce qui est des RARs, plusieurs études réalisées chez des animaux carencés en vitamine A ont montré une diminution de l'expression de RAR β , leur réinduction après l'administration d'AR et aucune modification des autres isotypes RAR α et RAR γ (Kato et al., 1992). Il semble en effet que ces deux isotypes soient peu sensibles à l'administration d'acide tout-*trans* rétinoïque et ne s'expriment qu'en présence d'une forte concentration de cet acide (Leroy et al., 1991 ; Mangelsdorf, 1994). Ainsi, l'expression du récepteur RAR β est autorégulée, un RARE ayant été découvert dans sa séquence promotrice (de The et al., 1990).

I.3.2.3. Distribution tissulaire

La distribution des différentes isoformes des récepteurs nucléaires de l'AR dans les différents tissus cibles est spécifique (Germain et al., 2006a ; Germain et al., 2006b). Ainsi les transcrits du RAR α sont distribués dans l'ensemble des tissus, ceux de la forme β sont plutôt restreints au cerveau, foie, reins et poumons, tandis que ceux de la forme γ sont spécifiques de la peau et des poumons (Dolle et al., 1990). Concernant les RXRs, l'expression du RXR α est forte dans le foie mais non négligeable dans les reins, les poumons, la rate et les muscles. Par contre RXR β a une distribution ubiquitaire, même s'il est plus faiblement exprimé dans le foie, l'intestin et les testicules. Enfin, RXR γ a une expression plus restreinte aux muscles et au cerveau (Szanto et al., 2004 ; Germain et al., 2006b).

Différents travaux ont permis de préciser la répartition des récepteurs nucléaires des rétinoïdes (RAR, RXR) dans le cerveau adulte (Lane and Bailey, 2005). Les techniques

d'immunorévélation révèlent un taux élevé de ces récepteurs chez le rat et la souris notamment dans le striatum, où les isotypes RAR β et RXR γ sont les plus abondants (Krezel et al., 1999 ; Zetterstrom et al., 1999 ; Moreno et al., 2004). En plus, Yamagata et al. en 1993 ont montré que l'isotype RAR β est le plus exprimé dans le cerveau mature de rat, principalement dans le cortex cérébral, le cervelet et le striatum et est présente à des taux très bas dans l'hippocampe. Par la suite, les transcrits de l'isotype RAR β ont été détectés dans l'hippocampe (Enderlin et al., 1997b ; Chiang et al., 1998 ; Etchamendy et al., 2001). De plus, dans cette structure, le récepteurs RAR α , a été majoritairement identifié (Krezel et al., 1999 ; Zetterstrom et al., 1999).

Les transcrits de RAR α , RAR γ , RXR α et RXR β sont ubiquitaires, alors que ceux des RAR β et RXR γ sont présents en particulier, comme leur protéines, dans le striatum. Il est à noter que certaines localisations de ces protéines ne sont pas toujours corrélées avec la distribution des transcrits correspondants (Krezel et al., 1999).

I.3.2.4. Gènes cibles de l'acide rétinoïque dans le cerveau mature

Les études sur l'identification des gènes du SNC régulés par les rétinoïdes sont généralement menées sur des modèles de cellules pluripotentes qui, sous l'influence de l'AR se différencient en un phénotype neuronal. Pour certains gènes cibles directs, l'existence d'un RARE dans leur séquence promotrice a clairement été établi, pour d'autres cela reste à être confirmé (par exemple pour la choline acétyl-transférase (ChAT)). Parmi les gènes potentiellement cibles de l'AR (*tableau 9*), une attention particulière a été portée dans ce travail de thèse sur les gènes codant pour RC3 et GAP-43 (protéines impliquées dans la plasticité synaptique) ainsi que pour NGF (facteur neurotrophique), TrkA et le TrkB (récepteurs de facteurs neurotrophiques). L'expression de ces gènes est surexprimée en réponse à l'administration d'AR.

Tableau 9 : Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque.

Source : Lane et Bailey, 2005

Retinoid-regulated neuronal genes ^a			
Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay
Transporters			
Norepinephrine transporter	↑	PC12, SCG	mRNA, function
Vesicular ACh transporter	↑	PC12, SN56, NG108	mRNA
Vesicular GABA transporter	↑	P19	mRNA
Metabolic enzymes			
Choline acetyltransferase ^P	↑	PC12, SN56	mRNA, protein, activity
		NG108-15, SCG	
Tyrosine hydroxylase	↓	SCG	mRNA, activity
Dopamine β-hydroxylase	↓	SCG	Activity
Glutamic acid decarboxylase	↑	P19, NE-7C2	mRNA
ACh esterase	↑	P19	mRNA
G-protein coupled receptors			
Mu opioid receptor	↓/↑	SH-SY5Y	mRNA
Delta opioid receptor	↑	NG108-15	mRNA
Kappa opioid receptor	↓	P19	mRNA
5-HT _{1A} receptor	↑	SN-48	mRNA
Dopamine D2 receptor ^V	↑	Striatum	mRNA, protein
Dopamine D2, D1, D5 receptors	↑	NT2	mRNA, function
Ionotropic receptors			
Nicotinic AChR α3,α4,β2	↑	P19	mRNA, protein
NMDA receptor (NR1)	↑	NG108-15	mRNA
Kainate receptor (GluR6)	↑	P19	mRNA
GABA _A receptor γ2	↑	P19	mRNA, function
Ion transport proteins			
K ⁺ channel (Kir 2.1)	↑	SH-SY5Y, SK-N-BE	mRNA, function
Na ⁺ /H ⁺ exchanger	↑	P19	mRNA, activity
L-type Ca ²⁺ channel	↑	NG108-15, NT2	mRNA, function
N-type Ca ²⁺ channel	↑	NT2	mRNA, function
Cytoskeletal proteins			
Neurofilament (-L,-M,-H) proteins	↑	P19	mRNA, protein
Dystrophin-associated proteins	↑	P19	mRNA
Tenascin	↑	SH-SY5Y	Protein
Integrin α/β	↑	SH-SY5Y	Protein
Intracellular signalling molecules			
Phospholipase A2, C, D	↑	LA-N-1	Activity
Arachidonic acid	↑	SK-N-BE	Activity
Neuronal nitric oxide synthase	↑	SN56	mRNA, protein, activity
Tissue transglutaminase	↑	SCG, SK-N-BE, SH-SY5Y	Activity, mRNA
Neuromodulin (GAP 43)	↑	Striatum	
Neurogranin (RC3) ^V	↑	SK-N-BE, striatum	mRNA

Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay
Neuron-specific enolase ^P	↑	N-115, PC12	mRNA
Calbindin-D 28K	↑	PC12, D283	mRNA, protein
Synapsins I, II, III	↑	NT2	mRNA
Miscellaneous			
Gonadotropin-releasing hormone ^V	↓/↑	GT1-1, hypothalamus	mRNA
Oxytocin ^V	↑	Neuro2A	mRNA
Trk A/Trk B	↑	NB, P19	mRNA
Nerve growth factor	↑	PC12	mRNA
Neural cell adhesion molecule	↑	P19, LA-N-5	Protein
Presenilin 1	↑	SH-SY5Y	mRNA
Presenilin 2	↑	P19	mRNA
Apolipoprotein E	↓	NT2	mRNA
Amyloid protein precursor (APP) ^P	↑	P19, SH-SY5Y, PC12, hippocampus	mRNA, protein
Microtubule-associated protein tau (MAPT) ^P	↑	P19	mRNA

I.3.3. Les récepteurs des acides gras polyinsaturés

I.3.3.1. Les différents types de récepteurs

L'action des AGPI sur la régulation de l'expression génique met en jeu différents facteurs de transcription : PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), RXR, LXR (Liver X Receptor), HNF4 (Hepatic Nuclear Factor-4) et SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c). Cependant, ce travail de thèse s'est particulièrement centré sur les récepteurs nucléaires PPARs et RXRs ; une brève description des autres récepteurs sera tout de même réalisée dans ce paragraphe.

✧ Les PPAR :

Il existe trois isotypes de PPAR dénommés α , δ (encore appelé β ou NUC1) et γ , décrits chez les vertébrés, qui présentent une organisation en domaines (A/B, C, D et E/F) commune à tous les récepteurs nucléaires (*figures 10 et 14*).

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

Les différents isotypes de PPAR sont capables d'interagir spécifiquement avec de nombreux ligands, parmi lesquels se trouvent des composants naturels majeurs, tels que les acides gras. Les ligands sont classés en deux groupes : les ligands naturels et les ligands synthétiques (Desvergne and Wahli, 1999 ; Lee et al., 2003).

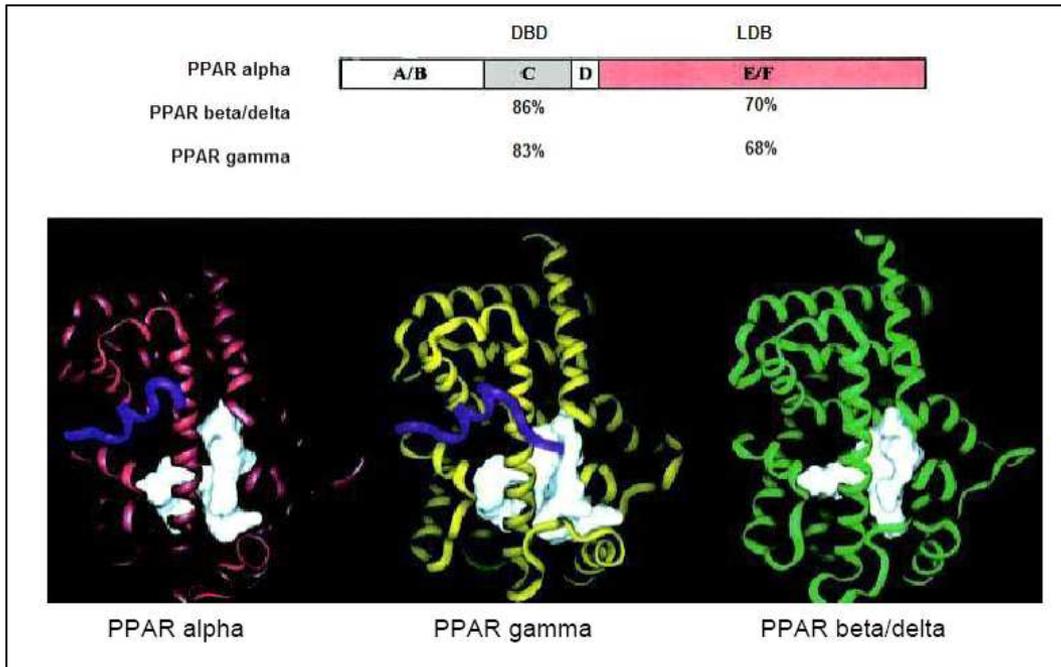


Figure 14 : Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles.

Source : Hibi et al., 2002

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; LDB : domaine de liaison au ligand. La zone blanche correspond à la poche dans laquelle vient se loger le ligand.

L'identification des acides gras insaturés comme ligands des PPAR a fourni la preuve de l'activité transcriptionnelle des acides gras consécutivement à leur interaction directe avec ces récepteurs nucléaires. Ainsi les acides gras peuvent agir comme des hormones. Les acides gras sont capables de lier les trois isotypes, et plus particulièrement PPAR α . De plus, les PPAR présentent une affinité plus forte pour les acides gras insaturés que pour les acides gras saturés. Rappelons également que les eicosanoïdes dérivés de l'ARA fournissent de nombreux activateurs des PPAR : des leucotriènes, des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et des prostaglandines. L'interaction de ces ligands avec les PPAR a permis d'établir l'implication de ces récepteurs dans la réponse inflammatoire (Bernardo and Minghetti, 2006 ; Heneka and Landreth, 2007). Enfin précisons, que des auteurs ont également rapporté que l'AR était capable d'activer le PPAR δ (Shaw et al., 2003 ; Schug et al., 2007).

Parmi les ligands synthétiques, des agents hypolipidémiants tels que les fibrates et clofibrates, activent PPAR α . En revanche, les thiazolidinediones (TZD : troglitazone, pioglitazone et rosiglitazone) sont des antidiabétiques très utilisés dans les expériences en tant qu'agoniste de PPAR γ . Enfin récemment, des antihyperglycémiantes et des antihyperlipidémiantes se sont avérés de bons ligands de PPAR γ et PPAR δ (Chawla et al., 2001 ; van Bilsen et al., 2002). Ces résultats révèlent le rôle primordial de ces récepteurs dans le devenir des cellules adypocytaires ainsi que dans la régulation des statuts glycémiques et lipidiques.

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

✧ Les autres récepteurs nucléaires :

Liver X receptors (LXR α et LXR β). Il s'agit de protéines appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (*figure 10*) liant naturellement les oxystérols (dérivés oxygénés du cholestérol) et régulant le métabolisme du cholestérol et des lipides, ainsi que

la réponse inflammatoire au niveau des macrophage (Zelcer and Tontonoz, 2006). LXR α est situé principalement dans le foie, les macrophages, les reins, les intestins, le tissu adipeux et les glandes surrénales, tandis que LXR β est plus ubiquitaire. L'hétérodimère LXR/RXR α se lie à un élément de réponse LXRE (DR4) et active ou réprime l'expression de gènes cibles. Les acides gras insaturés, tels que l'ARA et l'ALA, peuvent agir comme antagonistes des LXR et inhiber la transcription de gènes cibles, tel que le gène codant pour SREBP-1c (Ou et al., 2001).

Hepatic nuclear factor 4 α (HNF 4 α). Essentiellement exprimé dans le foie, HNF-4 α est un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs orphelins dimériques car il ne possède pas à ce jour de ligand clairement défini (*figure 10*). L'homodimère HNF-4/HNF-4 se lie à un élément de réponse DR1 sur l'ADN et régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation hépatocytaire et les fonctions hépatiques. Les acylCoA, dans des concentrations physiologiques, peuvent moduler l'activité d'HNF-4 α en se liant directement à son domaine de fixation au ligand. L'effet de cette liaison sur l'activité d'HNF-4 α semble dépendre de la taille de la chaîne hydrocarbonée et du degré d'insaturation de l'acide gras. Ainsi, les acides gras saturés (14:0CoA ou 16:0CoA) active HNF-4 α , tandis que le 18:3n-3CoA, le 20:5n-3CoA et le 22:6n-3CoA répriment HNF-4 α (Sampath and Ntambi, 2004 ; Sampath and Ntambi, 2005).

Sterol regulatory element protein (SREBP). Trois SREBP ont été décrites ; SREBP-1a et SREBP-1c contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides, tandis que SREBP-2 régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (Eberle et al., 2004). Les facteurs SREBP sont synthétisés sous la forme de précurseurs inactifs, ancrés dans les membranes du réticulum endoplasmique. Le clivage protéolytique du précurseur, permet la libération de la partie transcriptionnelle active de SREBP, qui une fois libérée, migre dans le noyau et se lie à l'élément de réponse SRE (Sterol responsive element) pour activer la transcription de gènes cibles. En fait, des études chez l'animal et dans des cultures d'hépatocytes ont montré que l'isoforme majoritaire de ces tissus, SREBP-1c, présentait une régulation différente des autres isoformes. En effet, dans des conditions de déplétion en cholestérol,

alors que l'expression et les quantités de SREBP-2 nucléaires augmentent, les ARNm et la forme nucléaire de SREBP-1c ne sont que peu modifiés. En revanche, les acides gras insaturés induisent une réduction de la quantité de SREBP-1c dans le noyau en (1) inhibant le clivage protéolytique et en (2) diminuant la quantité d'ARNm de SREBP-1c, entraînant une baisse du nombre de précurseurs SREBP-1c (Bordoni et al., 2006).

Retinoid X receptor (RXR). Partenaire obligatoire d'hétérodimérisation d'un grand nombre de récepteurs nucléaires, RXR présente trois isotypes α , β et γ (*cf.* I.3.2.1.). Initialement, il a été décrit *in vitro* que l'acide 9-*cis* rétinoïque (métabolite actif de la vitamine A) était le ligand de RXR. Mais récemment, il a également été mis en évidence *in vivo* et *in vitro* que certains acides gras, pouvaient être des ligands directs du RXR. Parmi ces acides gras figurent le DHA, l'ARA, l'acide oléique, le LA, l'ALA, le DPA n-6, l'acide docosatétranoïc (22:4 n-6) et l'acide phytanique (dérivé du phytol, alcool à 20 carbones estérifié dans la chlorophylle) (Lemotte et al., 1996 ; de Urquiza et al., 2000 ; Lengqvist et al., 2004). Cependant, il semble que les AGPI-LC, en particulier le DHA, l'ARA et le DPA n-6, soient capables d'activer RXR à de plus faibles concentrations (Lengqvist et al., 2004). Une représentation schématique et simplifiée des différentes activités transcriptionnelles du RXR, activé par les AG ou par l'AR, est donnée dans la *figure 15*.

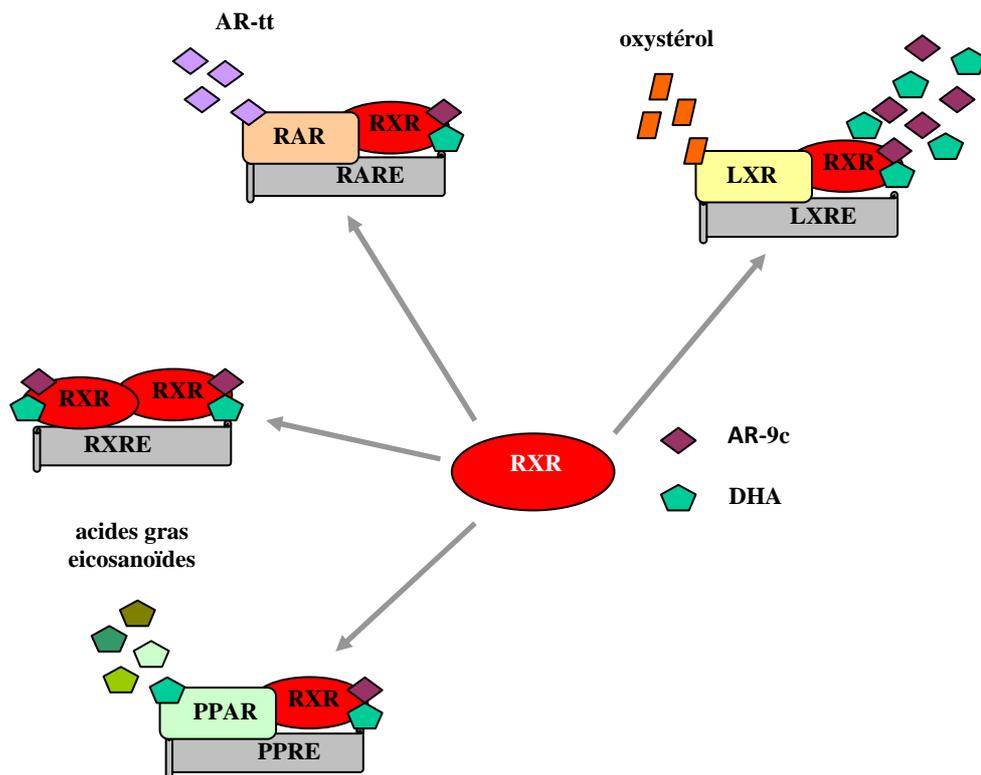


Figure 15 : Représentation schématique de l'activité transcriptionnelle des différents dimères formés avec le RXR.

Adapté d'Alessandri et al., 2004

Les homodimères ou hétérodimères, activés par leur ligand, se lient à des séquences spécifiques de l'ADN, appelées élément de réponse (RE) : RARE, LXRE, RXRE, PPRE, localisées dans la région promotrice du gène cible. Dans un souci de simplification, les isoformes, ainsi que les coactivateurs et corépresseurs ne sont pas représentés.

AR-9c : acide 9-cis rétinolique ; AR-tt : acide tout-trans rétinolique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; LXR : liver X receptor ; PPAR : peroxisome proliferator-activated receptors ; RAR : retinoic acid receptor ; RXR : retinoid X receptor.

I.3.3.2. Distribution tissulaire des PPAR

Chez les vertébrés, les 3 isotypes de PPAR présentent des profils distincts de localisation dans les tissus (Escher and Wahli, 2000 ; van Bilsen et al., 2002 ; Kota et al., 2005). Ainsi, PPAR α est exprimé majoritairement dans le tissu adipeux brun, le foie, les reins, le cœur, la muqueuse intestinale du rat et de l'Homme. Chez l'Homme, il est également rencontré dans le muscle squelettique et le pancréas. PPAR γ est exprimé majoritairement dans les tissus adipeux blanc et brun et le côlon de rat. Chez l'Homme, il est retrouvé dans le cœur, le muscle squelettique et le foie. Enfin, PPAR δ s'avère être exprimé chez l'Homme et chez le rat, dans tous les tissus étudiés à ce jour, avec des niveaux relativement élevés dans le tissu adipeux, la peau et le cerveau.

Concernant leur localisation au sein du SNC, des données obtenues chez le rat âgé de 11 jours ont rapporté que le transcrite de PPAR δ était le plus abondant des 3 isotypes au sein de diverses régions cérébrales telles que le cervelet ou le cortex, PPAR γ étant le plus difficile à détecter dans les régions étudiées (Cullingford et al., 1998). Il semble en fait que contrairement à PPAR α et PPAR γ , PPAR δ soit exprimé de façon ubiquitaire dans le SNC du rat, avec notamment des taux élevés dans le gyrus dentelé, l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet et le thalamus (Xing et al., 1995 ; Braissant et al., 1996 ; Kremerik-Bouillaud et al., 2000 ; Moreno et al., 2004 ; Heneka and Landreth, 2007). D'autres données ont mis en évidence que PPAR α et PPAR δ étaient retrouvés dans les segments cervicaux, thoraciques et lombaires de la moelle épinière, le thalamus et le cortex cérébral (Braissant and Wahli, 1998 ; Moreno et al., 2004). Des mesures d'expression par immunohistochimie chez le rat ont montré que PPAR δ est le principal isotype à être exprimé dans les corps cellulaires des neurones de la substance grise de la moelle épinière, auquel s'ajoute PPAR α dans les noyaux de ces mêmes cellules. Au sein des astrocytes de la substance blanche, il semble que PPAR α soit fortement exprimé ; dans les oligodendrocytes, il s'agit majoritairement de PPAR δ (Benani et al., 2003).

I.3.3.3. Gènes cibles des acides gras dans le cerveau mature

Depuis une dizaine d'années maintenant, des travaux utilisant des micropuces d'ADNc ont permis de mettre évidence un effet des AGPI n-3 (apportés seuls ou en mélange avec des AGPI n-6) sur la transcription de gènes exprimés dans le cerveau entier (Kitajka et al., 2002 ; Barcelo-Coblijn et al., 2003b) mais aussi dans certaines régions cérébrales telles que le cervelet (Barcelo-Coblijn et al., 2003a) et l'hippocampe (Puskas et al., 2003). Il ressort de ces travaux que les AGPI, et notamment ceux de la série n-3, agissent sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cérébral des acides gras mais aussi dans la neurotransmission (libération de neurotransmetteurs, canaux ioniques, connexions). Les mécanismes mis en jeu dans cette régulation pourraient faire intervenir la voie des PPAR.

Des données ont montré que des rats nourris depuis la conception jusqu'à l'âge adulte avec une alimentation supplémentée en AGPI n-3 (ALA ou DHA) présentent une surexpression de 55 gènes, associée à une hypoexpression de 47 autres (Kitajka et al., 2002). Les modifications ainsi observées concernent des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique (phospholipase D), le transport (transthyrétine), participant à l'endocytose (précurseur de la D-cadhérine), des protéines synaptiques (synucléines α et γ), du cytosquelette (dynéine, α -tubuline), jouant un rôle dans la transduction du signal (calmodulines), intervenant dans le métabolisme énergétique (ATP synthétase H^+ , sous-unité d de l'ATP synthétase), participant à la neurotransmission ou à la formation de récepteurs et de canaux ioniques (somatostatine, récepteur V1b de la vasopressine) et enfin des protéines kinases et phosphorylases (phosphatase 2A). Certaines des variations d'expression observées ont alors été interprétées comme pouvant expliquer les effets bénéfiques des AGPI n-3 sur les fonctions cérébrales mises en jeu dans des processus tels que la mémoire ou l'apprentissage. En effet, des gènes codant pour des protéines intervenant dans la machinerie générant l'ATP ont vu leur expression augmentée en réponse aux apports en AGPI n-3. Il a été suggéré que près de la moitié de l'ATP formée était utilisée pour maintenir l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, enzyme contrôlant le flux d'ions résultant de la transmission de l'influx nerveux (Bourre et al., 1989b). Or, il se trouve que plusieurs gènes participant à la transduction du signal ont

également affiché une expression accrue, parmi lesquels ceux codant pour des calmodulines. Des données ont suggéré que la signalisation mettant en jeu les Ca^{2+} /calmodulines pouvait avoir un rôle dans la plasticité du SNC (Gnegy, 2000). Une surexpression de ces protéines pourrait par conséquent être susceptible d'améliorer la communication entre les neurones pendant le processus de transduction du signal.

Enfin des travaux récents, réalisés sur des modèles de souris transgéniques fat-1, présentant une quantité importante d'AGPI-LC n-3 dans les membranes cellulaires, notamment dans le cerveau, ont mis en évidence que l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, l'apoptose, la neurotransmission, la croissance neuronale et la formation des synapses était positivement modifiée (comparés à des souris Wild type) dans l'hippocampe et le cerveau entier (Mènesi et al., 2009 ; He et al., 2009). En particulier, He et al. (2009) ont mis en évidence, chez les souris fat-1, une surexpression des ARNm codant pour GAP-43, gène connu comme étant régulé par l'AR (cf. I.3.2.4) et impliqué dans la plasticité synaptique.

I I. LE CERVEAU : ORGANE CIBLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DE L'ACIDE RETINOIQUE

II.1. Les acides gras polyinsaturés dans le cerveau

De tous les tissus du corps humain, le tissu nerveux présente immédiatement après le tissu adipeux la plus grande concentration en lipides. Ces lipides constituent ainsi environ 50 % du poids sec du cerveau. De plus, dans les membranes cérébrales, les précurseurs LA et ALA ne sont que très faiblement représentés à l'inverse de leurs dérivés à plus longue chaîne. Ainsi, par comparaison avec d'autres tissus, le cerveau humain est l'un des organes les plus riches en DHA (7,2 g/100 g d'AGT) (*tableau 10*).

II.1.1. Données de composition

Au sein des membranes cérébrales, les lipides se composent pour 50 % de phospholipides, environ 20 % de cholestérol, entre 15 à 20 % de cérébrosides et dans des proportions moindres, de sulfatides et de gangliosides (Sastry, 1985). Signalons que dans le cerveau, différentes classes de phospholipides se distinguent : les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidylinositols (PI), les phosphatidylsérines (PS) et les glycérophospholipides à éthanolamine (GPE). Ce dernier groupe comprend lui-même les phosphatidyléthanolamines (PE) et les plasmalogènes (remplacement de l'acide gras, généralement en position sn-1, par un alcool gras). Une illustration de ces données pour les substances grise et blanche du cerveau humain est proposée dans le *tableau 11*.

L'analyse de la composition en acides gras du cortex humain (données obtenues à partir de cortex prélevés sur des sujets (15 femmes et 15 hommes) âgés de 29 à 45 ans) (McNamara and Carlson, 2006) a permis d'observer que les AGS (majoritairement composés des acides stéarique 18:0 et palmitique 16:0) représentent près de 36 % des AGT du cerveau, les AGMI environ 28 % (l'acide oléique 18:1 n-9 étant majoritaire) et les AGPI n-6 et n-3 près de 31 % (respectivement 17 % des AGT pour la série n-6 et 14 %

pour la série n-3) (*figure 16*). Parmi ces derniers, l'ARA et le DHA sont largement représentés (respectivement 10 et 15 % des AGT) ; le LA et le DPA n-6 représentent ensemble près de 2 % des AGT ; l'ALA, l'EPA et le DPA n-3 comptant chacun pour moins d'1 % des AGT. Concernant le cas particulier de l'ARA et du DHA, le premier est préférentiellement incorporé en position sn-2 des PI et des PC. Le DHA quant à lui est majoritairement incorporé en position sn-2 des PE et des PC. Au sein des GPE, le DHA peut en particulier être incorporé dans les plasmalogènes qui composent dans le cerveau la moitié de ce groupe de phospholipides, le plus important quantitativement avec la PC.

Des travaux menés chez le rongeur et chez le primate ont montré que le contenu en DHA diffère d'une région cérébrale à l'autre. Chez les rongeurs, le DHA est ainsi principalement retrouvé au sein du cortex frontal et de l'hippocampe (16 à 22 % des AGT) et est moins présent dans le striatum ou l'ensemble pons-medulla (respectivement 14 % et 10 % des AGT) (Soderberg et al., 1991 ; Favrelière et al., 1998 ; Carrié et al., 2000a ; Xiao et al., 2005). Chez le primate nouveau-né, les concentrations les plus élevées en DHA sont retrouvées dans le globus pallidus, le colliculus supérieur et le putamen (14 % des AGT), suivies des régions corticales dont le cortex frontal (12,9 % des AGT) (Diau et al., 2005).

Enfin, au sein de ces différentes structures cérébrales, le DHA est préférentiellement retrouvé dans les cônes de croissance, les synaptosomes, les astrocytes, la myéline et les membranes mitochondriales (Bourre et al., 1992a ; Grandgirard et al., 1994 ; Jones et al., 1997 ; Suzuki et al., 1997).

Tableau 10 : Composition en acides gras de différents tissus d'origine humaine.

Source : Lauritzen et al., 2001

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

Les valeurs sont exprimées en % des AGT.

tr., traces ; n.d., non détectable.

Tableau 11 : Composition en lipides du cerveau humain.

Source : Macala et al., 1983

	Gray matter	White matter
Cholesterol	17.5 ± 0.6	23.3 ± 0.5
Sphingomyelin	4.5 ± 0.1	7.0 ± 0.1
Choline phospholipids	24.8 ± 0.7	8.8 ± 0.2
Ethanolamine phospholipids (plasmalogen)	24.5 ± 0.5 (60.1 ± 0.7)	19.6 ± 0.3 (84.3 ± 0.3)
Inositol phospholipids	2.7 ± 0.1	1.2 ± 0.0
Serine phospholipids	15.2 ± 0.4	12.5 ± 0.4
Cerebrosides	6.6 ± 0.4	20.0 ± 0.0
Sulfatides	4.2 ± 0.3	7.7 ± 0.1
Total lipid *	73.0 ± 1.6	199.0 ± 2.8

Chaque classe de lipide est exprimée en % des lipides totaux ± SEM.

*, valeurs exprimées en mg/g de poids de cerveau.

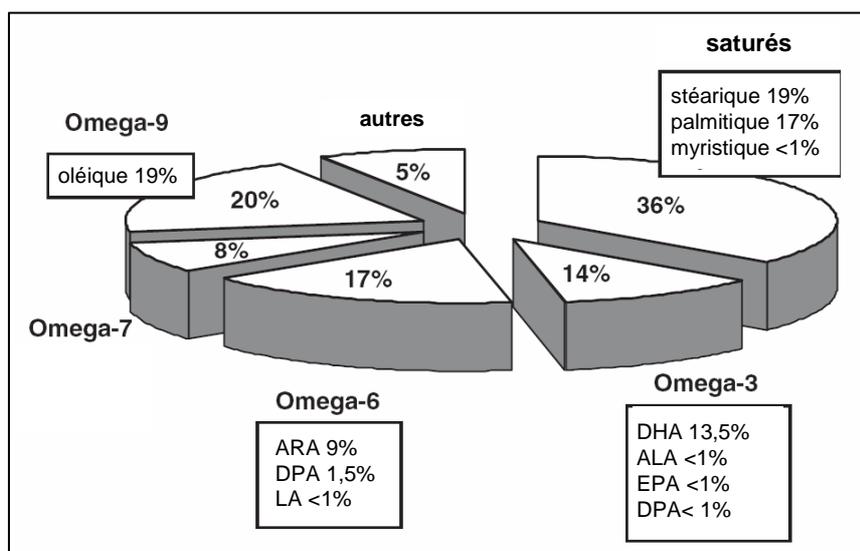


Figure 16 : Composition en acides gras du cortex frontal humain.

Source : McNamara et Carlson, 2006

ALA : acide α -linoléique (18:3 n-3) ; *ARA* : acide arachidonique (20:4 n-6) ; *DHA* : acide docosahexaénoïque (20:6 n-3) ; *DPA* : acide docosapentaénoïque (22:5 n-6 ou n-3) ; *EPA* : acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) ; *LA* : acide linoléique (18:2 n-6).

II.1.2. Phase d'accumulation

Chez l'Homme, l'accumulation des AGPI dans les membranes des cellules du cerveau est maximale durant la période périnatale, comprise entre le dernier trimestre de la grossesse et les deux premières années de vie, et coïncide avec les pics de neurogenèse, de formation des synapses, de différenciation des neuroblastes et de myélinisation axonale (Green and Yavin, 1996 ; Martinez and Mougan, 1998 ; Clandinin, 1999 ; Green et al., 1999). Concrètement, il semble que la quantité de DHA incorporée entre la 26^e et la 40^e semaine de grossesse soit proche de 14,5 mg/semaine. Par la suite, l'accumulation du DHA se poursuit de façon linéaire pour atteindre une concentration voisine de 10 000 nmol/g à l'âge de 2 ans (Clandinin et al., 1980 ; Martinez, 1992 ; Martinez, 1994). Cunnane et al., (2000) précisent à ce sujet que l'accumulation cérébrale du DHA pendant les 6 premiers mois de la vie correspond à la moitié de l'accumulation quotidienne de DHA dans le corps entier.

Par comparaison, chez le rat, le contenu en DHA augmente fortement (+ 98 %) entre le 12^e et le 17^e jour du stade embryonnaire. A la naissance, le DHA représente alors 10 à 12 % des AGT. Par la suite, sa teneur augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau au 21^e jour de vie, comprise entre 10 et 20 % des AGT (Green and Yavin, 1996 ; Green et al., 1999 ; Schiefermeier and Yavin, 2002).

Une fois la phase de croissance rapide du cerveau achevée, il semble que le contenu en AGPI-LC se stabilise dans le cerveau, les modifications de composition persistant mais de manière moins importantes. Ainsi, chez le rat, il a été montré grâce à l'injection intraveineuse d'ARA et de DHA radioactifs, que 3 à 5 % de l'ARA et 2 à 8 % du DHA se renouvellent chaque jour dans le cerveau. Chez l'Homme, un taux de renouvellement cérébral de l'ARA dix fois moindre (0,3 %/jour) a été mesuré par tomographie par émission de positons (TEP) (Rapoport, 2001).

II.1.3. Mécanismes cellulaires contribuant à l'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales

D'après des données de la littérature, il semble que la couverture des besoins en AGPI-LC associe deux mécanismes : d'une part, une synthèse *in situ* des dérivés à longue chaîne à partir des précurseurs n-6 et n-3 présents dans le plasma et d'autre part un transport des AGPI-LC déjà formés depuis le plasma.

II.1.3.1. Conversion intracérébrale des précurseurs en dérivés à longue chaîne

Des données obtenues chez le rat ont montré que le cerveau peut non seulement capter l'ALA mais aussi le métaboliser grâce à la présence des enzymes utiles à sa désaturation et à son élongation (*idem* pour le LA) (Cunnane et al., 1994 ; Pawlosky et al., 1996). Des travaux menés chez l'Homme ont mis en évidence que le cerveau est un tissu très riche en ARNm codant pour la $\Delta 6$ désaturase, par comparaison avec d'autres tissus tels que le foie (Cho et al., 1999a ; Cho et al. 1999b).

Le LA et l'ALA, qui sont faiblement représentés dans le cerveau (le LA comptant pour moins de 1% des AGT, la teneur en ALA étant quant à elle encore plus faible), sont les AGPI n-6 et n-3 majoritaires au sein des triglycérides et des acides gras libres plasmatiques, fractions qui fournissent la plupart des acides gras aux différents tissus de l'organisme (Spector, 2001). Dans ce contexte, le LA et l'ALA seraient les premiers AGPI à être disponibles pour le cerveau produisant, suite à leur bioconversion intracérébrale, un apport en AGPI-LC potentiellement important. En effet, des études réalisées sur des cultures cellulaires ont mis en évidence la capacité des astrocytes à synthétiser l'ARA et le DHA à partir de leurs précurseurs respectifs dans le milieu d'incubation (Moore et al., 1991 ; Bernoud et al., 1998 ; Williard et al., 2001). A proportions égales entre LA et ALA, Moore et al. (1991) ont mesuré une quantité 10 fois plus importante de DHA que d'ARA au sein des astrocytes ; ces derniers libérant jusqu'à 45 fois plus de DHA que d'ARA dans le milieu extracellulaire. D'autres travaux ont précisé que lors de cette synthèse astrocytaire, le DHA pouvait être relargué sous forme non estérifiée, ou au sein de

phospholipides contenant de la choline (PC et lysoPC) (Moore, 1994 ; Bernoud et al., 1998). Des données plus récentes ont fourni des éléments quant au devenir de ces AGPI-LC nouvellement synthétisés (Williard et al., 2002). Concernant les AGPI n-6, il semble que l'ARA capté par les astrocytes reste majoritairement sous cette forme, 25 % seulement étant convertis en dérivés à 22 et 24 atomes de carbone, tels que le 22:4 n-6 dont plus de 50 % sont rétroconvertis en ARA, favorisant ainsi l'accumulation de cet AGPI dans le cerveau. Pour les AGPI n-3, la situation est différente puisque 70 % de l'EPA sont convertis au sein des astrocytes en 22:5 n-3 dont 30 % sont métabolisés en 24:5 n-3 et en ses dérivés, et moins de 10 % sont rétroconvertis en EPA.

Outre la participation des astrocytes dans la conversion des précurseurs en dérivés à longue chaîne, Moore et al. (1991) avaient également mis en évidence l'implication des neurones dans la métabolisation des AGPI. Les résultats obtenus avaient alors permis d'observer que, dans les conditions expérimentales testées, les neurones ne pouvaient pas synthétiser le DHA à partir de l'ALA ou de l'EPA ; ces cellules n'intervenant que dans les étapes d'élongation du métabolisme des AGPI et ce à un niveau très faible. Ces données ont été récemment complétées par celles de Kaduce et al. (2008) qui, chez le rat, ont mis en évidence la capacité des neurones, notamment hippocampiques, à convertir le LA et l'ALA en ARA et en DHA, respectivement.

Enfin, signalons que plusieurs travaux ont rapporté que les cellules de l'endothélium vasculaire cérébral pouvaient convertir non seulement le LA en ARA, mais aussi l'ALA en 22:5 n-3 et en DHA, avec une capacité néanmoins limitée pour ce dernier (Moore et al., 1990 ; Delton-Vandenbroucke et al., 1997 ; Bernoud et al., 1998 ; Moore, 2001). Moore et al. (2001), après observation d'une production accrue de DHA au sein de co-cultures d'astrocytes et de cellules endothéliales, par comparaison avec des astrocytes cultivés seuls, a ainsi suggéré que les deux types cellulaires coopéraient entre eux pour fournir des AGPI-LC aux neurones.

Finalement, il semble donc que plusieurs types cellulaires participent à la conversion intracérébrale des précurseurs plasmatiques en AGPI-LC. Néanmoins selon certaines données, ce mécanisme ne participerait à la couverture des besoins du cerveau

en AGPI-LC que de façon mineure, comparativement au second mécanisme présenté dans le paragraphe qui suit (Rapoport et al., 2007 ; Chen et al., 2008 ; Gao et al., 2010).

II.1.3.2. Apports des AGPI-LC de la circulation sanguine au cerveau

Un certain nombre de données plaide en faveur d'une couverture des besoins en AGPI-LC du cerveau *via* la circulation. Ainsi, la synthèse hépatique d'AGPI-LC, en particulier l'ARA et le DHA, contribuerait de façon primordiale à la couverture des besoins en AGPI du cerveau (Gao et al., 2010 ; Rapoport et al., 2010). Il a notamment été suggéré que cette synthèse couvrirait plus des 2/3 des besoins du cerveau en DHA (Horrocks and Farooqui, 2004).

Pour atteindre le cerveau (depuis la circulation), les AGPI traversent tout d'abord la barrière hémato-encéphalique (BHE), interface entre le sang et le fluide interstitiel cérébral (Ouellet et al., 2009). La BHE est un système biologique complexe, composé de cellules endothéliales, de péricytes et d'astrocytes qui interviennent dans son induction et la maintenance de ses caractéristiques physiologiques et structurales. Ainsi la BHE, constituée des cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux reliées entre elles par des jonctions serrées et accolées par les pieds des péricytes et des astrocytes, joue un rôle très important dans le contrôle de l'homéostasie, grâce à une perméabilité sélective aux nutriments et autres molécules apportés par le flux sanguin. La *figure 17* donne une représentation schématique de la BHE.

De nombreux travaux ont montré que les acides gras qui traversent la BHE proviennent majoritairement des complexes plasmatiques albumine/acide gras et dans une moindre mesure des lipoprotéines circulantes. De plus, Ouellet et al. (2009) ont récemment mis en évidence que la liaison à l'albumine réduisait de façon importante le passage du DHA à travers la BHE.

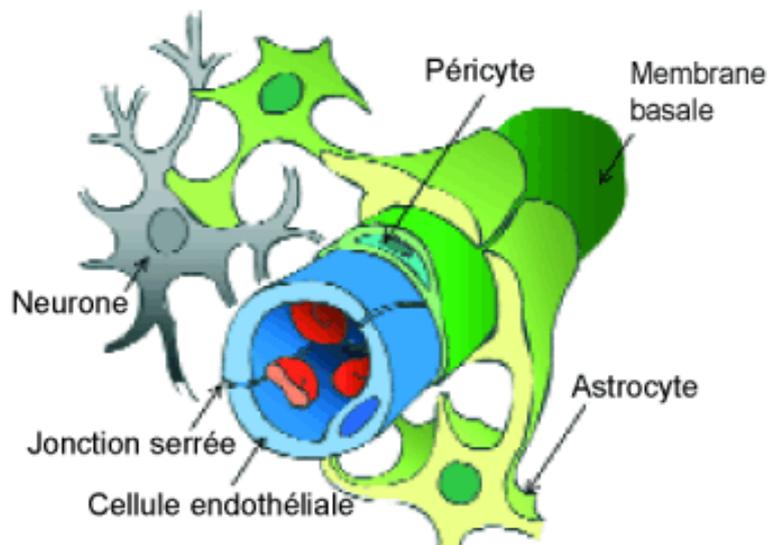


Figure 17 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.

Source : Buclin and Biollaz, 2005

Selon certaines données, le pool d'acides gras libres du plasma pourrait être une source importante d'apport en ARA et en DHA au cerveau, ces deux AGPI représentant respectivement 4,1 et 1,6 % des AGT plasmatiques chez l'Homme (Spector, 2001). Plusieurs données recueillies chez le rat ont par ailleurs mis en évidence la capacité du cerveau à incorporer de façon rapide de l'ARA et du DHA ayant été préalablement injectés sous forme libre par voie plasmatique (DeGeorge et al., 1989 ; Nariai et al., 1993 ; Washizaki et al., 1994).

Le modèle d'Edmond (2001) propose que les lipoprotéines dans le sang sont captées par des récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales, côté flux sanguin (face luminale). Dans les cellules endothéliales, les acides gras estérifiés contenus dans les lipoprotéines seraient alors libérés (par lipolyse) et transportés à travers la BHE. De façon similaire, les AG essentiel sous forme non estérifiés seraient captés et transportés à travers la cellule endothéliale vers la membrane abluminale, où seraient positionnés des transporteurs spécifiques qui permettraient l'entrée de ces AG dans le cerveau. Dans les cellules endothéliales de la BHE, des travaux ont révélé l'existence de transporteurs transmembranaires : les MTC (monocarboxylic acid transporters) et les FATP (fatty acid transport proteins) (Edmond, 2001). Signalons également que les neurones et les cellules gliales expriment en plus des FATP, des protéines de transports cytosoliques dénommées FABPs (fatty acid binding proteins) (Utsunomiya et al., 1997 ; Ma et al., 2010). Dans le cerveau mature plusieurs types de FABP ont été identifiés parmi lesquels B-FABP (Brain-FABP), E-FABP (Epidermal-FABP) et H-FABP (Heart-FABP) (Veerkamp and Zimmerman, 2001 ; Owada, 2008). Bien que ces trois types de FABP lient les AGPI-LC, des affinités différentes pour le type d'AG ont été observées. Ainsi, H-FABP présente une forte affinité pour les AGPI n-6, E-FABP pour les AG saturés et B-FABP pour les AGPI n-3 (Hanhoff et al., 2002).

Récemment, Hamilton et Brunaldi (2007) ont présenté un nouveau modèle de transport des AG à travers la BHE, expliquant que le modèle d'Edmond n'était pas cohérent avec la rapidité d'incorporation des AG dans le cerveau. Ainsi ce nouveau modèle repose sur un transport par diffusion passive (aussi appelé flip-flop), ne nécessitant pas d'énergie ni de transporteur. L'AG se lierait à la membrane endothéliale,

diffuserait à travers la bicouche phospholipidique (par un mécanisme de flip-flop) et serait libéré dans le cytosol. Avec ou sans l'aide de FABP, l'AG accéderait à la membrane abluminale de la cellule endothéliale, et le même mécanisme de flip-flop se répèterait pour que ce même AG atteigne le fluide interstitiel cérébral et les membranes cérébrales (Hamilton and Brunaldi, 2007).

A la vue des données, il semble que le mécanisme par lequel les AGPI-LC entrent dans le cerveau ne soit pas clairement défini. Deux modèles généraux s'opposent : (1) l'un suggère le captage des lipoprotéines *via* des récepteurs spécifiques, probablement les LDLr (low density lipoprotein receptor) et VLDLr (very low density lipoprotein receptor), et la traversée de la cellule endothéliale grâce à des transporteurs (Edmond, 2001) ; (2) l'autre propose une diffusion passive des AG non estérifiés du plasma à travers la cellule endothéliale (Hamilton and Brunaldi, 2007). De plus, de récents travaux réalisés chez des souris knock-out pour les récepteurs aux lipoprotéines (VLDLr ou LDLr) ont mis en évidence que ces récepteurs n'étaient pas nécessaires au maintien des concentrations en AGPI dans les membranes cérébrales, suggérant un autre mécanisme de transport que celui proposé par Edmond (Chen et al., 2008 ; Rahman et al., 2010). Le modèle de diffusion passive des acides gras à travers la BHE est ainsi le plus privilégié à l'heure actuelle (Ouellet et al., 2009).

II.1.4. Rôles des AGPI dans le fonctionnement cérébral

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont rapporté l'implication des AGPI n-3 et plus particulièrement du DHA dans nombre de manifestations comportementales et neurophysiologiques (Lauritzen et al., 2001 ; Alessandri, 2004 ; Guesnet et al., 2005 ; McNamara and Carlson, 2006 ; Innis, 2007 ; Crawford et al., 2009 ; Laviaille et al., 2010).

II.1.4.1. Modulation de la composition membranaire en DHA

Pour induire une baisse du contenu cérébral en DHA, la majorité des travaux cités dans la littérature mettent en œuvre chez l'animal une déficience en AGPI n-3 sur plusieurs générations, en soumettant une femelle ainsi que sa progéniture au même régime déficient en ALA. Ainsi, il a été mis en évidence une diminution du contenu cortical en DHA proche de 83 % chez des rats de 2^{ième} génération et de 87 % chez des rats de 3^{ième} génération âgés de 8-9 semaines et soumis à un régime déficient, apportant 0,04 g d'ALA pour 100 g de lipides (contre 3,1 g pour le régime témoin) (Moriguchi et al., 2000). Il est à noter qu'une déficience en ALA mise en place sur une seule génération induit également une baisse du contenu cérébral en DHA, mais avec une amplitude moindre comparée à une déficience multi-générationnelle. En effet, DeMar et al., (2006) ont observé une baisse de 36 % du contenu cérébral en DHA chez des rats sevrés ayant reçu pendant 18 semaines un régime contenant 2,6 mg d'ALA pour 100 g de régime (contre 183 mg pour le régime témoin). Par contre, chez le rat jeune adulte (60 jours) le contenu en DHA du cerveau ne semble pas être modifié par la mise en place d'une déficience alimentaire chronique (7 mois) en AGPI n-3 (Bourre et al., 1992b). Le doublement de la demi-vie du DHA dans le cerveau de rat soumis à une déficience chronique en ALA (15 semaines) (DeMar et al., 2004) pourrait expliquer le résultat obtenu par Bourre et ses collaborateurs (1992b). De façon intéressante, la mise en place d'un protocole de déficience chronique en ALA (40 ou 80 jours) chez la souris adulte (60 jours) aboutit en revanche à une réduction du contenu en DHA au sein du cortex frontal et du striatum (McNamara and Carlson, 2006). Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par une différence de métabolisme cérébral du DHA chez les deux espèces et par une sensibilité régional-spécifique vis-à-vis de la perte en DHA. Néanmoins, l'apport en AGPI n-3 par voie nutritionnelle semble nécessaire pour maintenir le contenu cérébral en DHA et ce même une fois le développement du cerveau achevé.

Il est à noter que dans les membranes cérébrales, la diminution de la teneur en DHA induite par une carence en AGPI n-3 s'accompagne de l'incorporation compensatrice de son analogue métabolique de la série n-6, le DPA (22:5 n-6), dont la teneur élevée est un critère biochimique de déficit d'apport alimentaire n-3 (Salem et al., 2001 ; Greiner et al., 2003 ; Moriguchi et al., 2004). D'un point de vue structural, le DHA

et le DPA n-6 sont relativement identiques puisqu'ils ne diffèrent que par la présence d'une double liaison supplémentaire en position n-3 de la chaîne carbonée pour le DHA. Cependant sur le plan fonctionnel, les données ont montré que le DPA n-6 ne pouvait remplacer le DHA, suggérant que le besoin du cerveau en DHA est hautement spécifique d'un point de vue structural (Lim et al., 2005). Ceci expliquerait qu'en situation d'apport alimentaire pauvre en ALA, le cerveau développe une capacité à conserver très efficacement le DHA en ralentissant le turn-over de cet acide gras et en diminuant le processus de sa perte métabolique.

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

Finalement, précisons que de nombreuses données ont rapporté que la perte du DHA dans les membranes cérébrales, induite par une carence en AGPI n-3, peut être corrigée par un apport en AGPI n-3. Cependant, il apparaît que contrairement aux tissus périphériques tels que le sérum, les membranes érythrocytaires ou le foie (lesquels retrouvent un contenu en DHA comparable à celui d'animaux témoins en 1 à 2 semaines), la restauration du contenu cérébral en DHA est considérablement plus lente. Pour preuve, Moriguchi et al. (2001) ont mis en évidence chez des rats déficients de 2^{ème} génération soumis à l'âge de 7 semaines à un apport combiné d'ALA et de DHA (respectivement 2,6 et 1,3 g/100 g de régime), que la restauration du contenu en DHA est complète après plus de 4 semaines dans la rétine et après 8 semaines dans le cerveau. De plus, d'autres données ont précisé que ce processus de réplétion était plus long (supérieur à 130 jours) pour les cellules du cerveau (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) comparées aux cellules du foie, rein, poumon ou rétine (Bourre et al., 1989a). Il semble également que les taux de récupération du DHA ne soient pas les mêmes dans les différentes régions du cerveau. Ainsi, le cortex frontal et l'hippocampe feraient partie des régions pour lesquelles les capacités de restauration du contenu en DHA sont les plus lentes (Moriguchi et al., 2001 ; Xiao et al., 2005). Enfin, des travaux ont mis en évidence une période critique pour

rétablir la composition membranaire en DHA par voie nutritionnelle : la période pré-sevrage (Moriguchi and Salem, 2003). En effet, avant le sevrage une supplémentation en ALA permet de restaurer complètement le contenu en DHA. En revanche au delà, l'apport en AGPI n-3 ne permettrait qu'une réversion partielle des paramètres biochimiques (Kodas et al., 2002).

II.1.4.2. Modulation de la plasticité cérébrale

La plasticité cérébrale est la capacité que possède une région cérébrale à réorganiser son réseau synaptique et neuronal pour compenser une lésion tissulaire ou pour répondre à de nouvelles conditions de l'environnement. Au cours des dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés aux effets des AGPI n-3 sur ces processus de plasticité cérébrale.

Ainsi, des études *in vitro* ont mis en évidence que le DHA stimule la croissance des neurites des neurones hippocampiques (Calderon and Kim, 2004 ; Cao et al., 2009) et des neurones corticaux (Cao et al., 2005). Chez des gerbilles adultes supplémentées en DHA (4 semaines), une augmentation de la densité des épines dendritiques post-synaptiques a été observée dans l'hippocampe (Sakamoto et al., 2007). En plus, la taille des neurones hippocampiques est diminuée chez de jeunes rats (21 jours) déficients en DHA (Ahmad et al., 2002). D'autres auteurs se sont intéressés à la PLT (potentialisation à long terme), modèle expérimental d'étude de la plasticité synaptique, qui se traduit par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels d'action post-synaptiques, suite à un court train de stimulations électriques à haute fréquence. Ce modèle de plasticité synaptique met notamment en jeu les récepteurs AMPA et NMDA. Ainsi, une supplémentation en EPA (pendant 8 semaines) chez des rats adultes ou âgés améliore la PLT dans l'hippocampe (Kawashima et al., 2010 ; Kelly et al., 2010). Cao et al. (2009) ont également mis en évidence que le DHA favorise la synaptogenèse et l'activité glutamatergique de neurones hippocampiques en culture. Plusieurs auteurs ont montré que les AGPI n-3 induisaient une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique, telles que GAP-43 (growth associated protein 43 ou neuromoduline) (Wu et al., 2009), PSD-95 (Sakamoto et al., 2007), les sous unités des

récepteurs AMPA (GluR1 et GluR2) et NMDA (NR1, NR2A et NR2B) (Cao et al., 2009), etc. Enfin, des données récentes suggèrent l'implication des AGPI n-3 dans une autre forme de plasticité cérébrale, la neurogenèse, qui se déroule dans le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe et la partie antérieure de la zone sous ventriculaire (SVZ) (processus détaillé dans le paragraphe IV.2). Ainsi, chez les souris transgéniques *fat-1*, exprimant le gène *C. elegans fat-1* et capables de produire des AG n-3 à partir des AG n-6 conduisant à une abondance d'AG n-3 dans tous les tissus, il a été mis en évidence, dans l'hippocampe, une augmentation de la prolifération cellulaire (He et al., 2009). Ces résultats confortent une étude précédente réalisée chez le homard (Beltz et al., 2007). En revanche, Kawakita et al. (2006) ont montré *in vitro* que le DHA diminuait la prolifération cellulaire mais stimulait la différenciation en neurones. D'autres travaux, se sont intéressés aux effets des AGPI n-3 sur l'expression des neurotrophines, facteurs qui favorisent la neurogenèse et en particulier la survie des neurones (Lee and Son, 2009). Parmi les neurotrophines, le niveau de BDNF (brain derived neurotrophic factor) est augmenté par les AGPI n-3 (Wu et al., 2004, Venna et al., 2009). En plus, une déficience en AGPI n-3 induit, dans l'hippocampe de rat, une diminution de NGF (nerve growth factor), membre de la famille des neurotrophines (Ikemoto et al., 2000). De façon intéressante, il été mis en évidence très récemment, qu'un traitement par l'ALA induisait une augmentation de neurogenèse, en particulier de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire et de la différenciation neuronale, corrélée avec une augmentation de l'expression de BDNF dans l'hippocampe de souris adultes (Blondeau et al., 2009).

Il apparaît donc que les acides gras sont capables de moduler la plasticité cérébrale, mécanisme qui sous-tend les processus mnésiques (Su, 2010).

II.1.4.3. Modulation des capacités mnésiques

De nombreuses études convergent pour établir une relation entre un apport alimentaire déficient en AGPI n-3 et des troubles cognitifs. Les données les plus fréquentes obtenues chez l'animal portent sur les capacités d'apprentissage et de mémoire, mesurées à l'aide de différents tests : discrimination olfactive (Greiner et al., 2001), labyrinthe radial (Gamoh et al., 1999) et labyrinthe aquatique de Morris (Moriguchi and

Salem, 2003), principalement. Les performances des animaux déficients sont alors altérées.

Ainsi, parmi les nombreuses données obtenues chez les rongeurs, Moriguchi et al. (2000) ont mis en évidence chez des rats carencés sur 2 et 3 générations (0,04 g d'ALA/100 g de lipides) une baisse des performances d'apprentissage dans le labyrinthe aquatique de Morris par comparaison avec des animaux témoins (3,1 g d'ALA/100 g de régime). Les auteurs ont également précisé que les animaux déficients de 3^{ème} génération réussissent moins bien que ceux de 2^{ème} génération. Les niveaux d'AG n-3 dans le cerveau des rats déficients étaient diminués de plus de 80 % (83 % à la 2^{ème} génération et 87 % à la 3^{ème} génération). De plus, un ratio DPA n-6/DHA plus élevé avait été observé dans le cortex frontal des animaux déficients de 3^{ème} génération par comparaison avec celui des animaux déficients de 2^{ème} génération. Plus tard, Moriguchi et Salem (2003) trouvent une corrélation positive entre le contenu en DHA du cerveau et les performances dans le labyrinthe aquatique de Morris. Un autre travail a également étudié l'effet d'une supplémentation en DPA n-6 ou en DHA sur les performances de rats adultes (Lim et al., 2005). Les rats supplémentés en DPA n-6 présentent dans leur cerveau une diminution du DHA (- 65 %), parallèlement à une augmentation de DPA n-6, comparés aux rats supplémentés en DHA. Dans le test de Morris, les animaux nourris avec du DPA n-6 montrent un déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale de référence, comparés aux animaux nourris avec du DHA, suggérant qu'une très forte spécificité structurale est nécessaire dans les phospholipides des membranes cérébrales pour un fonctionnement optimal de cet organe.

Notons que dans le test du labyrinthe aquatique de Morris, Wainwright et al. (1998) ont mesuré les performances de rats dans un test de mémoire spatiale de référence d'une part, et de mémoire spatiale de travail d'autre part. Les auteurs ont alors mis en évidence que les performances des rats déficients en oméga 3 (sur deux générations) n'était pas différentes pour le test de mémoire de référence ; en revanche, les animaux déficients présentaient des déficits de mémoire de travail, suggérant que ce test était plus sensible à l'effet des AG n-3 (Fedorova and Salem, 2006). Ainsi ces travaux ne retrouvent pas la relation entre le contenu cérébral en DHA et les performances en mémoire spatiale

de référence, suggérée par Moriguchi et Salem (2003). Une explication possible à ce désaccord peut être le niveau de déplétion en DHA supérieur dans les expériences de Moriguchi. Une autre étude, s'est intéressée aux effets d'une déficience en AG n-3 suivi par une supplémentation (ou non) en AGPI n-3 et n'a pas non plus observé de différences entre les différents groupes, dans les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale de référence évaluées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Carrié et al., 2000b). La déficience avait alors induit une baisse de 35 % du contenu en DHA dans l'hippocampe ; tandis que la supplémentation avait permis de restaurer le niveau de DHA dans cette structure.

Ainsi, les AGPI n-3 modulent les fonctions cognitives. Cependant, selon le statut en DHA de l'animal, les capacités d'apprentissage et de mémoires spatiales ne semblent pas toujours être affectées de la même manière.

II.2. L'acide rétinoïque dans le cerveau

Les rétinoïdes sont connus depuis longtemps pour leur rôle dans le développement du SNC. Ce n'est que très récemment que leur rôle dans le cerveau adulte a été étudié (Maden, 2002 ; McCaffery et al., 2003 ; Mey and McCaffery, 2004 ; Bremner and McCaffery, 2008) et que la présence de l'AR a été détectée (Kane et al., 2005).

II.2.1. Transport vers le cerveau et métabolisme cérébral

II.2.1.1. Transport vers le cerveau

A ce jour, quelques données sont disponibles sur le mode de passage du rétinol à travers la BHE. Yamagata *et al.*, (1993) ont étudié le transport jusqu'au cerveau de l'AR injecté dans la cavité péritonéale. D'autres résultats obtenus dans des conditions d'apports suffisants en vitamine A chez le rat, ont montré que 90 % de l'AR total du cerveau n'est pas synthétisé localement mais provient du pool circulant dans le plasma (Kurlandsky et

al., 1995). Par la suite, il a été montré que l'isomère tout-*trans* de l'AR est la forme la plus largement transportée du sang au cerveau par rapport aux deux autres isomères, l'acide 13-*cis* rétinolique et l'acide 9-*cis* rétinolique (Le Doze et al., 2000). Par ailleurs, il a été montré la présence de l'AR au niveau cérébral, chez des rats carencés en vitamine A traités avec de l'AR, l'hippocampe et le cortex contenant les proportions les plus importantes (Werner and Deluca, 2002). L'origine de l'AR dans le cerveau semble donc largement exogène dans des situations d'apports suffisants en vitamine A.

II.2.1.2. Métabolisme cérébral

Bien que l'apport en AR au niveau cérébral soit largement exogène, le cerveau adulte possède toute la machinerie nécessaire à la synthèse de l'AR, à son transport et à son action nucléaire (Lane and Bailey, 2005 ; Olson and Mello, 2010).

L'identification de protéines de liaison des rétinoïdes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR dans le cerveau adulte plaide en faveur d'un métabolisme cérébral du rétinol. En effet, la présence des protéines de transport CRBP (Cellular retinol binding protein) et CRABP (Cellular retinoic acid binding protein) (Zetterstrom et al., 1994 ; Zetterstrom et al., 1999), des enzymes de conversion ADH1, ADH4 (Martinez et al., 2001) et RALDH (McCaffery and Drager, 1994) a été révélée dans certaines structures du cerveau adulte telles que l'hippocampe et le striatum, structures particulièrement impliquées dans les processus mnésiques.

Outre la mise en évidence des enzymes intervenant dans le métabolisme de la vitamine A, le cerveau adulte est capable de synthétiser *de novo* et ce de façon efficace de l'AR (Dev et al., 1993). La synthèse d'AR a été mise en évidence dans le cerveau de souris adulte et plus particulièrement dans le striatum, où cette synthèse serait plus importante que dans l'hippocampe (McCaffery and Drager, 1994). En plus, l'équipe de Sakai et al., en 2004, montre que l'AR est synthétisé par la RALDH2 au niveau des méninges adjacentes à l'hippocampe. Enfin, la présence de rétinol et surtout des rétinyl esters, a pu être mise en évidence dans l'hippocampe de cerveau humain mature (Connor and Sidell, 1997).

II.2.2. Rôles de l'acide rétinoïque dans le fonctionnement cérébral

II.2.2.1. Modulation de la plasticité cérébrale

Une diminution de RC3 (neurogranine), protéine impliquée dans la plasticité synaptique, a été observée dans le cerveau entier d'animaux carencés en vitamine A (Enderlin et al., 2000 ; Husson et al., 2003). En particulier, Il a été mis en évidence une baisse de cette protéine dans l'hippocampe (Etchamendy et al., 2003) et le striatum (Husson et al., 2004) de rats carencés. Cependant, un traitement à l'AR ne permet pas de normaliser le niveau d'expression de RC3. Signalons également que dans le striatum, une diminution de GAP-43, autre protéine synaptique, a été observée chez des rats soumis à une carence vitaminique A (Husson et al., 2004). De plus, Misner et al., (2001) ont montré un déficit de PLT dans l'hippocampe de souris carencées en vitamine A pendant 12 semaines, reversé par une alimentation supplémentée en cette même vitamine.

De nombreux travaux se sont intéressés au rôle clef de la vitamine A dans le développement du SNC. Ainsi, l'AR agit sur la différenciation neuronale, la croissance neuritique et la mise en place du tube neural (Corcoran and Maden, 1999 ; McCaffery and Drager, 2000 ; Maden, 2002 ; McCaffery et al., 2003). Ce n'est que plus récemment qu'a été découvert le rôle important de l'AR dans les fonctions du cerveau adulte. Parmi les gènes cibles des rétinoïdes figurent des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus de neurogenèse, telles que les neurotrophines NGF et BDNF, et leurs récepteurs respectifs TrkA et TrkB (Scheibe and Wagner, 1992). En effet, plusieurs études *in vitro* réalisées sur des cultures de neurones ont démontré que l'AR intervenait dans les processus de neurogenèse (Wohl and Weiss, 1998 ; Takahashi et al., 1999 ; Wang et al., 2005). Il a ainsi été montré que l'AR favorisait la formation et la croissance des dendrites (Wu et al., 1998 ; Corcoran and Maden, 1999). Un traitement des cellules souches hippocampiques de rats par l'AR, induit leur différenciation en neurones et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de récepteurs aux neurotrophines tels que le TrkA, TrkB et le P75^{NTR} (Takahashi et al., 1999), neurotrophines qui induisent la croissance neuritique de cellules hippocampiques (Labelle and Leclerc, 2000). L'augmentation de l'expression du récepteur TrkA par les rétinoïdes (les trois formes : acide 9-*cis* rétinoïque,

acide 13-*cis* rétinoïque et acide tout-*trans* rétinoïque) a été également confirmée par une étude sur une lignée de cellules de neuroblastome humain (Chu et al., 2003), révélant une meilleure efficacité de l'acide tout-*trans* rétinoïque. Enfin, un traitement de cellules progénitrices neurales par l'AR induit leur différenciation en trois types différents de cellules nerveuses (astrocytes, oligodendrocytes ou motoneurones), l'activation de certains récepteurs nucléaires de l'AR se faisant de façon séquentielle pour aboutir au phénotype final (Goncalves et al., 2005). A ce jour, les données de la littérature relatives au rôle de l'AR dans les processus de neurogenèse chez l'adulte restent peu nombreuses et souvent contradictoires.

Des travaux ont ainsi montré qu'un traitement par l'acide 13-*cis* rétinoïque (isomère de l'AR tout-*trans*) à de fortes doses (1mg/kg/jour) pendant trois semaines chez la souris, induit une diminution de neurogenèse hippocampique (Crandall et al., 2004 ; Sakai et al., 2004). Des effets identiques sont observés suite à un traitement par l'isomère tout-*trans* (Crandall et al., 2004). Plus récemment, quelques études se sont intéressées aux effets d'une hypoactivité de la voie des rétinoïdes sur les processus de neurogenèse chez l'adulte en utilisant la carence en vitamine A comme approche nutritionnelle. Ainsi, une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation ont été observées dans le bulbe olfactif (Asson-Batres et al., 2003). Dans l'hippocampe, Jacobs et al., (2006) ont mis en évidence une diminution de la survie et de la différenciation neuronale chez des animaux carencés en vitamine A. Cependant, un régime enrichi en vitamine A n'avait pas permis de rétablir le niveau de neurogenèse chez ces souris carencées. Enfin des travaux récents réalisés au laboratoire, ont montré une altération de la neurogenèse hippocampique chez des rats carencés (diminution de la prolifération cellulaire, survie cellulaire et différenciation neuronale) parallèlement à une diminution de TrkA (résultat non significatif). Plus important, ces effets sont réversés par l'injection d'acide tout-*trans* rétinoïque (150 µg/kg) pendant 4 semaines (Bonnet et al., 2008).

Ainsi l'impact des rétinoïdes, et plus particulièrement de l'AR, sur la plasticité cérébrale pourrait expliquer les effets observés sur les capacités mnésiques.

II.2.2.2. Modulation des capacités mnésiques

La carence vitaminique A, induisant un hypoactivité de la voie des rétinoïdes, entraîne chez la souris adulte des déficits cognitifs observés dans un test de mémoire relationnelle (Etchamendy et al., 2003). Cependant dans cette expérience, l'administration d'AR n'a pas permis de corriger les déficits de mémoire relationnelle. Par contre, chez des rats carencés adultes, un traitement par l'AR a permis de réverser les déficits de mémoire spatiale de référence mesurés dans le labyrinthe aquatique de Morris (Bonnet et al., 2008). D'autres études ont conforté la relation entre l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et les processus cognitifs. Pour exemple, il a été démontré qu'une carence vitaminique A induisait des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans un test de labyrinthe radial, et qu'une supplémentation en vitamine A permettait de corriger les déficits observés (Cocco et al., 2002). En revanche, d'autres travaux menés sur l'effet de l'isomère 13-*cis* de l'AR, utilisé sous la dénomination Accutane dans le traitement de l'acné, ont montré des effets néfastes de cette molécule dans un test de mémoire hippocampo-dépendante chez la souris (Crandall et al., 2004), résultats restant controversés par l'étude de Ferguson et Berry (2007) qui démontre au contraire, que le traitement par la forme 13-*cis* de l'AR est sans effet sur l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le rat.

III. INTERACTIONS ENTRE LES VOIES DE SIGNALISATION DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DE L'ACIDE RETINOIQUE

Plusieurs sources bibliographiques démontrent l'existence de relations étroites entre les lipides et la vitamine A.

Ainsi il a été décrit chez des enfants hyperlipidémiques, une diminution du ratio β -carotène/lipides totaux plasmatique, parallèlement à une légère augmentation de la concentration en rétinol plasmatique (Morinobu et al., 2002). D'autre part, un traitement par les rétinoïdes provoque une détérioration du profil lipidique dans le plasma. Ainsi, 20 % des patients traités par les rétinoïdes présentent une hypertriglycémie (2,3 – 6,9 mmol/L); en plus, une augmentation des LDL et une diminution des HDL est fréquemment observée chez ces patients (Staels, 2001).

Les études de biologie cellulaire ont alors apporté des pistes sur la diversité des interventions des acides gras sur la voie de signalisation de la vitamine A. Ainsi, l'ARA ou l'acide linoléique, peuvent inhiber la liaison de ce dernier à la CRABP. La conséquence de ce phénomène pourrait être une perturbation de la biodisponibilité de l'AR dans la cellule (Sani et al., 1987). Signalons également que les FABP, qui appartiennent à la même famille de protéine que les CRABP, sont des protéines de liaison qui transportent des substances lipophiles, telles que les acides gras et l'AR (Schug et al., 2007). Il peut donc y avoir une compétition entre les acides gras et l'AR pour ces protéines de liaison. Enfin, des travaux ont montré que les acides gras exogènes pouvaient modifier la métabolisation du rétinol en AR. Ainsi Drevon et al. (1985) ont mis en évidence que le stockage de la vitamine A sous forme rétinyl esters dans les hépatocytes, est régulé et favorisé par les acides gras.

Plus récemment, le développement des approches moléculaires a conduit à un ensemble de résultats sur les interférences entre les voies de signalisation des acides gras et de l'AR, notamment au niveau nucléaire. Tout d'abord, RXR apparaît comme le partenaire d'hétérodimérisation obligatoire, commun à différentes voies de signalisation, notamment celles des PPAR et des RAR. Ce rôle central du RXR induit donc une

interaction, voire une compétition, entre les différentes voies de signalisation (Chawla et al., 2001). En plus, l'acide 9-*cis* rétinolique et les acides gras, tels que l'ARA et le DHA, sont tous des ligands endogènes de ce récepteur nucléaire (*cf. I.3.3.1.*). D'autre part, il a également été mis en évidence *in vitro* que l'AR liait et activait PPAR δ , récepteur des acides gras (Shaw et al., 2003). Ainsi, en fonction des quantités relatives des protéines cytosoliques de transport CRABP et FABP, l'AR activerait préférentiellement les RAR ou les PPAR et leurs gènes cibles respectifs (Schug et al., 2007). Pour exemple, une diminution du ratio CRABP-II/E-FABP dans des cellules MCF-7 (tumeur mammaire), inhibe l'activation transcriptionnelle du RAR par l'AR (Schug et al., 2007). Les protéines de liaison, CRABP et FABP, semblent donc jouer un rôle clef dans l'activation des voies de signalisation des PPAR et des RAR. La *figure 18* donne une représentation schématique de la complexité et des interactions entre les voies de signalisation. Enfin signalons que de récents travaux réalisés au laboratoire, ont montré qu'un apport en acide gras (« high fat diet ») pouvait modifier l'équilibre entre les voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras, en modulant l'expression des récepteurs nucléaires RXR, RAR et PPAR dans le striatum ainsi que leurs gènes cibles (Buaud et al., 2010). Une revue suggère également l'importance de l'équilibre entre ces deux voies de signalisation dans la prévention de troubles neurologiques (van Neerven et al., 2008).

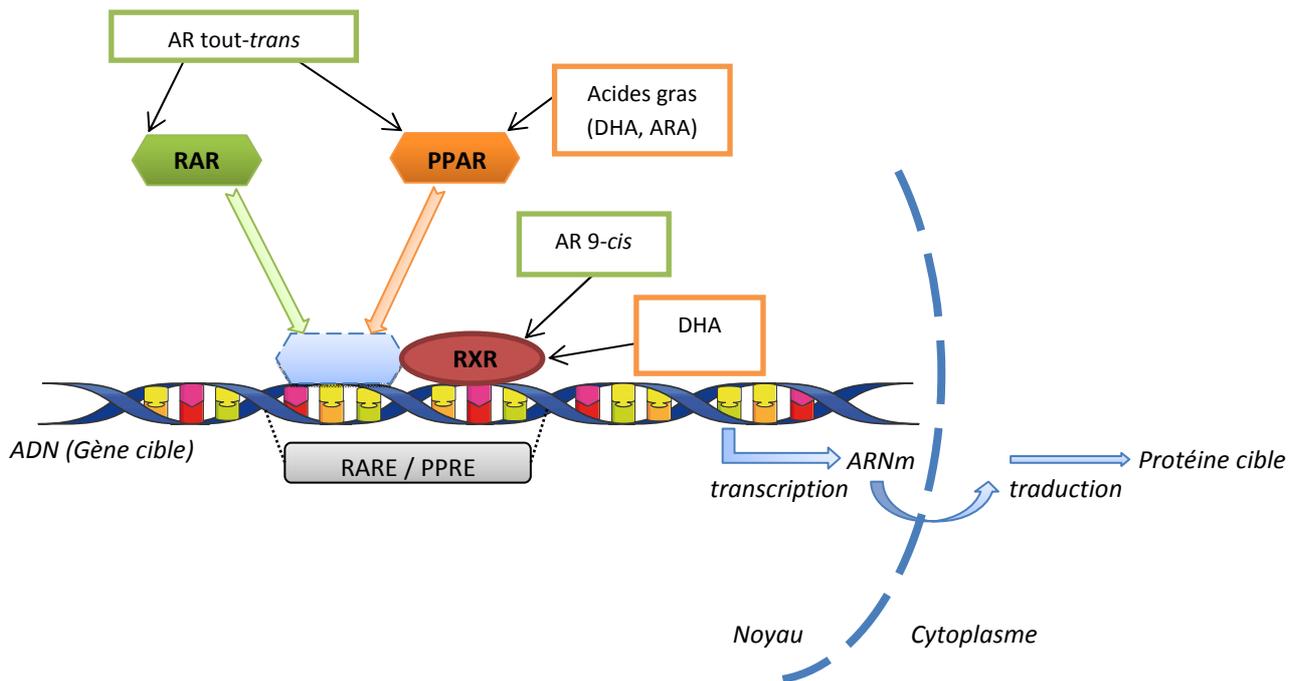


Figure 18 : Représentation schématique des interactions entre les voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras.

AR tout-trans : acide tout-trans rétinolique ; AR 9-cis : acide 9-cis rétinolique ; ARA : acide arachidonique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor ; RAR : rétinoïc acid receptor ; RXR : retinoid X receptor ; PPRE : peroxysome proliferator response element ; RARE : rétinoïc acid response element.

IV. LE VIEILLISSEMENT CEREBRAL

Le vieillissement est un phénomène planétaire et la population des plus de 60 ans est celle qui augmente le plus vite. Les scénarios démographiques estiment que le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus dans le monde sera multiplié par trois d'ici 2050, ce qui représentera 2 milliards de personnes contre 650 millions actuellement. En France, la proportion de personnes de 65 ans et plus, qui était de 16,5 % en 2004, passera à 21 % en 2020 et 28 % en 2040. Ainsi, le vieillissement reflète une amélioration de la santé et des conditions socio-économiques, mais il s'accompagne aussi de difficultés particulières auxquelles tous les pays devront faire face.

Ces observations contribuent au développement de nouvelles perspectives de recherche concernant les mécanismes du vieillissement, parmi lesquelles figurent le vieillissement cérébral et l'identification des altérations neurobiologiques responsables des dysfonctionnements mnésiques.

IV.1. Données générales sur le vieillissement cérébral

Tout d'abord, il paraît nécessaire de donner une définition du terme « vieillissement ». Il a été proposé que le vieillissement soit défini comme « la somme de modifications (altérations) anatomiques, histologiques et physiologiques, survenues au cours du temps, au sein des différents types cellulaires, dans différents organes et systèmes » (Forette et al., 1996). Le vieillissement est généralement caractérisé par (i) des changements dans la composition biochimique des tissus ; (ii) une diminution progressive des capacités physiologiques ; (iii) une perte régulière de la capacité d'adaptation de l'organisme aux conditions variables de l'environnement et (iv) une augmentation des prédispositions aux maladies et à la mort (Troen, 2003).

De nombreuses théories ont été élaborées pour tenter d'élucider les mécanismes du vieillissement. Parmi elles, on peut citer les théories évolutionnistes, descriptives,

génétiques et environnementales. Les théories évolutionnistes étudient la longévité des différentes espèces animales en comparant leur manière de vieillir et en étudiant les altérations biologiques de l'organisme intervenues en fonction de l'âge. Les théories descriptives quant à elles proposent que l'usure (« wear and tear ») de différents tissus et organes soit la responsable universelle du vieillissement. Les théories génétiques impliquent qu'il existe un mécanisme de régulation génétique programmé dans le processus de vieillissement. Enfin, les théories environnementales sont basées sur l'étude de facteurs externes ou internes qui endommagent les cellules, désorganisent les tissus et induisent le vieillissement. Prises ensembles, ces théories expliquent la plupart des phénomènes liés au vieillissement (Gavrilov and Gavrilova, 2001 ; Jansen-Dürr and Osiewacz, 2002 ; Partidge and Gems, 2002).

Chez les personnes âgées, les altérations neurobiologiques ont depuis longtemps été considérées comme un élément majeur du vieillissement. Le cerveau occupe donc une place essentielle dans la recherche actuelle sur le vieillissement, et l'identification de ses altérations neurobiologiques responsables des dysfonctionnements mnésiques, constitue l'un des objectifs majeurs de ces recherches. Le vieillissement cérébral peut être étudié à différents niveaux d'organisation. A un niveau systémique, le vieillissement se manifeste par une diminution des facultés d'adaptation, une baisse des capacités mnésiques, etc. (Erickson and Barnes, 2003). A un niveau anatomiques, on peut observer une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire ; ces modifications sont souvent hétérogènes selon les individus (Sullivan et al., 2001). Les altérations cérébrales majeures sont en partie dues à des changements morphologiques au niveau des neurones, tels qu'une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, une diminution de la longueur et du nombre d'épines dendritiques, une baisse de l'expression des récepteurs NMDA et AMPA, etc. (Dickstein et al., 2007). Ces modifications morphologiques se traduisent par des altérations de la plasticité cérébrale et s'accompagnent d'une perte des fonctions cognitives. Précisons que les études menées au cours de cette thèse ont porté essentiellement sur une structure cérébrale particulièrement impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire spatiale : l'hippocampe.

IV.2. Vieillesse cérébrale : rôle central de l'hippocampe dans les processus mnésiques et la plasticité cérébrale

IV.2.1. Processus mnésiques

Il est généralement admis que chez l'animal âgé, les principaux déficits mesurés portent sur des formes de mémoires dites « hippocampo-dépendantes », principalement la mémoire spatiale. Des données expérimentales rapportent que les déficits mnésiques liés au vieillissement sont étroitement identiques à ceux induits par des lésions hippocampiques, notamment les déficits d'apprentissage spatial (Murray et al., 1998 ; Stoelzel et al., 2002). Chez le rat, de nombreuses études ont montré des déficits cognitifs liés à l'âge dans différentes tâches permettant d'évaluer la mémoire spatiale (Rosenzweig et al., 2003), en particulier des tâches réalisées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Drapeau et al., 2003 ; Wang et al., 2006 ; Drapeau et al., 2007). Par ailleurs, des études complémentaires montrent que les animaux âgés présentent de manière spécifique des déficits de mémoire relationnelle, équivalente à la mémoire déclarative chez l'Homme (Etchamendy et al., 2001 ; Magnusson et al., 2003 ; Touzani et al., 2003).

IV.2.2. Plasticité cérébrale

Le dogme illustré par la phrase de Ramon y Cajal au début du siècle dernier : « une fois le développement terminé, tout peut mourir, rien ne peut se régénérer », a été remis en question avec l'arrivée du concept de plasticité cérébrale (Duffau, 2006). En effet ce n'est que depuis quelques décennies, qu'il est connu que le SNC est doté d'une remarquable plasticité. Ainsi, les neurones sont capables de régénérer après des lésions cérébrales (Raisman, 1969) et de modifier leur structure en réponse aux changements de l'environnement (Greenough et al., 1978). Cependant, la découverte chez les mammifères et chez l'Homme que le SNC adulte est le siège d'une nouvelle forme de plasticité consistant en la création de nouveaux neurones, suspectée il y a quarante ans, a définitivement remis en cause le dogme de l'immuabilité des éléments du SNC (Altman,

1962 ; Eriksson et al., 1998 ; Gross, 2000). Le concept de neurogenèse chez l'adulte est alors apparu.

IV.2.2.1. Plasticité synaptique

Les études menées chez l'Homme comme chez l'animal suggèrent que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une réorganisation neuronale principalement dans le cortex préfrontal et la région hippocampique (Burke and Barnes, 2006). Ainsi, il a été montré que le vieillissement entraîne des déficits de PLT, corrélés avec des déficits mnésiques observés dans des tâches évaluant la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes, 2003).

Certaines études ont montré que des changements structuraux au niveau de l'hippocampe impliquant des pertes synaptiques associés à des modifications de concentrations de certains marqueurs synaptiques, sont à l'origine des altérations de plasticité synaptique observées au cours du vieillissement et contribuent à l'apparition des déficits de PLT et des déficits cognitifs (Selkoe, 2002 ; Salehi et al., 2003 ; Coleman, 2005 ; Burke and Barnes, 2006 ; Burke and Barnes, 2010). En effet, une diminution d'environ 30 % du nombre de synapses chez des rats âgés a été observée dans le gyrus dentelé, diminution concomitante à une baisse des performances de mémoire spatiale (Bondareff et Geinisman, 1976 ; Geinisman et al., 1977 ; Geinisman et al., 1986 ; Geinisman et al., 1992). De plus, une diminution du nombre d'épines dendritiques et de leur longueur a été observée dans les neurones du gyrus dentelé, associée à des déficits cognitifs hippocampo-dépendants (von Bohlen und Halbach et al., 2006). Signalons que les propriétés neuronales et la plasticité synaptique dépendent étroitement des échanges ioniques entre les compartiments intra et extra cellulaires. Les altérations de ces échanges au cours du vieillissement participeraient à la mise en place des atteintes fonctionnelles. Ainsi une augmentation de la conductance du Ca^{2+} a été mesurée au niveau des neurones d'animaux âgés conduisant à des modifications de l'homéostasie calcique et par conséquence à des altérations de plasticité synaptique (Landfield, 1988 ; Thibault and Landfield, 1996 ; Foster and Norris, 1997 ; Rosenzweig and Barnes, 2003 ; Toescu et al., 2004). D'autre part, certaines protéines synaptiques ont été particulièrement étudiées chez

l'animal âgé, telles que les récepteurs NMDA (Magnusson et al., 2007 ; Topic et al., 2007), la synaptophysine, la synaptotagmine, la neurogranine (RC3) ou encore la neuromoduline (GAP-43). Ainsi une diminution d'expression de RC3 et GAP-43 a été observée au cours du vieillissement (Casoli et al., 2001 ; Etchamendy et al., 2001 ; Feart et al., 2005a ; Boucheron et al., 2006) ; cette diminution de RC3 étant associée à des déficits de PLT et de mémoire spatiale (Etchamendy et al., 2001). Cette dernière étude a également montré que l'expression de RC3, impliquée dans les processus synaptiques (Fedorov et al., 1995 ; Huang et al., 2004), serait contrôlée par les rétinoïdes au cours du vieillissement lui conférant ainsi un rôle important dans les processus de plasticité. De plus, il a récemment été mis en évidence que des animaux RC3 -/- présentaient des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale ainsi que des déficits de PLT (Huang et al., 2006 ; Huang et al., 2007). Enfin, l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique lors de tâches comportementales hippocampo-dépendantes paraissent altérées au cours du vieillissement. Ces déficits concernent à la fois les voies glutamatergiques et cholinergiques qui représentent les principaux systèmes excitateurs dans la communication neuronale hippocampique. En effet, la dégénérescence des neurones cholinergiques joue un rôle important au cours du vieillissement et dans certaines pathologies telles que la maladie d'Alzheimer. Il a ainsi été démontré que les animaux âgés présentent des déficits mnésiques concomitants à une dégénérescence des neurones cholinergiques et une perturbation de la voie de signalisation du Nerve Growth Factor (NGF), impliquée dans la survie de ces neurones (Williams et al., 2006).

Les altérations de plasticité synaptique observées au cours du vieillissement, contribueraient donc à l'apparition des déficits cognitifs. En particulier l'hippocampe semble être une cible précoce des changements cérébraux relatifs au vieillissement.

IV.2.2.2. Neurogenèse

✧ Définition :

Les premières études démontrant l'existence d'une neurogenèse dite secondaire, c'est-à-dire la production de nouveaux neurones dans le cerveau adulte (par opposition à

la neurogenèse primaire qui se déroule au cours du développement et participe à la mise en place de la structure), ont été publiées dans les années 60 par J. Altman (Altman, 1962). Le terme de neurogenèse désigne ainsi l'ensemble des processus qui conduisent à l'intégration fonctionnelle de néo-neurones dans les circuits cérébraux.

✧ Les sites neurogéniques :

Chez les mammifères, la neurogenèse persiste à l'âge adulte dans deux régions principales du SNC, appelées sites neurogéniques, ou encore niches ou foyers neurogéniques. L'une de ces deux régions est le complexe ZSV-RMS-BO : les nouvelles cellules sont produites dans la zone sous ventriculaire (ZSV) puis empruntent le courant de migration rostral (rostral migratory stream, RMS) pour se diriger vers le bulbe olfactif (BO) où elles vont être intégrées dans les circuits préexistants. La seconde région neurogénique est le gyrus dentelé (GD) de la formation hippocampique (Kempermann and Gage, 2000). Il paraît intéressant de noter que les deux sites neurogéniques chez l'adulte présentent plusieurs points communs. En effet, le BO et la région hippocampique sont deux régions cérébrales dont le développement débute lors de la période prénatale, puis se poursuit lors de la période postnatale. De plus, ces deux structures sont composées de « cellules à grain » ou neurones granulaires caractérisés par un noyau proéminent. Enfin, ces deux régions sont fortement impliquées dans le traitement des informations liées aux processus d'apprentissage et de mémorisation. Ce constat suggère que les néo-neurones granulaires produits à l'âge adulte dans ces deux régions sont impliqués dans les fonctions mnésiques. Par ailleurs, il est intéressant de préciser que la production de néo-neurones a été rapportée dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex (Gould et al., 2001), l'amygdale (Bernier et al., 2002), la substance noire (Zhao et al., 2003), l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005) et le noyau caudé (Luzzati et al., 2006), mais ces données restent encore aujourd'hui sujet à controverse.

Précisons que le travail de cette thèse s'est intéressé à un site neurogénique en particulier : l'hippocampe.

✧ La neurogenèse hippocampique :

Sur la base de données obtenues *in vitro* et au cours du développement, deux types de cellules semblent être capables de se diviser. La cellule souche est une cellule indifférenciée, capable de proliférer et de se renouveler en donnant naissance par division asymétrique à une cellule souche identique à elle-même et à une cellule fille plus spécialisée, pouvant elle-même donner naissance à différents types cellulaires. Par contre, les cellules progénitrices n'auraient pas la capacité de s'auto-renouveler mais pourraient tout de même proliférer et donner naissance à des cellules différenciées par division symétrique. *In vivo*, chez l'adulte il est actuellement difficile de différencier les cellules souches des cellules progénitrices (Geuna et al., 2001), le terme de précurseur est alors utilisé pour caractériser ces deux types cellulaires.

La neurogenèse hippocampique du cerveau adulte prend son origine dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé (GD). Elle se déroule en trois étapes. Brièvement, les cellules se divisent à plusieurs reprises, au moins pendant les quatre jours qui suivent leur naissance. A l'issue de la prolifération, environ 40 % des cellules survivent, migrent ensuite de façon tangentielle vers la couche granulaire où elles vont se différencier pour s'insérer dans le réseau pré-existant (Cameron et al., 1993 ; Dayer et al., 2003) (*figure 19*). Il est estimé que les cellules formées chaque jour dans le GD représentent moins de 1% de la population totale des cellules granulaires (Cameron and McKay, 2001 ; Rao and Shetty, 2004). De plus, seule une faible proportion des néo-neurones produits quotidiennement survit sur le long terme. Plus de 50 % des cellules néo-formées vont périr au cours des deux premières semaines de leur vie (Cameron et al., 1993 ; Gould et al., 1999a ; Dayer et al., 2003). Par contre, celles qui survivent restent stables pendant plusieurs mois (8 à 10 mois) (Dayer et al., 2003 ; Kempermann et al., 2003) et deviennent majoritairement des neurones granulaires probablement glutamatergiques, une faible proportion se différencierait en neurones GABAergiques (Liu et al., 2003), en astrocytes ou en microglie (Cameron et al., 1993 ; Steiner et al., 2004).

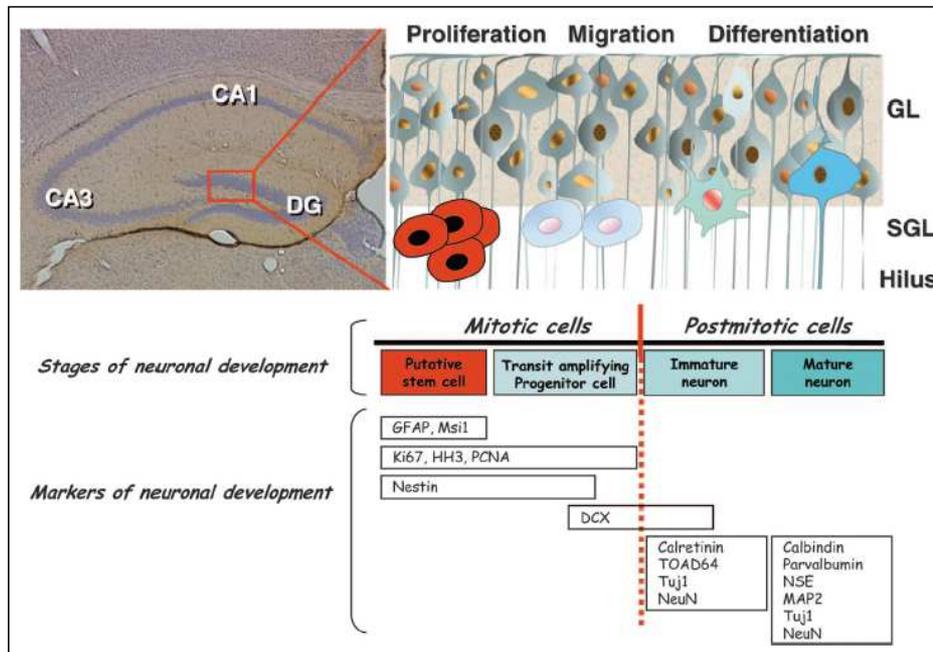


Figure 19 : Etapes de la neurogenèse dans la formation hippocampique.

Source : Abrous et al., (2005)

Tableau 12 : Facteurs régulant la neurogenèse.

Source : Abrous et al., (2005)

Factors	Subventricular Zone/Olfactory Bulb			Dentate Gyrus				
	Cell proliferation	Neurogenesis	Neuronal differentiation	Long-term survival	Cell proliferation	Neurogenesis	Neuronal differentiation	Long-term survival
<i>Hormones and peptides</i>								
Corticosterone								
Suppression (adx)	0				↗	↗	0	0
Cort. treatment					↘	↘	0	
Estradiol								
Estrus cycle	0				↗proE	0		↘
OVX	0				↘			
OVX + acute 17β-E	↗				↗ then ↘		0	
OVX + chronic 17β-E					0	0	0	
17β-E					↗ (4h)			
Prolactin	↗	↗			0			
PACAP	↗				↗			
<i>Neurosteroids</i>								
DHEA					↗	↗	0	0
PregS	↗				↗	↗		
Allopreg					↘			
<i>Neurotransmitters</i>								
Glutamate								
Ent. Cx. lesion					↗			
NMDA activation					↘			
NMDA blockade					↗	↗		
AMPA potentiation					↗			
mGluR II blockade					↗			
Serotonin								
5-HT depletion	↘				↘			
Lesion + graft					↗			
Reuptake inhibition	0				↗	↗	0	0
5-HT _{1A} blockade					↘			
5-HT _{1A} activation	↗	↗	0		↗	↗	0	
5-HT _{1B} blockade	↗				0			
5-HT _{1B} activation	↗				0			
5-HT _{2A/2c} blockade	0				↘			
5-HT _{2A/2c} activation	↗				0			
5-HT _{2c} blockade	0				0			
5-HT _{2c} activation	↗	↗	0		0	0		
Norepinephrine								
Depletion	0				↘	↘	0	0
Reuptake inhibition					↗			
No donor	↗				↗	↗		
<i>Growth or trophic factors</i>								
bFGF	↗	↗	↗		0	0	0	
EGF	↗	↘	↘		0	↘	↘	
HB-EGF	↗	↗	0		↗	↗		
TGF-α	↗							
IGF-I					↗	↗ (ovx)	0 or ↗ (hpx)	0
BDNF	↗	↗	0					
CNTF	↗				↗	↗	↗	
VEGF	↗				↗			
<i>Morphogenic factors</i>								
Shh					↗	↗	0	0
BMP	↘	↘	↘					
Noggin	↗	↗	↗					
<i>Vitamins and retinoids</i>								
Vitamin E								
Deficiency					↗			↘
Supplementation (tocopherol)					↘	↗		↗
Retinoic acid (chronic treatment)	↘				↘	↘	↘	↘

◇ Régulation de la neurogenèse hippocampique adultes :

La neurogenèse hippocampique adulte est contrôlée par de nombreux facteurs, intrinsèques ou extrinsèques, dont les effets sont à l'heure actuelle bien documentés (Hagg, 2005 ; Lledo et al., 2006 ; Balu and Lucki, 2009). Parmi les facteurs extrinsèques, un environnement enrichi¹ (Kempermann et al., 2002), l'activité physique (van Praag et al., 2005), le stress (Dranovsky and Hen, 2006) ou encore la restriction calorique (Qiu et al., 2010) régulent la neurogenèse hippocampique adulte. Parmi les facteurs intrinsèques, figurent certaines hormones (les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes ou encore les hormones sexuelles), certains neurotransmetteurs, et certains facteurs neurotrophiques (*tableau 12*).

Dans le cadre de cette thèse, une attention particulière a été portée aux neurotrophines. Les neurotrophines peuvent se fixer sur deux types de récepteurs de surface, les Trk (tropomyosin-related kinase) de haute affinité et le récepteur p75 (p75^{NTR}) de faible affinité (Metsis, 2001 ; Roux and Barker, 2002 ; Reichardt, 2006). De nombreux travaux menés notamment *in vitro* montrent que l'activation de la voie de signalisation des récepteurs Trk, permet la survie et la différenciation de certaines populations neuronales (Huang and Reichardt, 2001 ; Huang and Reichardt, 2003 ; Lu et al., 2005). Aujourd'hui aucun doute ne subsiste sur la présence des neurotrophines NGF et BDNF ainsi que de leur récepteur au niveau de l'hippocampe (Conner et al., 1992 ; Cellerino, 1996 ; Rocamora et al., 1996 ; Conner et al., 1997 ; Yan et al., 1997 ; Pascual et al., 1998 ; Dubus et al., 2000), suggérant leurs rôles dans la neurogenèse hippocampique adulte. Ainsi des auteurs ont montré qu'une injection intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de NGF ne modifie pas le taux de prolifération, mais permet d'augmenter la survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte (Frielingsdorf et al., 2007). D'autre part, l'augmentation de BDNF suite à une restriction alimentaire ou à un traitement pharmacologique, entraîne une augmentation de la neurogenèse hippocampique (Lee et al., 2000 ; Katoh-Semba et al., 2002 ; Lee et al., 2002). En plus, il a été mis en évidence chez des souris BDNF +/-,

¹ Un environnement enrichi consiste à placer des rongeurs dans des conditions d'élevage se rapprochant des conditions de vie dans le milieu naturel, pour ce qui concerne les stimulations sensorielles, les interactions sociales et les activités physiques et cognitives.

une diminution du nombre de néo-neurones dans le GD (Linnarsson et al., 2000 ; Lee et al., 2002 ; Sairanen et al., 2005).

✧ Neurogenèse hippocampique et mémoire spatiale :

Il est aujourd'hui proposé que la production de nouveaux neurones granulaires au stade adulte représente une nouvelle forme de plasticité cérébrale impliquée dans les fonctions mnésiques (Schinder and Gage, 2004 ; Snyder et al., 2005 ; Aimone et al., 2006 ; Leuner et al., 2006 ; Kitabatake et al., 2007 ; Drapeau and Abrous, 2008 ; Deng et al., 2010). En s'intégrant dans le réseau pré-existant, les neurones nouvellement formés contribuent aux processus de mémorisation hippocampo-dépendants (Dobrossy et al., 2003 ; Dupret et al., 2008). En effet, ces nouveaux neurones, bien qu'en faible nombre, présentent des propriétés électrophysiologiques bien distinctes, et la PLT peut être induite assez facilement (Schmidt-Hieber et al., 2004 ; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006). Cependant, il faut plusieurs mois pour que ces neurones acquièrent une morphologie identique aux cellules granulaires déjà présentes et soient intégrés de façon fonctionnelle dans le circuit hippocampique (Ramirez-Amaya et al., 2006 ; Zhao et al., 2006). De nombreux travaux suggèrent alors qu'une amélioration des performances dans des tâches dépendantes de l'hippocampe résulterait d'une augmentation de la neurogenèse hippocampique. Des auteurs ont ainsi montré que l'élevage de rats ou de souris dans un environnement enrichi, entraîne une augmentation de la neurogenèse hippocampique et s'accompagne d'une augmentation des performances de mémoire spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris (Kempermann et al., 1997 ; Kempermann et al., 1998 ; Nilsson et al., 1999).

D'autre part, l'apprentissage spatial est aussi capable d'influencer la neurogenèse mais les résultats restent encore assez controversés. Ainsi, alors que certains auteurs montrent une augmentation de la prolifération cellulaire après une épreuve de mémoire spatiale de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris (Lemaire et al., 2000 ; Dobrossy et al., 2003), d'autres montrent une diminution (Namestkova et al., 2005) ou une absence d'effet (Mohapel et al., 2006). De plus, il semblerait que la mémoire spatiale de travail quant à elle, entraîne une diminution du niveau de prolifération cellulaire

(Mohapel et al., 2006). Le type de mémoire testé semble donc moduler différemment le niveau de neurogenèse. Concernant la survie cellulaire, certains auteurs rapportent que l'apprentissage la stimule (Gould et al., 1999a ; Ambrogini et al., 2000 ; Leuner et al., 2004), ou au contraire la diminue (Dobrossy et al., 2003 ; Ambrogini et al., 2004) ou reste sans effet (Van der Borght et al., 2005). Enfin récemment, il a été mis en évidence que le niveau de difficulté du protocole utilisé en piscine de Morris (nombre d'essais par session, nombre d'indice) avait un impact sur les modifications du niveau de survie cellulaire. Les auteurs ont ainsi montré qu'un niveau de difficulté faible induisait une augmentation de survie cellulaire, tandis qu'un niveau de difficulté élevé provoquait une diminution de ces mêmes cellules (Epp et al., 2009).

✧ Neurogenèse hippocampique au cours du vieillissement cérébral :

Bien que la neurogenèse hippocampique persiste au cours du vieillissement, une diminution importante de la production de nouveaux neurones a été mise en évidence dans le GD de ces animaux. Par conséquent, le déclin de neurogenèse observé chez les animaux âgés pourrait être à l'origine du déclin des fonctions cognitives. Cependant, la relation potentielle entre certaines étapes de la neurogenèse et les performances mnésiques des animaux âgés restent à préciser. Un déclin de neurogenèse hippocampique a été associé à des déficits cognitifs lors d'une épreuve spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris au cours du vieillissement (Kempermann et al., 1998 ; Driscoll et al., 2006). De plus, il a été montré que la neurogenèse est altérée dans des modèles de vieillissement pathologique tels que le stress prénatal qui accélère l'apparition des déficits cognitifs au cours du vieillissement (Vallee et al., 1999) et diminue la neurogenèse hippocampique (Lemaire et al., 2000). Enfin, des résultats récents suggèrent l'existence d'une relation quantitative entre le nombre de neurones nouvellement formés et les performances spatiales au cours du vieillissement. Ainsi, les animaux âgés qui présentent de bonnes performances dans le labyrinthe aquatique présentent aussi le plus grand nombre de neurones néo-formés (Drapeau et al., 2003). Signalons cependant que ces résultats restent controversés. En effet, d'autres études ne révèlent aucun lien entre neurogenèse et capacités mnésiques au cours du vieillissement (Bizon and Gallagher,

2003 ; Merrill et al., 2003), ou indiquent même des corrélations négatives entre le niveau de survie cellulaire et les capacités mnésiques des animaux âgés (Bizon et al., 2004). En conséquence, le lien précis existant entre les processus de neurogenèse et les capacités mnésiques chez le sujet âgé reste encore à élucider.

Actuellement, une partie des recherches sur le vieillissement cérébral vise à restaurer ces processus de neurogenèse afin d'obtenir un niveau de neurogenèse identique à celui des jeunes animaux, qui conduirait alors à une amélioration des performances mnésiques chez les animaux âgés. C'est dans cet objectif que s'inscrit une grande partie de ce travail de thèse. Ainsi, à titre d'exemple, l'élevage d'animaux âgés dans un environnement enrichi s'accompagne non seulement d'une augmentation du nombre de nouveaux neurones en favorisant le processus de différenciation mais améliore également les performances des animaux dans le labyrinthe aquatique (Kempermann et al., 2002 ; Harburger et al., 2007).

IV.3. Vitamine A et vieillissement cérébral

IV.3.1. Conséquences du vieillissement aux niveaux métaboliques et nucléaires

IV.3.1.1. Au niveau métabolique

Les données générales concernant les conséquences du vieillissement sur le métabolisme des nutriments (Russell, 2000), et en particulier de la vitamine A sont à ce jour plus descriptives qu'explicatives. Globalement, les études montrent une perturbation du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement, et ce malgré un stock hépatique de rétinol important chez les sujets âgés (Sundboom and Olson, 1984 ; Dawson et al., 2000 ; van der Loo et al., 2004). Cette augmentation des réserves hépatiques traduirait des perturbations métaboliques (Hollander and Dadufalza, 1990) qui expliqueraient aussi la hausse du rétinol sérique observée chez les personnes âgées après un repas (Borel et al., 1998). Les données concernant les taux de rétinol plasmatique ne sont pas cohérentes. Pour certains auteurs, les concentrations en rétinol sérique varient

peu avec l'âge (Comstock et al., 1988 ; Mino et al., 1993 ; Hallfrisch et al., 1994 ; Dawson et al., 2000 ; Feart et al., 2005b), pour d'autres elles diminuent (van der Loo et al., 2004) ou au contraire augmentent au cours du vieillissement (Johnson et al., 1992 ; Hercberg et al., 1994 ; Borel et al., 1998). Par ailleurs, l'activité de certaines enzymes du métabolisme du rétinol est modifiée (Mobarhan et al., 1991 ; Dawson et al., 2000 ; Yamamoto et al., 2000) et le transport post-prandial de la vitamine A, des intestins vers le foie est retardé (Borel et al., 1998). Enfin, les capacités du sujet âgé à mobiliser ses réserves hépatiques de rétinol pour son utilisation efficace sont également fortement perturbées (Azais-Braesco et al., 1995).

IV.3.1.2. Au niveau nucléaire

Les troubles métaboliques de la vitamine A au cours du vieillissement se traduisent par une biodisponibilité réduite en AR entraînant une baisse du niveau d'activité de sa voie de signalisation. Ainsi, une baisse de l'expression de certains récepteurs nucléaires (RAR, RXR) est observée dans le foie (Pallet et al., 1997), et dans le cerveau d'animaux âgés (Enderlin et al., 1997a ; Enderlin et al., 1997b ; Etchamendy et al., 2001 ; Feart et al., 2005a ; Dyll et al., 2010) et plus particulièrement dans l'hippocampe (Etchamendy et al., 2001 ; Dyll et al., 2010). L'administration d'AR permet de rétablir un niveau d'expression des récepteurs nucléaires comparable à celui mesuré chez des animaux jeunes (Enderlin et al., 1997b ; Etchamendy et al., 2001 ; Feart et al., 2005a), et cette normalisation peut être bloquée par la co-administration d'un antagoniste des récepteurs RAR (Etchamendy et al., 2001). Par ailleurs, une étude menée sur les effets de l'âge chez l'Homme, a permis de démontrer une diminution significative des RAR γ dans les cellules mononucléées du sang (PBMC pour Human Peripheral Blood Mononuclear Cells) (Feart et al., 2005b).

IV.3.2. Vitamine A et processus cognitifs au cours du vieillissement

Une collaboration entre l'Unité de Nutrition et Neurosciences et le Centre des Neurosciences Intégratives et Cognitives a permis de démontrer la relation entre une

baisse du niveau d'activité hippocampique de la voie d'action des rétinoïdes et une altération des performances mnésiques chez l'animal âgé. Les données les plus originales montrent qu'un traitement par l'AR chez ces animaux âgés supprime de façon sélective les déficits cognitifs observés dans un test de mémoire relationnelle (Etchamendy et al., 2001). Récemment, Mingaud et al. (2008) ont également mis en évidence une amélioration de la mémoire de travail à court terme chez des souris âgées ayant reçu une supplémentation vitaminique A tout au long de leur vie.

Il serait donc possible d'envisager que certaines atteintes de la mémoire survenant avec l'âge appartiennent à une catégorie de modifications fonctionnelles générées par une baisse de l'expression des récepteurs nucléaires, associées au vieillissement non pathologique, et susceptibles d'être reversées.

IV.3.3. Vitamine A et plasticité cérébrale au cours du vieillissement

Des travaux réalisés dans notre laboratoire, chez la souris âgée, rapportent qu'une baisse de l'amplitude de la PLT, induite dans le champ CA1 de l'hippocampe par stimulation téтанisante de la voie commissurale, pouvait être partiellement compensée par un traitement par l'AR (Etchamendy et al., 2001).

La diminution d'expression de certains gènes régulés par les rétinoïdes et impliqués dans la plasticité synaptique pourrait expliquer en partie les altérations de plasticité qui sous-tendent les déficits mnésiques liés à l'âge. Parmi ces gènes cibles figurent de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus de plasticité synaptique telles que RC3 et GAP-43. Ainsi, une baisse du niveau d'expression de GAP-43 a été mise en évidence dans le cerveau entier, chez le rat âgé (Casoli et al., 2001 ; Feart et al., 2005a) ainsi que chez des souris âgées (Boucheron et al., 2006), mais également dans l'hippocampe (Mingaud et al., 2008). Une diminution de l'expression de RC3 a également été observée dans le cerveau entier ou l'hippocampe d'animaux âgés (Enderlin et al., 1997b ; Etchamendy et al., 2001 ; Feart et al., 2005a). Par ailleurs, un traitement de ces animaux par l'AR ou bien une supplémentation vitaminique A provoque, une

augmentation de l'expression de GAP-43 au niveau du cerveau entier (Feart et al., 2005a) et de l'hippocampe (Mingaud et al., 2008), mais également une augmentation de RC3 dans l'hippocampe, associée à une restauration de la PLT et des capacités mnésiques (Etchamendy et al., 2001).

Ainsi, plusieurs données bibliographiques plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'AR joue un rôle important au cours du vieillissement dans les processus cognitifs, en modulant certains aspects de la plasticité cérébrale au niveau de l'hippocampe parmi lesquels figure la plasticité synaptique. Signalons qu'actuellement aucune donnée n'est disponible concernant le rôle de l'AR dans les processus de neurogenèse au cours du vieillissement. Cependant, des études menées sur des modèles animaux conduisant à une hypoactivité de la voie des rétinoïdes (animaux carencés en vitamine A), comparable à celle qui préexiste chez l'animal âgé, ont permis de mettre en évidence un rôle de l'AR dans les processus de neurogenèse (Bonnet et al., 2008) (*cf. II.2.2.1.*).

IV.4. Acides gras polyinsaturés et vieillissement cérébral

IV.4.1. Diminution du contenu en AGPI dans les membranes cérébrales au cours du vieillissement

Il existe de nombreuses données attestant de l'effet de l'âge sur le contenu en lipides et la composition en acides gras des phospholipides des membranes cérébrales. Ainsi, Sodergerg et al. (1991) ont mis en évidence une baisse des teneurs en PC et PE, chez des sujets âgés de 89 à 92 ans (par comparaison avec des sujets âgés de 33 à 36 ans) dans certaines régions cérébrales, tel que l'hippocampe (- 26 % en moyenne pour la PC et la PE, dans cette dernière structure). En plus, d'autres auteurs ont montré une augmentation des concentrations en DHA et AGMI jusqu'à l'âge de 18 ans ; puis une diminution des niveaux d'AGPI au cours du vieillissement, en particulier l'ARA et le DHA (Carver et al., 2001). Une baisse du contenu en AGPI n-3, et notamment en DHA,

au sein de l'hippocampe de sujets atteints de la MA, par comparaison avec des sujets sains du même âge, a également été observée (Soderberg et al., 1991). En plus, il a été mis en évidence chez de tels sujets une baisse du contenu en phospholipides totaux proche de 20 % au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe due à la diminution des teneurs en PE et en PC (Guan et al., 1999).

Chez l'animal, les données sont plus nombreuses. Concernant la composition membranaire en cholestérol et en phospholipides totaux, Zhang et al. (1996) ont mis en évidence des variations de leurs teneurs respectives, en fonction de l'âge et de la région étudiée. Ainsi, il s'avère qu'entre le 1^{er} et le 24^{ème} mois de vie, le striatum, l'hippocampe et le cortex cérébral voient leur contenu en cholestérol augmenter (+ 30 %, + 17 % et + 44 %, respectivement). Parallèlement, les teneurs membranaires en phospholipides totaux de ces mêmes régions varient peu (+ 11 % dans l'hippocampe). D'autres auteurs se sont également intéressés aux contenus en cholestérol et en phospholipides, *via* la mesure du ratio cholestérol/phospholipide, qui est généralement utilisé comme marqueur des propriétés physiques des membranes (un ratio élevé suggérant une rigidité membranaire accrue). Il a ainsi été mis en évidence chez des rats âgés de 28 mois, une augmentation de ce ratio au sein des membranes constitutives de la substance blanche sous-corticale et du cervelet (+ 17 %), comparé à des rats adultes âgés de 4 mois. Cependant, ces données sont en contradiction avec celles de Zhang et al. (1996) qui n'ont pas révélé de modification significative de la valeur de ce ratio chez des rats âgés de 17 mois (*versus* des rats âgés de 1 mois) au sein du cortex cérébral, du striatum, de l'hippocampe et de cervelet.

Parallèlement, il semble que la composition en phospholipides soit altérée sous l'effet de l'âge. En effet il a été mis en évidence, dans l'hippocampe de rats âgés de 24 mois (comparé à des rats âgés de 6 mois), une diminution des teneurs en PE et en PC (- 26 % et - 12 %, respectivement) associée à une augmentation du contenu en PS et PI (multiplié par 9 et 6,7, respectivement).

L'influence de l'âge sur la composition en acides gras des phospholipides membranaires a également fait l'objet d'investigations. Ainsi, dans l'hippocampe de rats âgés de 18 mois (comparés à des rats âgés de 2 mois) des variations importantes de la

composition en acides gras des PE et PS ont été observées, telles qu'une augmentation des AGMI (+ 22 % pour les PE, et 46 % pour les PS) et une baisse des AGPI n-3, en particulier le DHA (- 37 % pour les PE et - 27 % pour les PS) (Favrelière et al., 2003). En plus, d'autres auteurs ont également montré chez des rats âgés de 27 mois (comparés à des rats adultes de 7 mois) une diminution significative du contenu en AGPI n-6 au sein de PS (- 55 %), PC (- 30 %) et PI (- 66 %) concomitamment à une baisse non significative du contenu en AGPI n-3 (Ulmann et al., 2001). Favrelière et al. (2000) ont également observé ce type de variation au niveau de deux structures cérébrales. Ainsi, dans le cortex et l'hippocampe de rats âgés de 18 mois (comparés à des rats âgés de 2 mois) les auteurs ont mis en évidence une diminution du contenu en DHA au sein des PE (- 22 % dans le cortex et - 37 % dans l'hippocampe) et des PS (- 37 % pour le cortex et - 30 % pour l'hippocampe). Finalement, d'autres travaux ont rapporté cette baisse du DHA au sein des PE et des PS dans le cortex et le cervelet de rats, parallèlement à une baisse du contenu en ARA (McGahon et al., 1999 ; Giusto et al., 2002 ; Petursdottir et al., 2007).

A ce niveau, signalons que la diminution du contenu en AGPI-LC membranaires dans le cerveau au cours du vieillissement peut être attribuée à plusieurs mécanismes : (1) un plus faible taux de passage des acides gras à travers la BHE, (2) une diminution des taux d'incorporation membranaire de ces AGPI et (3) une baisse de l'activité des enzymes $\Delta 6$ et $\Delta 9$ désaturases (Yehuda et al., 2002 ; Bourre, 2004). Ainsi, des données ont mis en évidence des changements structuraux au sein de la BHE, au cours du vieillissement et chez des patients atteints de la MA (de la Torre and Mussivand, 1993 ; Ginsberg et al., 1998). Cependant, très peu de données sont disponibles concernant des variations d'efficacité de passage des AGPI à travers la BHE, et les résultats obtenus sont contradictoires, montrant soit une diminution de pénétration de l'ARA (Alberghina et al., 1994), soit aucune modification (Strosznajder et al., 1994 ; Strosznajder et al., 1996). Par contre, il apparaît que les voies de synthèse des phospholipides sont altérées avec l'âge, freinant alors l'incorporation des AGPI-LC au sein des membranes cérébrales (Ilincheta de Boschero et al., 2000). En plus, la conversion des précurseurs LA et ALA en dérivés à longue chaîne devient moins efficace avec l'âge, l'activité des désaturases étant diminuée dans le foie et le cerveau (Bourre and Piciotti, 1992 ; Kumar et al., 1999). D'autres auteurs ont également mis en évidence une diminution de l'oxydation peroxisomale des AGPI au

cours du vieillissement (Bourre and Piciotti, 1997). Ainsi, la baisse d'efficacité de la biosynthèse des AGPI-LC à partir de leurs précurseurs suppose que le contenu en DHA dans le cerveau âgé dépend d'autant plus de l'apport alimentaire en DHA préformé.

IV.4.2. AGPI et processus cognitifs au cours du vieillissement

Plusieurs travaux ont suggéré que la baisse du contenu cérébral en DHA liée à l'âge, était associée à des troubles cognitifs (Horrocks and Farooqui, 2004 ; Su, 2010).

Ainsi, il a été mis en évidence une réduction du contenu en DHA des membranes cérébrales, associée à des déficits d'apprentissage dans le test du labyrinthe aquatique chez des rats âgés de 24 mois, comparés à des rats jeunes âgés de 2 mois (Barcelo-Coblijn et al., 2003a). En plus, d'autres auteurs ont montré que chez des rats âgés de 24 mois, l'administration de DHA (300mg/kg/j, pendant 5 semaines) améliore les performances de mémoire spatiale de référence et de travail, mesurées dans le labyrinthe radial (Gamoh et al., 2001). D'autre part, chez des rats âgés (20-22 mois) une supplémentation en EPA, ou DPA n-3 pendant 8 semaines, permet également une amélioration des capacités d'apprentissage dans le test du labyrinthe aquatique de Morris (Kelly et al., 2010). Enfin des résultats semblables ont également été obtenus chez la souris âgée (Lim and Suzuki, 2000).

Signalons que de nombreuses données suggèrent un rôle des AGPI-LC n-3 dans l'étiologie de la MA (Cunnane et al., 2009 ; Jicha and Markesbery, 2010). Ainsi, sur un modèle animal de la MA (avec infusion du peptide A β), des auteurs ont montré qu'un prétraitement avec du DHA permettait d'atténuer le déclin cognitif et d'augmenter le ratio DHA:ARA dans le cortex et l'hippocampe des rats malades (Hashimoto et al., 2002).

Chez l'Homme, les données épidémiologiques suggèrent que les AGPI n-3 pourraient avoir un rôle protecteur vis-à-vis du déclin des fonctions cognitives qui apparaît au cours du vieillissement et dans certaines situations neuropathologiques telles que la MA. Il a ainsi été montré que la consommation alimentaire et la teneur membranaire érythrocytaire en AGPI n-3 étaient inversement corrélées au déclin cognitif

associé à l'âge (Heude et al., 2003 ; Solfrizzi et al., 2006). De façon similaire, la consommation de gélules d'huile de poisson et le niveau d'AGPI n-3 érythrocytaires ont été associés à de meilleures performances cognitives chez des sujets âgés (Whalley et al., 2004). Chez des patients atteints de la MA, la supplémentation alimentaire en AGPI avec un ratio LA/ALA proche de 4 pendant un mois, améliore la mémoire de travail (Yehuda et al., 1996). Par ailleurs plusieurs études épidémiologiques ont rapporté un lien entre la consommation d'AGPI n-3 et une diminution du risque de démence. C'est le cas notamment de la Rotterdam Study, qui montre que l'incidence de la démence, en particulier celle de type Alzheimer, est réduite chez les sujets consommant régulièrement du poisson (Kalmijn et al., 1997a). Une relation similaire entre une consommation de poisson élevée et une réduction du risque de déclin cognitif a été retrouvée au sein d'un groupe de personnes âgées issues de la cohorte Zutphen Elderly Study (Kalmijn et al., 1997b). Plus récemment, l'étude PAQUID a mis en évidence une corrélation inverse entre la fréquence de consommation de poisson et le risque de développer une démence dans les 7 ans qui suivent (Barberger-Gateau et al., 2002). Les données obtenues lors du Chicago Health and Aging Project confirme cette association puisque là encore la consommation de poisson a été associée à un ralentissement du déclin cognitif et à un risque moindre de développer une démence de type Alzheimer (Morris et al., 2003a ; Morris et al., 2003b ; Morris et al., 2005). De la même manière les résultats de la cohorte des Trois Cités montrent que la consommation hebdomadaire de poisson réduit le risque de maladie d'Alzheimer (Barberger-Gateau et al., 2007). En plus dans le cadre de la Doetinchem Cohort Study, il a également été trouvé une association, entre de meilleures performances cognitives chez des adultes de 45 à 70 ans, et la consommation de poisson ou d'AGPI n-3 à longue chaîne (EPA et DHA) (Kalmijn et al., 2004). Enfin, l'étude EVA a mis en évidence que les consommateurs réguliers de poisson avaient de meilleures performances cognitives globales (Heude et al., 2003).

L'ensemble de ces données atteste de l'implication des AGPI n-3 dans le maintien des fonctions mnésiques au cours du vieillissement cérébral normal ou pathologique. Afin d'expliquer l'effet pro-mnésiques de ces AG, de nombreuses études se sont intéressées à leurs rôles dans les processus de plasticité cérébrale, altérés au cours du vieillissement. Les résultats de ces études sont détaillés dans le paragraphe suivant.

IV.4.3. AGPI et plasticité cérébrale au cours du vieillissement

De nombreuses données attestent du rôle des AGPI n-3 dans les processus de plasticité cérébrale. Si la plupart des recherches sur ce sujet se sont intéressées à la période périnatale et à l'âge adulte en utilisant souvent des modèles de déficience (*cf. II.1.3.2.*), de récents travaux ont examiné l'impact des ces AGPI au cours du vieillissement. Ainsi, des auteurs ont mis en évidence qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 (160 mg/kg/j d'EPA et 110 mg/kg/j de DHA, pendant 12 semaines) permet de reverser la baisse d'expression des sous-unités GLUR2 et NR2B (appartenant respectivement aux récepteurs AMPA et NMDA), dans le cortex, le striatum et l'hippocampe de rats âgés de 24 mois, comparés à des rats adultes âgés de 3-4 mois (Dyall et al., 2007). Précisons que les récepteurs au glutamate jouent des rôles importants dans les phénomènes de PLT, modèle de plasticité synaptique. En plus, chez des rats âgés de 22 mois (comparés à des rats de 4 mois), une diminution du contenu en DHA et une altération de la PLT dans l'hippocampe ont été observées ; ces effets ont été corrigés par une supplémentation en DHA (10 mg/j, pendant 8 semaines) ou en EPA (12 mg/j, pendant 8 semaines) (McGahon et al., 1999 ; Martin et al., 2002). D'autres auteurs ont également montré une augmentation de la neurogenèse hippocampique (différenciation neuronale), altérée au cours du vieillissement, chez des rats âgés de 19-20 mois soumis à une supplémentation en DHA (300 mg/kg/j, pendant 7 semaines) (Kawakita et al., 2006). Enfin tout récemment, Dyall et al. (2010) ont montré qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 (162 mg/kg/j d'EPA + 108 mg/kg/j de DHA, pendant 12 semaines) permet d'augmenter le niveau de neurogenèse (différenciation neuronale précoce) chez des rats âgés de 26 mois, comparés à des rats du même âge soumis à un régime contrôle. Cependant, ces mêmes auteurs ont constaté qu'en dépit de l'amélioration observée chez les animaux âgés, le niveau de neurogenèse de ces rats restait néanmoins inférieur à celui mesuré chez des rats adultes (Dyall et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble des données présentées ci-dessus plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle les AGPI-LC n-3 jouent un rôle au cours du vieillissement, dans les processus de plasticité cérébrales qui sous tendent les capacités mnésiques.

Objectifs

OBJECTIFS

A ce jour, un ensemble de données cohérentes souligne le rôle primordial des acides gras dans le fonctionnement du cerveau, chez l'adulte. Au cours du vieillissement, le statut lipidique d'un individu apparaît comme un facteur de risque ou de prévention du développement de nombreuses altérations et pathologies, notamment le déclin mnésique. Dans ce contexte il paraît donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués dans les effets neurobiologiques des acides gras.

Parmi les différents mécanismes d'action des acides gras proposés dans la littérature, notre attention s'est portée tout particulièrement sur leur capacité à agir directement sur l'expression des gènes *via* leurs récepteurs nucléaires. Cette action transcriptionnelle met en jeu, directement ou indirectement, de nombreux facteurs de transcription qui impliquent différentes voies de signalisation. Ainsi, il peut exister des interactions entre différentes voies de signalisation. En particulier, les voies de signalisation des acides gras et de l'acide rétinoïque, paraissent étroitement liées, notamment *via* le facteur de transcription RXR. En effet, plusieurs travaux réalisés au laboratoire ont déjà fait état de cette interaction et de l'importance de l'équilibre entre ces deux voies de signalisation dans le foie et dans le cerveau (Bonilla et al., 2000 ; Buaud et al., 2010).

Les données bibliographiques présentées dans les chapitres précédents montrent également l'implication des acides gras polyinsaturés n-3 et de l'acide rétinoïque dans le fonctionnement cérébral (*cf. II*), en particulier au cours du vieillissement (*cf. IV*). Plus précisément, les AGPI n-3 et l'AR sont capables de moduler les fonctions mnésiques *via* des modifications de plasticité cérébrale.

Dans ce contexte, l'hypothèse de mon travail suggère qu'une supplémentation alimentaire en AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, pourrait moduler l'expression des récepteurs nucléaires des AG mais également de l'AR, et aussi réguler l'expression de leurs gènes impliqués dans la plasticité cérébrale. Ces modifications se traduiraient alors, sur un plan fonctionnel, par une amélioration des performances mnésiques.

Ce projet de thèse visait donc à répondre aux questions suivantes :

Quels sont les effets d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur les voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique, chez le rat âgé ?

Quels sont les effets d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur les voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et les performances mnésiques, chez le rat âgé ?

L'approche expérimentale mise en œuvre a consisté à étudier les effets d'un régime riche en EPA et DHA (apporté par de l'huile de poisson) chez des rats âgés. Les animaux témoins ont reçu un régime dépourvu d'AGPI-LC n-3, et compte tenu du métabolisme des AGPI, ce régime était également dépourvu d'ALA, afin de limiter la production de dérivés à longue chaîne. Un tel régime modélise en partie certain mode de consommation occidental, riche en LA mais très pauvre en ALA, EPA et DHA, et qui se traduit par un ratio oméga 6/oméga 3 très déséquilibré (Simopoulos, 2002). Dans chacune des deux études que nous avons réalisées, les profils des acides gras des membranes érythrocytaires ont été étudiés afin de contrôler le statut nutritionnel des animaux et de valider notre modèle de supplémentation.

La première partie de ce travail a consisté en l'étude des effets d'un régime à base d'huile de poisson sur les voies de signalisation des AG et de l'AR et la neurogenèse hippocampique au cours du vieillissement. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription ont été mesurés, par qRT-PCR, au sein de deux structures cérébrales : (1) l'hippocampe, structure impliquée dans les processus de mémoire et d'apprentissage, et (2) le striatum, structure présentant de forts niveaux en AR et récepteurs aux rétinoïdes. Plusieurs étapes de la neurogenèse hippocampique ont également été étudiées, grâce à des méthodes d'immunohistochimie : la prolifération et la survie cellulaire, la différenciation neuronale précoce.

Les résultats obtenus apportent un éclairage nouveau sur l'impact des AGPI-LC n-3 sur les voies de signalisation des AG et de l'AR, au cours du vieillissement cérébral. En plus, ce travail présente des données originales sur l'effet des ces AGPI sur les processus de neurogenèse hippocampiques, altérés au cours du vieillissement. Ces données, présentées dans le Chapitre 1, font l'objet d'une publication soumise à Neurobiology of Aging.

Chapitre 1 : Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique chez le rat âgé.

Publication 1 : Fish oil supplementation in aged rats restores retinoid and fatty acid signaling pathways and improves neurogenesis in the hippocampus

Dans une seconde partie, les effets d'un même régime (supplémenté en huile de poisson) ont été étudiés sur l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la plasticité synaptique et potentiellement régulés par les AGPI et l'AR, dans l'hippocampe et le striatum de rats âgés. Les niveaux protéiques de certains de ces gènes ont également été mesurés. Enfin les conséquences de ces modifications sur les performances mnésiques des rats âgés ont été testées à l'aide du labyrinthe aquatique de Morris. En particulier nous nous sommes intéressés à deux types de mémoire spatiale : la mémoire spatiale de référence, et la mémoire spatiale de travail.

Les résultats obtenus apportent de nouvelles données sur les mécanismes d'action des acides gras dans le cerveau et les répercussions fonctionnelles au cours du vieillissement. Ces résultats sont exposés dans le Chapitre 2.

Chapitre 2 : Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire spatiale chez le rat âgé.

Publication 2: Fish oil supplementation in aged rats improves spatial working memory and increases GAP-43 and RXR γ mRNA expression in the hippocampus

Chapitre 1

Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique chez le rat âgé

I. Introduction

Il est maintenant établi que le vieillissement cérébral s'accompagne d'altérations morphologiques et biochimiques qui conduisent à un déclin des fonctions cognitives. En particulier, l'hippocampe apparaît comme une structure particulièrement vulnérable au cours du vieillissement (Lister and Barnes, 2009). Cette structure fait actuellement l'objet de nombreuses recherches, car elle est le siège de processus de plasticité cérébrale (notamment de la neurogenèse) et est impliquée dans les performances mnésiques et l'apprentissage, altérés au cours du vieillissement.

D'autre part, des données bibliographiques récentes plaident en faveur d'un rôle essentiel joué par les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 dans le fonctionnement du cerveau adulte, en particulier sur la plasticité synaptique et les fonctions mnésiques (Su, 2010). De plus quelques études préliminaires se sont également intéressées au rôle de ces nutriments dans les processus de neurogenèse adulte, en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro* ; mais les résultats obtenus sont souvent divergents (Kawakita et al., 2006 ; Beltz et al., 2007 ; He et al., 2009). Parmi les mécanismes d'action des acides gras, il est maintenant bien admis que ces nutriments peuvent réguler l'expression de gènes en liant et en activant des facteurs de transcription, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires : les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) et les RXR (retinoid X receptors). Le RXR, joue un rôle central dans de nombreuses voies de signalisation car il est le partenaire d'hétérodimérisation obligatoire de plusieurs récepteurs nucléaires, parmi lesquels le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR) (Germain et al., 2006). De plus des travaux ont déjà démontré le rôle de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (AR), altérée au cours du vieillissement, dans les processus de plasticité synaptique et les fonctions mnésiques (Etchamendy et al., 2001).

Dans ce contexte l'objectif de cette étude était d'examiner les effets d'un régime enrichi en AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, sur l'activité des voies de signalisation des acides gras (PPAR/RXR) et de l'AR (RAR/RXR), et d'étudier les conséquences sur une forme de plasticité cérébrale particulière, la neurogenèse.

II. Méthodologie

Des rats âgés de 13 mois ont été nourris avec un régime à base d'huile de poisson (contenant 18 % d'EPA et 12 % de DHA) pendant 21 semaines. Parallèlement, des rats arrivés au sevrage ou âgés de 13 mois ont reçu un régime à base d'huiles d'arachide et de tournesol (50/50), dépourvu d'AGPI-LC n-3, pendant la même période. Tout d'abord, afin de contrôler le statut nutritionnel et de valider notre modèle de supplémentation, la composition en acides gras des membranes érythrocytaires a été déterminée. Nous avons ensuite étudié l'impact de la supplémentation en AGPI-LC n-3 sur l'activité des voies de signalisation des acides gras et de l'AR. Pour cela, le niveau d'expression de plusieurs isoformes des récepteurs nucléaires PPAR, RAR et RXR a été mesuré par RT-qPCR dans l'hippocampe et le striatum des rats. Cette étude a été complétée par la mesure des niveaux d'expression de protéines de transport intracellulaire (les FABP) qui régulent la biodisponibilité de l'AR et des acides gras vis-à-vis des récepteurs nucléaires (Schug et al., 2007). D'autre part, nous avons mesuré par immunohistochimie la prolifération cellulaire (Ki-67), le nombre de cellules qui survivent au bout de 3 semaines (BrdU) et le nombre de neurones néo-formés (DCX) au niveau du gyrus dentelé de la formation hippocampique. Enfin, l'expression de gènes connus pour être impliqués dans les processus de neurogenèse (BDNF, NGF, TrkB et TrkA) a été quantifiée par RT-qPCR.

III. Principaux résultats

Brièvement, nos résultats ont montré une augmentation des AGPI-LC n-3 (EPA, DPA et DHA), concomitante avec une diminution des AGPI n-6 (LA et ARA), dans les membranes érythrocytaires des rats âgés supplémentés en EPA/DHA, ce qui nous a permis de valider notre modèle nutritionnel. Dans l'hippocampe des rats âgés, les niveaux d'expression des ARNm codant pour RXR β , RXR γ et la brain-FABP sont diminués, tandis que l'expression de la heart-FABP est significativement augmentée. L'ensemble de ces modifications a pu être totalement corrigé par la supplémentation en AGPI-LC n-3. Parallèlement, nous avons observé une baisse de prolifération cellulaire, du nombre de cellules qui survivent et du nombre de neurones nouvellement formés, dans le gyrus dentelé des animaux âgés, comparés aux animaux adultes. Néanmoins, chez les rats âgés supplémentés, le nombre de neurones néo-formés, a été partiellement maintenu.

IV. Conclusion

Les résultats de cette étude plaident en faveur d'un effet neuroprotecteur des AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, notamment par un maintien (partiel) du nombre de neurones néo-formés dans l'hippocampe. De plus, nos travaux suggèrent que les RXR pourraient être impliqués dans cet effet *via* une action sur la brain-FABP qui joue un rôle dans les processus de neurogenèse.

Ce travail fait l'objet d'une publication soumise à **Neurobiology of Aging**.

**Fish oil supplementation in aged rats restores retinoid and fatty acid signaling pathways
and improves neurogenesis in the hippocampus**

J. Commère Oustric¹, C. Georgeon Chartier¹, K. Touyarot¹, C. Vaysse², P. Higuieret¹, S.
Alfos^{1*†} and V. Pallet^{1†‡}

¹ *Université de Bordeaux, IPB, Unité de Nutrition et Neurosciences EA2975, Avenue des
Facultés, 33405 Talence Cedex, France*

² *ITERG – Equipe Nutrition Métabolisme & Santé, 33405 Talence Cedex, France*

* Corresponding authors: Professor V. Pallet, Tel: +33 5 40 00 87 21, e-mail: veronique.pallet@enscbp.fr; and S. Alfos, Tel: +33 5 40 00 34 53, e-mail: serge.alfos@enscbp.fr

‡ These authors contributed equally to this work.

Abstract

Brain aging is associated with a decrease in hippocampal neurogenesis and alterations in polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA) are critical for brain function and are endogenous ligands of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and retinoid X receptors (RXR) that act as transcription factors to modulate gene expression. Thus, the LC-PUFA signaling pathway interacts with various other signaling pathways through RXR, including the retinoid signaling pathway, known to play a role in cerebral plasticity. Therefore, we investigated whether n-3 LC-PUFA, contained in a fish oil (FO) enriched diet, could modulate the age-related decrease in hippocampal neurogenesis through FA and retinoid signaling pathways. Our results showed that 21 weeks of FO supplementation modulated hippocampal neurogenesis during aging by increasing the number of newly generated neurons. Concomitantly, FO supplementation prevented an age-related decrease in RXR β and RXR γ mRNA levels and increased the brain-FABP (fatty acid binding proteins) mRNA level in the hippocampus of aged rats. This study supports the neuroprotective effect of n-3 LC-PUFA in brain aging and proposes specific cellular mechanisms underlying this effect.

Keywords: age; polyunsaturated fatty acids; neurogenesis; fatty acid binding proteins (FABP); retinoic acid nuclear receptors (RAR); retinoid X receptors (RXR); peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR).

1. Introduction

Brain aging is associated with multiple morphological and neurochemical changes leading to a decline in cognitive functions. The hippocampus, a structure of the limbic system involved in memory, is particularly vulnerable to age-related changes. The dentate gyrus of the hippocampus is one of the areas where neurons are generated throughout the lifespan (Abrous et al., 2005). It is now well established that aging is associated with a decline in hippocampal neurogenesis (Drapeau and Abrous, 2008). Studies suggest that the integration of these newborn neurons into the adult hippocampus circuitry might be involved in memory processes (Deng et al., 2010). Several factors are potentially implicated in the control of adult neurogenesis, among them two neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) (Lee and Son, 2009). BDNF preferentially binds and activates the receptor tropomyosin-related kinase B (TrkB), whereas NGF preferentially binds TrkA. Studies have shown that the signals transduced by activated Trk receptors promote the survival and differentiation of some neuronal populations (Lee and Son, 2009).

The age-related decline in neurogenesis and more in general, in brain function, is not an irreversible cell-intrinsic process and can be influenced by lifestyle factors (mainly diet). Among the dietary nutrients most closely associated with optimal brain function during aging, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are particularly important (Alessandri et al., 2004). Indeed, the brain is highly enriched in n-3 PUFA and mainly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), two major long-chain PUFAs (LC-PUFA) of the n-3 series derived from the precursor α -linolenic acid (ALA). Lipid composition and lipid metabolizing enzyme activities are impaired in the brain during aging, leading to decreased EPA and DHA content (Giusto et al., 2002). Furthermore, epidemiological studies have indicated a link between a high n-3 PUFA intake and a decreased risk of cognitive decline and dementia in the

elderly (Cunnane et al., 2009). In animal models, n-3 PUFA supplementation can also attenuate the age-related decrease in synaptic plasticity (Dyall et al., 2007) and memory performances (Gamoh et al., 2001). Moreover, it has recently been demonstrated that EPA/DHA are able to promote hippocampal neurogenesis in the adult brain (Dyall et al., 2010). It is now well known that in Western countries, dietary changes in the past century have increased linoleic acid (LA), a n-6 PUFA precursor, and lowered the n-3 status to a current state of subclinical deficiency (Musket et al., 2004). Contrary to n-3 PUFA, a higher proportion of total n-6 PUFA in erythrocyte membranes (Heude et al., 2003) and a higher plasma ratio of arachidonic acid/DHA are associated with a greater risk of cognitive decline and dementia (Samieri et al., 2008). Thus, brain aging seems to be very affected by an imbalance in the n-3 PUFA status.

Several mechanisms could be involved in the neuroprotective effect of n-3 LC-PUFA during aging, including the regulation of gene transcription (Alessandri et al., 2004). Indeed, PUFA are able to modulate gene expression by binding to nuclear receptors belonging to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily. Therefore, EPA and DHA have been shown to act as endogenous ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (Chambrier et al., 2002) and, more recently, of the retinoid X receptor (RXR) (de Urquiza et al., 2000; Lengqvist et al., 2004). RXR can also be activated by 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA), one of the active metabolites of vitamin A (Zetterstrom et al., 1999), and this receptor is the common dimerization partner of numerous receptors, including PPAR and the retinoic acid receptor (RAR, activated by all-*trans* retinoic acid). We have previously shown an alteration of the retinoid signaling pathway in the hippocampus during aging (Enderlin et al., 1997; Etchamendy et al., 2001). Moreover, we have also shown that dietary fat induces changes in the expression level of synaptic plasticity markers, both in the striatum and hippocampus, by modulating the retinoic acid signaling pathway (Buaud et al., 2010). Therefore, there is a

close relationship between the retinoid and FA signaling pathways. Interestingly, retinoid and n-3 LC-PUFA regulate the expression of neurotrophins, which are involved in the control of neurogenesis (Takahashi et al., 1999; Kou et al., 2008). Thus, the relationship between RA and FA signaling pathways and their involvement in the effect of n-3 LC-PUFA on hippocampal neurogenesis during aging need to be more precisely studied.

The present study therefore investigates the effects of a fish oil supplemented diet, rich in EPA and DHA, on hippocampal neurogenesis and both brain retinoid and FA signaling pathways in aged rats. In order to address this issue, we measured cell proliferation, cell survival and the newly born neuronal cells in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. Furthermore, we quantified the mRNA expression of nuclear receptors (RXR, PPAR and RAR) and neurotrophic factors and their receptors. Finally, we investigated the effects of age and fish oil supplementation on mRNA expression of fatty acid binding proteins (FABP), intracellular carriers of FA and RA to their respective nuclear receptors (Hanhoff et al., 2002; Schug et al., 2007).

2. Materials and methods

2.1. Animals, diets and treatment

Three-week-old (weaned) and 13-month-old male Wistar rats were purchased from Janvier (France). They were housed under controlled temperature (21-23°C), humidity and airflow conditions, with a fixed 12:12 light-dark cycle and were given *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) recommendations.

Animals were randomly assigned to one of the three following experimental groups: 13-month old rats ($n = 7$) supplemented with fish oil (FO) enriched diet, 3-week-old rats ($n =$

8) and 13-month-old rats ($n = 7$) receiving a low-EPA/DHA diet. Diets were given for 21 weeks. The FO diet involved the addition of fish oil (OMEGAVIE® 1812 TG, Polaris, France), containing 18% EPA and 12% DHA as triglycerides, to a standard laboratory chow (UPAE-INRA, France). The low EPA/DHA diet mimics, in part, the occidental diet and was made of a mix of peanut and sunflower oils (50/50) added to the standard laboratory chow. Compositions of the low EPA/DHA diet and FO diet are given in Table 1. The food was prepared for two days and stored at 4°C until it was used. It was changed daily between 5:00 and 7:00 p.m.

In order to label the newly born cells and to study hippocampal cell survival we used 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), a thymidine analogue incorporated into the genetic material during the synthetic DNA phase of mitotic division. Three weeks before being sacrificed and for five consecutive days, rats received a daily intraperitoneal injection of BrdU (50 mg/kg, Sigma, France) dissolved in phosphate buffer (0.1 M, pH 8.4).

At the end of the 21-week period, food was withdrawn overnight and animals were sacrificed by decapitation the following morning. Blood was collected from the sectioned jugular vein and rapidly centrifuged to obtain red blood cells, which were stored at -80°C until used for lipid analysis. The brain was rapidly removed and the individual brain regions (whole hippocampus and striatum) of one hemisphere were dissected out, rapidly frozen and stored at -80°C until used for qRT-PCR. The other hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde for three weeks and processed for immunohistochemistry.

2.2. Immunohistochemistry

After fixation in 4% paraformaldehyde, 50 µm frontal sections were cut on a vibratome (Leica). Free-floating sections were used for the immunohistochemistry procedure as previously described (Bonnet et al., 2008). Briefly, a one-in-ten section was treated either

for Ki-67 immunoreactivity using a mouse anti-Ki-67 monoclonal antibody (1:150, Novocastra) or for doublecortin (DCX) immunoreactivity using a goat polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies were biotinylated horse anti-mouse and donkey anti-goat (1:200, AbCys; 1:200, Amersham). For BrdU labeling, adjacent sections were incubated with a mouse monoclonal anti-BrdU antibody (1:100, Dako) followed by a biotinylated horse anti-mouse antibody (1:200, AbCys). Sections were processed in parallel, and immunoreactivities were visualized by the biotin-streptavidin technique (ABC kit, Dako) by using 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. The number of immunoreactive (IR) cells in the right DG was estimated by using a modified version of the optical fractionator method with a systematic random sampling every 10 sections along the rostrocaudal axis of the DG. On each section, IR cells in the granular and subgranular layers of the DG were counted with a 100× microscope objective. All results are expressed as the total number of cells in the whole DG.

2.3. *Quantitative real-time PCR*

Total RNA from the hippocampus and striatum were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the purified RNA was determined spectrophotometrically on a Nanodrop ND-1000 (Labtech, France) and the integrity was checked using the RNA-6000 Nano LabChip kit in combination with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). All RNA had RNA integrity numbers (RIN) greater than 8, indicating a good and comparable RNA quality across the entire sample. Complementary DNA was synthesized using ImPromII reverse transcriptase (Promega, France) as previously described (Bonnet et al., 2008). Briefly, 1 µg of total RNA mixed with RNasin (Promega, France) and DNase (Roche, France) was incubated at 37°C for 15 minutes. Then, OligodT and random primers (Promega, France) were added and incubated at 75°C for

10 minutes. The reverse transcriptase reaction was performed at 42°C for 60 minutes in a final volume of 20 µl.

The real-time PCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics, Germany) in a final volume of 20 µl, containing 1 X LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5 µM of each primer and 6 µl of cDNA. The forward and reverse primer sequences for each gene are given in Table 2. The following program was run: an initial denaturation step for 10 min at 95°C, amplification for 40 cycles (10 s denaturation at 95°C, 6 s annealing at 62°C, and 10 s extension at 72°C), and melt-curve analysis. The specificity and identity of the amplified products were verified as follows: (1) the melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, and (2) amplified products for each gene were verified by sequencing with the Big Dye Terminator v1.1. (Applied Biosystems) and analyzed on a ABI3130 sequencer (Applied Biosystems).

The peptidylprolyl isomerase B (Ppib) housekeeping gene was used as the reference gene for relative quantification. Quantification data were analyzed using the LightCycler 480 Relative Quantification software (version 1.5). In order to compensate for differences in target and reference gene amplification efficiency, either within or between experiments, this software provides a calibrator-normalized relative quantification including a PCR efficiency correction. Therefore, the results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator. In our case, the calibrator was chosen among the adult rats. We verified that the expression level of the reference gene Ppib was unaffected by our experimental conditions.

2.4. Lipid analysis

Diet lipids. The total lipids were extracted from the food according to the method of Folch et al. (1957).

Red blood cell membrane lipids. The total lipids of red blood cell (RBC) membranes were extracted using the method of Peuchant et al. (1989) with isopropanol. The lipids were then dissolved in an appropriate volume of chloroform-methanol (2/1, v/v) and deposited on the silica gel. The solvent system used for separation was a mixture of ether/acetone (60/20, v/v). After migration and revelation with dichlorofluorescein (0.2% in ethanol, w/v), the silica gel area corresponding to the total phospholipids (TPL) was visualized under UV light (254 nm), removed from the thin layer chromatography plate and transferred to a glass tube for fatty acid methyl ester (FAME) preparation.

Preparation and analysis of FAME. Total FA chains of food or TPL of RBC membranes were methylated and analyzed as previously described (Buaud et al., 2010).

2.5. Statistical analysis

The results are expressed as mean values with their standard errors. The statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by a Student's t-test between the adult and aged groups in order to analyze the effect of age, and between the aged and aged + FO groups to analyze the effect of n-3 LC-PUFA supplementation. The minimum level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Lipid composition of red blood cell membranes

Table 3 shows the FA composition of RBC membrane lipids as a percentage of the total FA content in adult, aged and aged + FO rats at the end of 21 weeks of diet. The levels

of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and PUFA were similar between adult and aged rats. Nevertheless, the content of total n-6 PUFA was slightly lower in aged rats compared to adult rats (- 5%, $p < 0.01$) due to a smaller amount of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-6), whereas the total n-3 PUFA content was significantly higher (+ 100%, $p < 0.001$) due to greater amounts of DPA n-3 (+ 300%, $p < 0.05$) and DHA (22:6 n-3, + 200%, $p < 0.001$). On the other hand, supplemented rats exhibited an increase of SFA (+ 4%, $p < 0.01$), but a decrease of PUFA (- 9%, $p < 0.001$). To be more precise, in aged + FO rats compared to aged rats, the n-6 PUFA content was markedly decreased (- 51%, $p < 0.001$), whereas n-3 PUFA was increased eightfold ($p < 0.001$). The diet-related decrease in n-6 FA concerned both the precursor LA (18:2 n-6, - 37%, $p < 0.01$) and its derivative arachidonic acid (AA, 20:4 n-6, - 50%, $p < 0.001$). On the other hand, the diet-related increase in n-3 FA was mainly due to the long-chain derivatives EPA (20:5 n-3, $p < 0.001$), DPA n-3 ($p < 0.001$), and DHA ($p < 0.001$). The n-3 PUFA precursor ALA (18:3 n-3) remained undetectable in the supplemented aged rats.

3.2. Effects of aging and fish oil supplementation on hippocampal neurogenesis

Cell proliferation was measured following 21 weeks of diet using an endogenous marker of the cell cycle, Ki-67. Ki-67-IR cells were located within the subgranular zone (SGZ) and were isolated or grouped in clusters (Fig. 1A). Quantitative analysis revealed that the number of Ki-67-IR cells decreased by 88% in aged rats compared to adult rats ($p < 0.001$). However, FO supplementation did not affect the number of Ki-67-IR cells in aged rats (Fig. 1D). Moreover, we also examined the influence of aging and FO supplementation on the survival of newborn cells. Three weeks after the BrdU injections, we observed that most of the surviving BrdU-IR cells were isolated, round, large and located within the granular cell layer (GCL) (Fig. 1B). The number of 3-week-old BrdU-IR cells decreased with age (- 84%,

$p < 0.001$) and was not affected by FO supplementation (Fig. 1E). Finally, we determined whether FO feeding influences neurogenesis by using DCX, a microtubule-associated phosphoprotein that is a marker of newly generated neurons. DCX-labeled cells had their soma in the deepest region of the GCL at the interface of the hilus and their dendrites radiated into the molecular layer (Fig. 1C). A quantitative analysis revealed that the number of DCX-IR cells markedly declined with age (- 91%, $p < 0.001$) and that this aged-related decrease can be in part reversed by FO supplementation. Indeed, aged + FO rats displayed a greater number of newly generated neurons (+ 45%, $p < 0.05$) when compared with aged rats (Fig. 1F).

3.3. Effects of aging and fish oil supplementation on neurotrophin factors and their receptors in the hippocampus and striatum

We examined the expression of neurotrophins in the hippocampus as well as the striatum because we have previously demonstrated that this brain structure is a target of RA action (Feart et al., 2005).

In the hippocampus (Fig. 2A), an increase of TrkA mRNA expression level was observed with age (aged vs. adult, + 37%, $p < 0.05$). This increase tended to be reversed by FO supplementation but did not reach statistical significance (aged + FO vs. aged, - 16%, $p = 0.1$). BDNF, NGF or TrkB expression levels were not affected by age or FO supplementation in the hippocampus.

In the striatum, TrkA exhibited the same profile of expression as in the hippocampus (Fig. 2B). Nevertheless, in this structure, TrkB tended to decrease with age (- 10%, $p = 0.1$) and FO supplementation increased its expression (aged + FO vs. aged, + 19%, $p < 0.05$). Finally, in the striatum, BDNF exhibited the same profile of expression as its receptor TrkB and NGF expression level was not affected by either age or FO supplementation.

3.4. Effects of aging and fish oil supplementation on nuclear receptor expression in the hippocampus and striatum

As presented in Table 4, aging decreased the expression of RXR β mRNA (- 27%, $p < 0.05$) and RXR γ mRNA (- 25%, $p = 0.05$) in the hippocampus, whereas RXR α mRNA expression was increased (+ 20%, $p < 0.05$). Furthermore, FO supplementation restored the aged-related decrease in RXR β and RXR γ mRNA content when compared to aged rats (+ 97% and + 37% respectively, $p < 0.05$). In the striatum, we observed few effects of age: only the level of RXR α mRNA was increased (+ 29%, $p < 0.05$). However, FO supplementation in aged rats induced an increase in RAR α (+ 21%, $p = 0.05$) and a slight decrease in RXR β (- 10%, $p < 0.05$) mRNA levels. Concerning the mRNA expression of PPARs, there was no effect of age or FO supplementation in either the hippocampus or striatum.

3.5. Effects of aging and fish oil supplementation on fatty acid binding proteins in the hippocampus and striatum.

As shown in Fig. 3A, in the hippocampus of aged compared to adult rats, we observed a decreased expression of B-FABP mRNA (- 24%, $p < 0.05$) and an increased expression of H-FABP mRNA (+ 21%, $p < 0.05$). These age-related variations were all corrected by FO supplementation. Indeed, the diet lead to an increased B-FABP mRNA level (+ 77%, $p < 0.05$) and concomitantly, a decreased H-FABP mRNA content (- 26%, $p < 0.05$). In the striatum (Fig. 3B), FABP mRNA expression was not modified by either aging or FO supplementation.

4. Discussion

4.1. Nutritional status of the rats

In order to validate our nutritional model based on FO supplementation, we analyzed the FA composition in RBC membranes. In the present work, the RBC membranes of the

aged + FO group exhibited an increase in total n-3 PUFA, in parallel with a decrease in total n-6 PUFA, when compared with the aged group. More precisely, FO supplementation induced an increase in the n-3 DPA, EPA and DHA contents and a decrease in the AA content. The incorporation of EPA and DHA in RBC membranes during aging confirms the efficacy of FO supplementation. Interestingly, a relationship between the DHA level in RBC membranes and that of specific brain regions has already been shown (McNamara et al., 2009). Recent studies have also demonstrated that FO supplementation in aged or n-3 PUFA deficient rats was able to increase DHA content in brain phospholipids and, more particularly, in the hippocampus and striatum (Dyall et al., 2007; Chung et al. 2008).

4.2. Effects of aging and FO diet on hippocampal neurogenesis and on the expression of neurotrophic factors and their receptors

As previously described in the literature, we observed an age-related decrease in the number of Ki-67 (Rao et al., 2006), 3-week-old BrdU (Bizon et al., 2004) and DCX-IR cells (McDonald and Wojtowicz, 2005) in the DG, all indicating a decline in neurogenesis. The reduction in Ki-67-IR cells reveals a decline in cell proliferation. This could be the consequence of a decrease in the number of granule cell precursors and/or an alteration of their mitotic activity (Olariu et al., 2007; Hattiangady and Shetty, 2008). Both would ultimately lead to a decrease in the number of survival cells and new neurons; then, this could explain the decrease in BrdU and DCX-IR cell numbers that we observed. Indeed, studies have revealed that there is no effect of age on the rate of survival of newborn progeny (McDonald and Wojtowicz, 2005; Rao et al., 2005). However, the reduction of DCX-IR cells could be due to impaired maturation (Rao et al., 2005) and/or to a slowed down capacity to migrate from the SGZ to the GCL (Heine et al., 2004). Furthermore, a decrease in the

differentiation into neuronal phenotypes, in favor of glial phenotypes, could also explain the decrease in DCX-IR cells with aging (McDonald and Wojtowicz, 2005).

We did not observe any differences in cell proliferation nor in the number of survival cells in the aged + FO group compared to the aged group. However, FO supplementation partially reversed the decrease in the number of DCX-IR cells, a marker of newly born neurons, observed in the hippocampus of aged rats. Previous studies concerning the effect of n-3 PUFA on cell proliferation present controversial results showing either an increase in cell proliferation in transgenic fat-1 mice (He et al., 2009) and lobsters (Beltz et al., 2007), or a decrease in cell proliferation in neural stem cells (Kawakita et al., 2006). Recently, Dyall et al. (2010) have also shown an increase in the number of DCX-IR cells in 26-month-old rats fed an EPA and DHA diet for 12 weeks, compared to untreated aged rats. However, even if FO supplementation significantly reduced the effect of aging on neurogenesis, in both studies, it still remained that there were significantly fewer DCX-IR cells in the aged group than in the adult one.

Studies have suggested that the positive effects of n-3 PUFA on neurogenesis may be in part mediated *via* neurotrophins (Blondeau et al., 2009). Indeed n-3 PUFAs, including EPA and DHA, enhance BDNF expression (Wu et al., 2004) and seem necessary for the maintenance of the optimal synthesis of NGF in the hippocampus (Ikemoto et al., 2000). However, in our model, we only observed a borderline significant increase in BDNF mRNA expression and a simultaneous significant increase in the mRNA expression of its receptor TrkB in the striatum of aged + FO rats. These results concur with those of Bousquet et al. (2009) which showed effects of EPA/DHA on BDNF and TrkB mRNA levels in the striatum of a mouse model of Parkinson's disease. Since no modification in the neurotrophin expression was observed in the hippocampus, we suggested that n-3 PUFA might preferentially act in the striatum, promoting cell survival and dendritic growth, as already

described by Huang and Reichardt (2003). This could then lead to the improvement of working memory performances, as observed by Chung et al (2008) in FO-fed adult rats.

Interestingly, neurotrophin expression has been shown to be regulated by RA (Takahashi et al., 1999) and it has recently been suggested that RAR α/β agonists enhance BDNF expression (Katsuki et al., 2009). Thus, we hypothesized that the effect of n-3 PUFA on neurogenesis could be mediated, at least in part, through FA and RA signaling pathways. Then, we quantified the mRNA expression of PPAR, RAR and RXR in the hippocampus and striatum.

4.3. Effects of aging and FO diet on FA and RA nuclear receptors and FA binding proteins

Several studies have demonstrated the relationship between the age-related decrease in RA signaling pathway activity in the brain, the deterioration of synaptic plasticity and memory performances (Enderlin et al., 1997, Etchamendy et al., 2001). Our results showing an age-related decrease in RXR β and RXR γ mRNA expression in the hippocampus are in agreement with these works. Concerning PPAR δ , there is no effect of age or FO supplementation on the expression level of mRNA in the hippocampus or striatum. This result is in agreement with that of Zhu et al. (2010), which showed no change in PPAR δ expression in the brain of mice fed a fish oil diet during three months. One of the most interesting results in our study was the effect of FO supplementation on RXR mRNA levels. Indeed, 21-week-FO supplementation reversed the age-related decrease in RXR β mRNA levels, both in the striatum and hippocampus but also in RXR γ mRNA levels in the hippocampus only. To our knowledge, our results provide evidence for the first time of the up-regulation of RXR γ mRNA expression in the hippocampus by FO supplementation. Although 9-*cis* RA has been accepted as the endogenous ligand for RXR for a long time now, more recent studies have suggested that PUFA, and notably DHA, also bind to and activate RXR (de Urquiza, 2000). RXR is well known as the key receptor, being an obligate partner, in many signaling

pathways (van Neerven et al., 2008). Indeed, RXR could heterodimerize with other nuclear receptors, such as PPAR and RAR, and thereby allows the transcription of target genes. Moreover, it has also been demonstrated that RXR homodimers could activate PPAR target genes by selectively binding to functional PPRE and inducing transactivation (Ijpenberg et al., 2004). Then, RXR is at the crossroad of the RA and FA signaling pathways that allow the transcription of target genes in response to RA and/or FA. We hypothesized that DHA, contained in the FO diet, activates RXR γ and RXR β and induces the transcription of target genes, including their own genes, through the activation of the RXR signaling pathway (e.g. RXR/PPAR or RXR/RAR). Previous studies have shown that RXR γ and RXR β are directly involved in the modulation of brain plasticity, notably in neurite outgrowth induced by DHA (Calderon and Kim, 2007), or in the modulation of dendritic morphology of cultured hippocampal neurons induced by RA (Liu et al., 2003). Moreover, and interestingly, it has been suggested that RXR γ plays a crucial role in working memory, which is altered during aging (Wietrzych et al., 2005). In regard to the crucial role of RXR in brain functions, we could hypothesize that increased RXR levels might be in part responsible for the previously observed beneficial effects of n-3 LC-PUFA on memory in rats (Chung et al., 2008; Kelly et al., 2010).

Cellular transportation and physiological actions of PUFA are mediated by FABP, transporters for FA and other lipophilic substances such as RA, thus contributing to the regulation of their nuclear receptor-associated target genes (Schug et al., 2007). We have quantified the mRNA expression levels of three types of FABP expressed in the mature brain: brain-FABP (B-FABP), epidermal-FABP (E-FABP) and heart-FABP (H-FABP) (Owada, 2008). Our results indicate that aging is associated with a decrease in the B-FABP mRNA level and, on the contrary, an increase in the H-FABP mRNA level in the hippocampus. Pu et al. (1999) have previously described an age-related decrease in B-FABP in the synaptosomes

of 25-month-old mice. Our study is the first to investigate the effect of FO supplementation on FABP expression in the brain of aged rats. These results are consistent with the RBC FA content in our model and with the known affinity of FABP for the different FA (Hanhoff et al., 2002). Indeed, the high level of n-3 PUFA and low level of n-6 PUFA in RBC membranes of aged rats supplemented with FO is consistent with the increase in B-FABP mRNA expression and decrease in H-FABP mRNA expression in the hippocampus, respectively.

Knowing the relationship between PUFA contents in the RBC membranes and that of specific brain regions, we could hypothesize that these variations in FABP expression in the hippocampus may reflect variations of PUFA in this structure. Moreover, Nasrollahzadeh et al. (2008) have recently shown increased levels of EPA and DHA in the serum and brain tumors of adult rats fed with a DHA enriched diet, in parallel with an increase of B-FABP mRNA. Finally, our results suggest a regulation of B-FABP and H-FABP by dietary PUFA. As already described for liver-FABP and CRABP-II (cellular RA binding protein II) (Mochizuki et al., 2001), we can hypothesize that PUFAs regulate FABP by making use of RXR-response elements (RXRE) as well as the PPAR-response element (PPRE). Thus, the FO diet-related disproportional expression of RXR might regulate the transcription of FABP. Interestingly, Watanabe et al. (2007) revealed that neurogenesis in the DG of B-FABP-null mice is altered. Moreover, anti-B-FABP antibodies block glial and neuronal differentiation in primary mixed-cell cultures of cerebellum, but have no effect on cell proliferation (Feng et al., 1994). Finally, a recent study on ischemic brain damage in a monkey model has suggested that PUFA, such as DHA, may act via B-FABP to regulate adult neurogenesis in primates (Ma et al., 2010). These data, which suggest an involvement of B-FABP in the neurogenesis process, must be compared with our results showing an increase in newly born neurons concomitantly with an increase in B-FABP mRNA expression in the hippocampus of aged + FO rats. Altogether, these results suggest that B-FABP could be involved in the complex

mechanisms by which n-3 PUFAs promote hippocampal neurogenesis, and improve spatial memory during aging (Su, 2010).

In conclusion, the present work suggests that fish oil supplementation during aging, probably through n-3 LC-PUFA, could prevent the age-related collapse of RXR signaling pathway activity and consequently, would maintain FABP expression and prevent, at least in part, the age-related decline in hippocampal neurogenesis. These effects of n-3 LC-PUFA on the RXR signaling pathway and neurogenesis may be a mechanism underlying their beneficial actions on memory performance during aging. Now the complexity of action and the region-specific regulatory mechanisms of n-3 LC-PUFA need to be further studied. Nevertheless, our results provide a new target in the prevention of memory decline or/and its recovery.

Acknowledgments

This research was funded by the Conseil Régional d'Aquitaine.

Disclosure statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

References

- Abrous, D. N., Koehl, M. and Le Moal, M., 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85, 523-569.
- Alessandri, J. M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aid, S., Poumes-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G. and Lavialle, M., 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev.* 44, 509-538.
- Beltz, B. S., Tlusty, M. F., Benton, J. L. and Sandemana, D. C., 2007. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci Lett.* 415, 154-158.
- Bizon, J. L., Lee, H. J. and Gallagher, M., 2004. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell.* 3, 227-234.
- Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D. N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R. H., Plumier, J. C., Marini, A. M. and Heurteaux, C., 2009. Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology.* 34, 2548-2559.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P. and Abrous, D. N., 2008. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One.* 3, e3487.
- Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F. and Cicchetti, F., 2009. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*
- Buaud, B., Esterle, L., Vaysse, C., Alfos, S., Combe, N., Higuieret, P. and Pallet, V., 2010. A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr.* 103, 1720-1729.

Calderon, F. and Kim, H. Y., 2007. Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77, 227-232.

Chambrier, C., Bastard, J. P., Rieusset, J., Chevillotte, E., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Hainque, B., Riou, J. P., Laville, M. and Vidal, H., 2002. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res*. 10, 518-525.

Chung, W. L., Chen, J. J. and Su, H. M., 2008. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr*. 138, 1165-1171.

Cunnane, S. C., Plourde, M., Pifferi, F., Begin, M., Feart, C. and Barberger-Gateau, P., 2009. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res*. 48, 239-256.

de Urquiza, A. M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjovall, J. and Perlmann, T., 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*. 290, 2140-2144.

Deng, W., Aimone, J. B. and Gage, F. H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*. 11, 339-350.

Drapeau, E. and Nora Abrous, D., 2008. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell*. 7, 569-589.

Dyall, S. C., Michael, G. J. and Michael-Titus, A. T., 2010. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res*. 88, 2091-2102.

Dyall, S. C., Michael, G. J., Whelpton, R., Scott, A. G. and Michael-Titus, A. T., 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging*. 28, 424-439.

Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H. and Higuieret, P., 1997. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett.* 229, 125-129.

Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R. M., Pallet, V., Jaffard, R. and Higuieret, P., 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci.* 21, 6423-6429.

Feart, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P. and Pallet, V., 2005. Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging.* 26, 729-738.

Feng, L., Hatten, M. E. and Heintz, N., 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron.* 12, 895-908.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497-509.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Hossain, S. and Masumura, S., 2001. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28, 266-270.

Giusto, N. M., Salvador, G. A., Castagnet, P. I., Pasquaré, S. J. and Ilincheta de Boschero, M. G., 2002. Age-Associated Changes in Central Nervous System Glycerolipid Composition and Metabolism. *Neurochemical Research.* 27, 1513-1523.

Hanhoff, T., Lucke, C. and Spener, F., 2002. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biochem.* 239, 45-54.

Hattiangady, B. and Shetty, A. K., 2008. Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiol Aging.* 29, 129-147.

He, C., Qu, X., Cui, L., Wang, J. and Kang, J. X., 2009. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 11370-11375.

Heine, V. M., Maslam, S., Joels, M. and Lucassen, P. J., 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging.* 25, 361-375.

Heude, B., Ducimetiere, P. and Berr, C., 2003. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. *Am J Clin Nutr.* 77, 803-808.

Huang, E. J. and Reichardt, L. F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72, 609-642.

IJpenberg, A., Tan, N. S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W. and Desvergne, B., 2004. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *Embo J.* 23, 2083-2091.

Ikemoto, A., Nitta, A., Furukawa, S., Ohishi, M., Nakamura, A., Fujii, Y. and Okuyama, H., 2000. Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 285, 99-102.

Katsuki, H., Kurimoto, E., Takemori, S., Kurauchi, Y., Hisatsune, A., Isohama, Y., Izumi, Y., Kume, T., Shudo, K. and Akaike, A., 2009. Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling. *J Neurochem.* 110, 707-718.

Kawakita, E., Hashimoto, M. and Shido, O., 2006. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 139, 991-997.

Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A. D., O'Mara, S. M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K. A., Nicolaou, A. and Lynch, M. A., 2010. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol Aging.*

Kou, W., Luchtman, D. and Song, C., 2008. Eicosapentaenoic acid (EPA) increases cell viability and expression of neurotrophin receptors in retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cells. *Eur J Nutr.* 47, 104-113.

Lee, E. and Son, H., 2009. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep.* 42, 239-244.

Lengqvist, J., Mata De Urquiza, A., Bergman, A. C., Willson, T. M., Sjovall, J., Perlmann, T. and Griffiths, W. J., 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics.* 3, 692-703.

Liu, S., Wang, J., Zhu, D., Fu, Y., Lukowiak, K. and Lu, Y. M., 2003. Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 23, 732-736.

Ma, D., Zhang, M., Mori, Y., Yao, C., Larsen, C. P., Yamashima, T. and Zhou, L., 2010. Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia. *Hippocampus.* 20, 811-819.

McDonald, H. Y. and Wojtowicz, J. M., 2005. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett.* 385, 70-75.

McNamara, R. K., Able, J., Jandacek, R., Rider, T. and Tso, P., 2009. Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. *Psychoneuroendocrinology.* 34, 532-539.

Mochizuki, K., Suruga, K., Kitagawa, M., Takase, S. and Goda, T., 2001. Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine. *Arch Biochem Biophys.* 389, 41-48.

Muskiet, F. A., Fokkema, M. R., Schaafsma, A., Boersma, E. R. and Crawford, M. A., 2004. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *J Nutr.* 134, 183-186.

Nasrollahzadeh, J., Siassi, F., Doosti, M., Eshraghian, M. R., Shokri, F., Modarressi, M. H., Mohammadi-Asl, J., Abdi, K., Nikmanesh, A. and Karimian, S. M., 2008. The influence of feeding linoleic, gamma-linolenic and docosahexaenoic acid rich oils on rat brain tumor fatty acids composition and fatty acid binding protein 7 mRNA expression. *Lipids Health Dis.* 7, 45.

Olariu, A., Cleaver, K. M. and Cameron, H. A., 2007. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *J Comp Neurol.* 501, 659-667.

Owada, Y., 2008. Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J Exp Med.* 214, 213-220.

Peuchant, E., Wolff, R., Salles, C. and Jensen, R., 1989. One-step extraction of human erythrocyte lipids allowing rapid determination of fatty acid composition. *Anal Biochem.* 181, 341-344.

Pu, L., Igbavboa, U., Wood, W. G., Roths, J. B., Kier, A. B., Spener, F. and Schroeder, F., 1999. Expression of fatty acid binding proteins is altered in aged mouse brain. *Mol Cell Biochem.* 198, 69-78.

Rao, M. S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D. P. and Shetty, A. K., 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci.* 21, 464-476.

Rao, M. S., Hattiangady, B. and Shetty, A. K., 2006. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging Cell.* 5, 545-558.

Samieri, C., Feart, C., Letenneur, L., Dartigues, J. F., Peres, K., Auriacombe, S., Peuchant, E., Delcourt, C. and Barberger-Gateau, P., 2008. Low plasma eicosapentaenoic acid and depressive symptomatology are independent predictors of dementia risk. *Am J Clin Nutr.* 88, 714-721.

Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. and Noy, N., 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell.* 129, 723-733.

Su, H. M., 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem.* 21, 364-373.

Takahashi, J., Palmer, T. D. and Gage, F. H., 1999. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol.* 38, 65-81.

van Neerven, S., Kampmann, E. and Mey, J., 2008. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol.*

Watanabe, A., Toyota, T., Owada, Y., Hayashi, T., Iwayama, Y., Matsumata, M., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., Maekawa, M., Ohnishi, T., Arai, R., Sakurai, K., Yamada, K., Kondo, H., Hashimoto, K., Osumi, N. and Yoshikawa, T., 2007. *Fabp7* maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLoS Biol.* 5, e297.

Wietrych, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P. F., Chambon, P. and Krezel, W., 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem.* 12, 318-326.

Wu, A., Ying, Z. and Gomez-Pinilla, F., 2004. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 21, 1457-1467.

Zetterstrom, R. H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T. and Olson, L., 1999. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci.* 11, 407-416.

Zhu, H., Fan, C., Xu, F., Tian, C., Zhang, F. and Qi, K., 2010. Dietary fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids and alpha-linolenic acid differently affect brain accretion of docosahexaenoic acid and expression of desaturases and sterol regulatory element-binding protein 1 in mice. *J Nutr Biochem.* 21, 954-960.

Figure 1

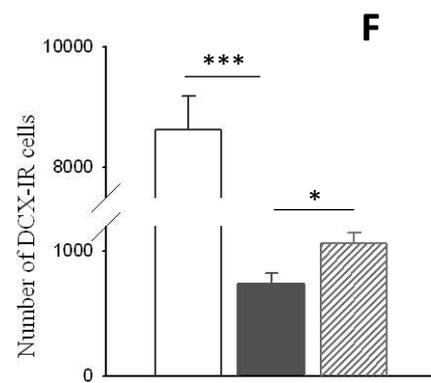
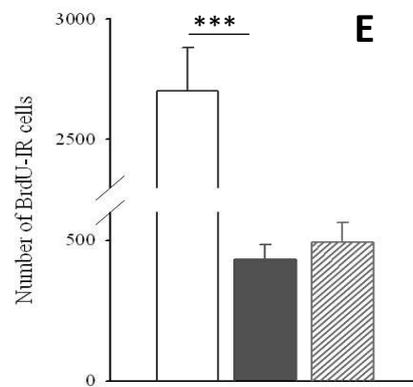
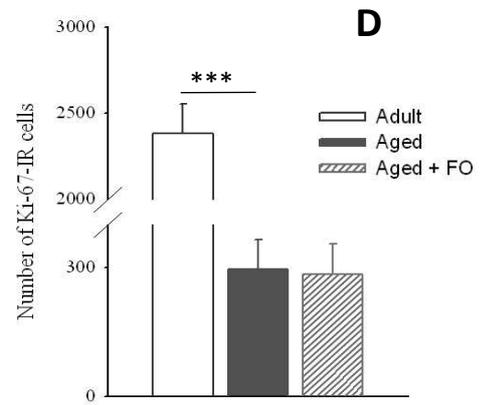
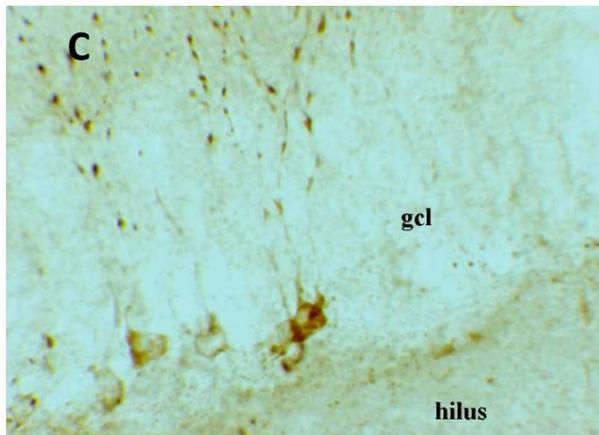
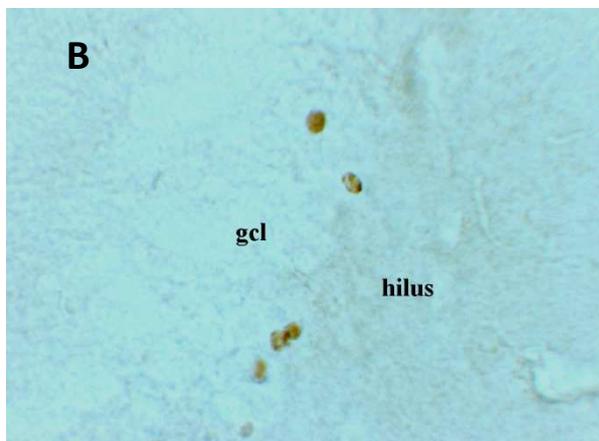


Figure 2

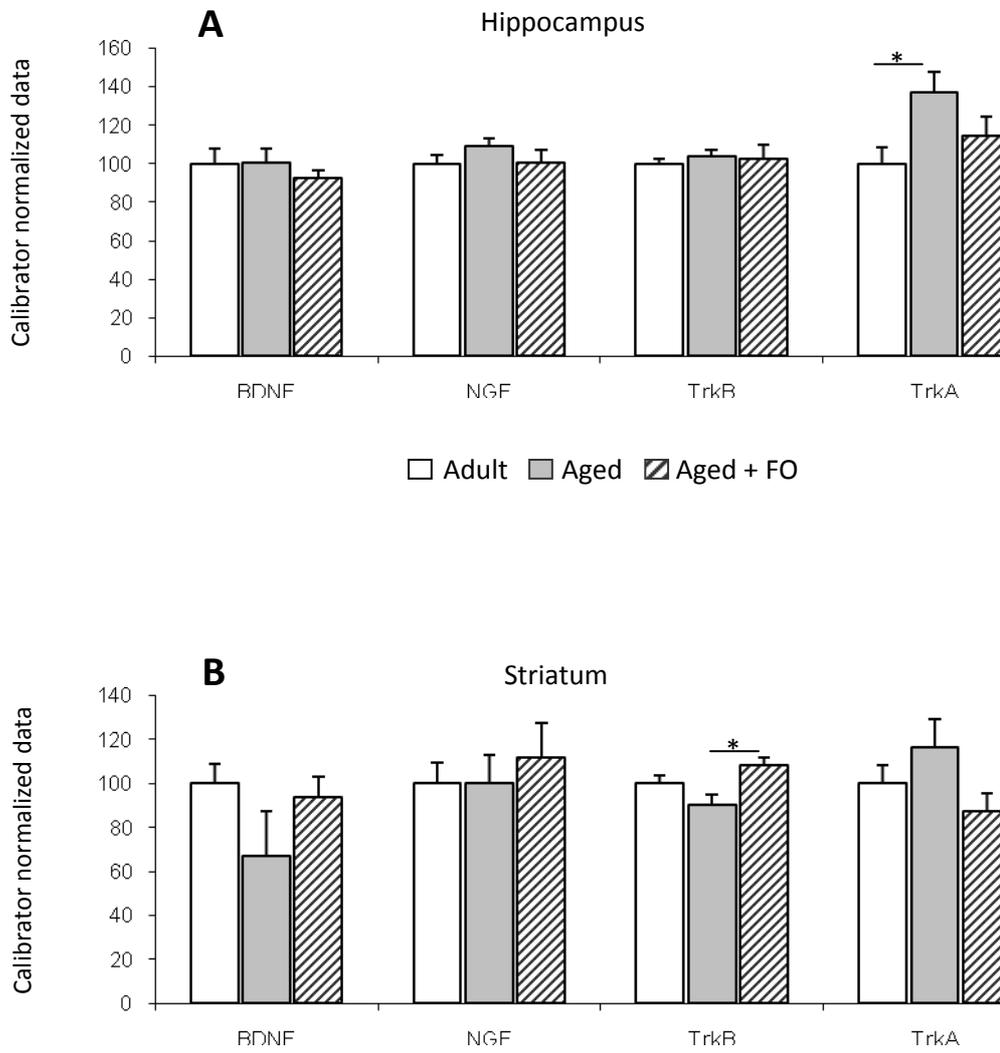


Figure 3

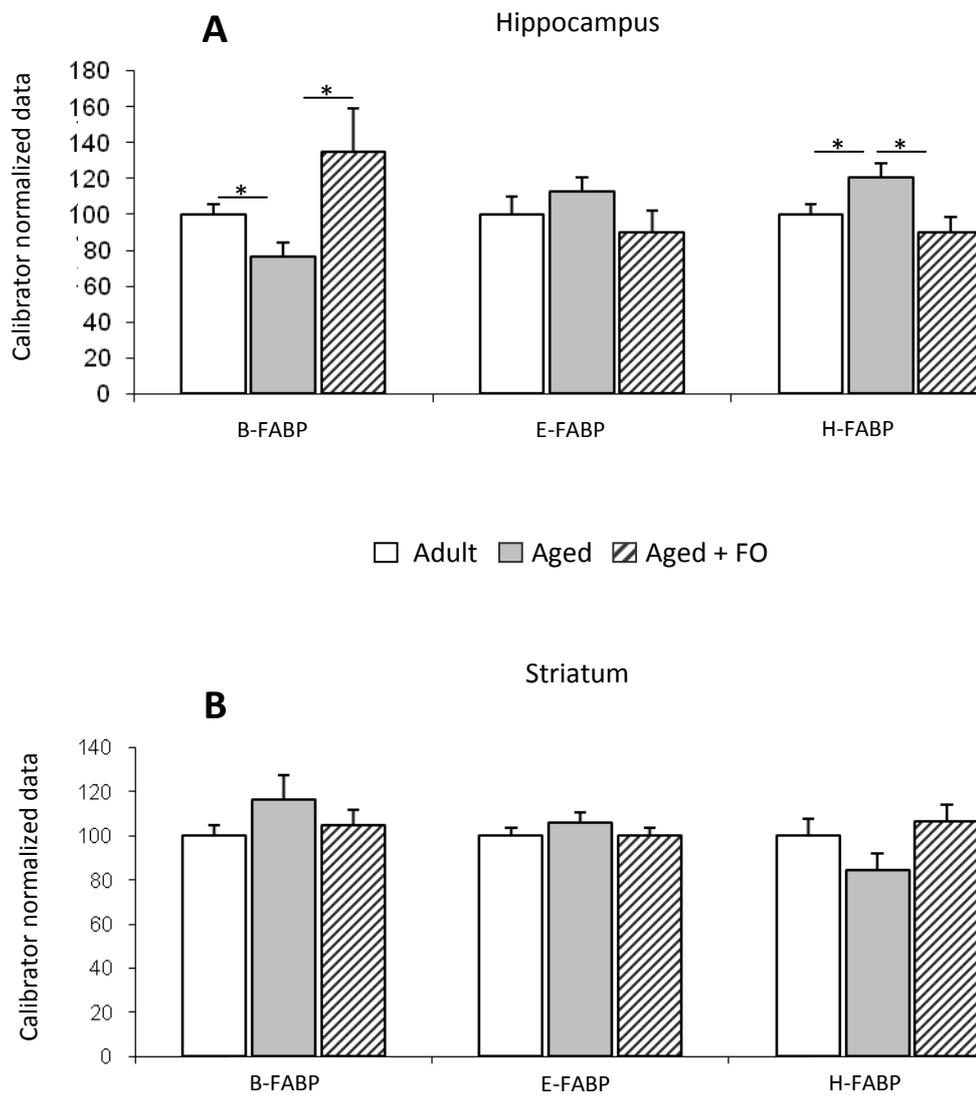


Table 1

Composition of experimental diets.

	<i>Low-EPA/DHA diet</i>	<i>Fish oil diet</i>
<u>Ingredients (% of energy)</u>		
Lipids*	11.20	11.20
Saturated	1.61	3.56
Monounsaturated	4.21	3.45
Polyunsaturated	5.37	4.19
Proteins	18.01	18.01
Carbohydrates	70.79	70.79
Energy (kJ/g of diet)	16.8	16.8
Vitamin A (UI/g of diet)	5	5
<u>Fatty acids composition (g/100 g of diet)</u>		
16:0	0.41	0.88
18:0	0.14	0.17
18:1 n-9	1.77	0.49
18:2 n-6	2.38	0.07
20:4 n-6	N.D.	0.06
22:5 n-6	N.D.	N.D.
18:3 n-3	0.01	0.04
20:5 n-3	N.D.	0.98
22:5 n-3	N.D.	0.11
22:6 n-3	N.D.	0.54
Total saturated	0.72	1.59
Total monounsaturated	1.86	1.35
Total polyunsaturated	2.40	1.87
Total n-6	2.38	0.19
Total n-3	0.01	1.68
n-6/n-3	238	0.11

N.D., not detected.

* Lipids were extracted from food according to the method of Folch et al. (1957), transmethylated and subjected to gas chromatography.

Table 2

Primers used for quantitative RT-PCR.

Gene name	Nucleotide sequence	Product length (bp)
Ppib	F: 5'-GTTCTGGAAGGCATGGATGT-3' R: 5'-TCCCCGAGGCTCTCTACT-3'	153
BDNF	F: 5'-TCCTGGGCATCAGAAAAAGAGG-3' R: 5'-CCAAAAACAGGGGATTCAGTGG-3'	183
NGF	F: 5'-TCAACAGGACTCACAGGAGCAAG-3' R: 5'-TGGTCTTATCTCCAACCCACACAC-3'	105
TrkA	F: 5'-ACTGGGTGGCAGTTCTCTTTCC-3' R: 5'-TCCTGGCGCTTGATATGGTG-3'	117
TrkB	F: 5'-TTCCGGTGGTTTTAGCCTGTG-3' R: 3'-TCACTCCTGCTGTGCTTTATGG-3'	122
PPAR δ	F: 5'-CGCAACAAGTGTCACTACTG-3' R: 5'-CCAAAGCGGATAGCGTTGTG-3'	74
RAR α	F: 5'-GCCTCGATTCTACAAGCCTTGC-3' R: 5'-GGATACTGCGTCGGAAGAAGC-3'	107
RAR β	F: 5'-CAGCTGGGTAAATACACCACGAA-3' R: 5'-GGGTATACCTGGTACAAATTCTGA-3'	227
RXR α	F: 5'-GCTGGTGTGCGAAGATGCGTGAC-3' R: 5'-GGGTACTTGTGTTTGCAGTACG-3'	171
RXR β	F: 5'-TGGGAACAGGGAGAATGTGG-3' R: 5'-CTGGAAAGCGACTTTATGTGCAAG-3'	129
RXR γ	F: 5'-GGAAAGACCTCATCTACACG-3' R: 5'-CAGCTTCCCTTTCATGCCC-3'	123
B-FABP	F: 5'-TCATGTGCAGAAGTGGGATGG-3' R: 5'-TCATAACAGCGAACAGCAACGAC-3'	111
E-FABP	F: 5'-CCTCGACAACAACAACCTCACC-3' R: 5'-CCGTCTCAGTTTTCTGCCATC-3'	119
H-FABP	F: 5'-TCGACCTCCTTCTCATTGC-3' R: 5'-CCCACACCGAGTGACTTCAT-3'	103

Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. Ppib: peptidylprolyl isomerase B; BDNF: brain derived neurotrophic factor; NGF: nerve growth factor; TrkA: tropomyosin-related kinase A; TrkB: tropomyosin-related kinase B; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; RAR: retinoic acid receptor; RXR: retinoid X receptor; B-FABP: brain fatty acid binding protein or FABP 7; E-FABP: epidermal fatty acid binding protein or FABP 5; H-FABP: heart fatty acid binding protein or FABP 3.

Table 3

Fatty acid composition of red blood cell membrane lipids.

Fatty acids (g/100 g total fatty acids)	Adult	Aged	Aged + F0
16:0	27.31 ± 0.27	29.82 ± 0.40 ^a	32.65 ± 0.40 ^b
18:0	14.40 ± 0.33	12.76 ± 0.38 ^a	9.51 ± 0.26 ^b
18:1 <i>n</i> -9	5.51 ± 0.39	5.96 ± 0.26	5.89 ± 0.59
18:2 <i>n</i> -6	5.59 ± 0.63	5.84 ± 0.29	3.68 ± 0.27 ^b
20:4 <i>n</i> -6	23.26 ± 0.36	22.57 ± 0.15	11.39 ± 0.33 ^b
22:5 <i>n</i> -6	1.62 ± 0.04	1.06 ± 0.08 ^a	N.D.
18:3 <i>n</i> -3	N.D.	N.D.	N.D.
20:5 <i>n</i> -3	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	7.32 ± 0.51 ^b
22:5 <i>n</i> -3	0.17 ± 0.03	0.64 ± 0.14 ^a	3.49 ± 0.07 ^b
22:6 <i>n</i> -3	0.49 ± 0.07	1.47 ± 0.11 ^a	4.79 ± 0.26 ^b
Total saturated	51.27 ± 0.31	51.13 ± 0.27	53.08 ± 0.37 ^b
Total monounsaturated	13.71 ± 0.15	14.19 ± 0.41	15.13 ± 0.27
Total polyunsaturated	34.71 ± 0.32	34.34 ± 0.38	31.43 ± 0.34 ^b
Total <i>n</i> -6	33.83 ± 0.24	32.22 ± 0.25 ^a	15.72 ± 0.61 ^b
Total <i>n</i> -3	0.75 ± 0.10	2.03 ± 0.16 ^a	15.65 ± 0.41 ^b

N.D., not detected.

Data represent the mean ± S.E.M of measurements taken on 4-5 rats and were analyzed using a Student's t-test. ^a $p < 0.05$, adult vs. aged. ^b $p < 0.05$, aged vs. aged + FO.

Table 4

Levels of nuclear receptor PPAR δ , RAR α , RAR β , RXR α , RXR β and RXR γ mRNA in the hippocampus and striatum of adult, aged and aged + FO rats.

	<i>PPARδ</i>	<i>RARα</i>	<i>RARβ</i>	<i>RXRα</i>	<i>RXRβ</i>	<i>RXRγ</i>
<i>Hippocampus</i>						
Adult	0.96 \pm 0.06	1.36 \pm 0.11	0.94 \pm 0.06	1.24 \pm 0.06	2.08 \pm 0.15	1.46 \pm 0.14
Aged	1.06 \pm 0.06	1.26 \pm 0.05	1.13 \pm 0.05	1.49 \pm 0.05 ^a	1.52 \pm 0.19 ^a	1.09 \pm 0.19 ^a
Aged + FO	0.96 \pm 0.08	1.20 \pm 0.09	1.08 \pm 0.09	1.40 \pm 0.13	2.99 \pm 0.54 ^b	2.99 \pm 0.05 ^b
<i>Striatum</i>						
Adult	1.31 \pm 0.06	1.15 \pm 0.08	0.95 \pm 0.05	1.03 \pm 0.04	0.75 \pm 0.05	0.91 \pm 0.04
Aged	1.45 \pm 0.05	1.19 \pm 0.07	0.96 \pm 0.10	1.33 \pm 0.11 ^a	0.83 \pm 0.02	1.08 \pm 0.12
Aged + FO	1.56 \pm 0.14	1.44 \pm 0.10 ^b	0.84 \pm 0.04	1.25 \pm 0.09	0.74 \pm 0.03 ^b	0.81 \pm 0.04

Data represent the mean \pm S.E.M. and were analyzed using a Student's t-test ($n = 6-8$ rats per group). Target mRNA are relative levels and are expressed as the target/reference ratio normalized by the calibrator. ^a $p < 0.05$, adult vs. aged. ^b $p < 0.05$, aged vs. aged + FO.

Figure 1

Representative pictures of neurogenesis in the dentate gyrus. Examples of (A) Ki67-IR cells, (B) 3-week-old BrdU-IR cells and (C) DCX-IR cells in the granular cell layer (gcl). Scale bar = 50 μ m.

Quantitative analysis of the number of (D) Ki-67, (E) 3-week-old BrdU and (F) DCX-labeled cells in the whole dentate gyrus of adult (\square), aged (\blacksquare) and aged + FO (\boxtimes) rats. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using a Student's t-test ($n = 6-8$ rats per group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 2

Real-time-PCR mRNA quantification of neurotrophic factors, BDNF and NGF, and their receptors TrkA and TrkB in the hippocampus (A) and striatum (B) of adult, aged and aged + FO rats. Target mRNA are relative levels and are expressed as the target/reference ratio normalized by the calibrator. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using a Student's t-test ($n = 6-8$ rats per group). * $p < 0.05$.

Figure 3

Real-time-PCR mRNA quantification of fatty acid binding proteins B-FABP, E-FABP and H-FABP in the hippocampus (A) and striatum (B) of adult, aged and aged + FO rats. Target mRNA are relative levels and are expressed as the target/reference ratio normalized by the calibrator. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using a Student's t-test ($n = 5-8$ rats per group). * $p < 0.05$.

Chapitre 2

Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés n-3 sur les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire spatiale chez le rat âgé

I. Introduction

Les données bibliographiques obtenues au cours de ces dernières décennies plaident en faveur d'un rôle essentiel joué par les AGPI-LC n-3 dans le fonctionnement du cerveau adulte, et en particulier dans la plasticité hippocampique et les fonctions mnésiques (Su, 2010). Plusieurs modes d'action ont alors été proposés afin d'expliquer les effets exercés par ces nutriments, parmi lesquels figure la modulation de l'expression génique *via* l'activation de récepteurs nucléaires spécifiques, les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) mais aussi ceux de l'acide 9-*cis* rétinoïque, les RXR (retinoid X receptors). Le récepteur RXR, partenaire d'hétérodimérisation commun de plusieurs récepteurs nucléaires tels que ceux de l'acide rétinoïque (RAR) ou des PPARs, joue un rôle central dans la régulation de ces voies de signalisation (Germain et al., 2006b). Le mode d'action génique des acides gras met donc en évidence des relations fortes entre la voie de signalisation des acides gras (PPAR/RXR) et celle de l'acide rétinoïque (RAR/RXR). Récemment, un travail réalisé au laboratoire a montré qu'un apport alimentaire déséquilibré en acides gras (« high fat diet ») pouvait moduler la voie de signalisation des rétinoïdes, en modifiant l'expression des RAR et RXR et de leurs gènes cibles RC3 et GAP-43, impliqués dans la plasticité synaptique (Buaud et al., 2010). De plus, nos travaux précédents font également apparaître un effet des AGPI-LC n-3 sur l'expression de certaines isoformes des RXR et des RAR, dans l'hippocampe et le striatum de rats âgés (*Cf. Chapitre 1*).

D'autre part, des données ont montré l'existence d'une relation entre le niveau d'expression de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque, altéré au cours du vieillissement, la plasticité synaptique et les performances mnésiques (Etchamendy et al., 2001). Ainsi un traitement par l'acide rétinoïque de souris âgées restaure les niveaux

d'expression des RAR et RXR dans l'hippocampe et corrige la baisse de RC3 et les altérations de mémoire relationnelle évaluées dans le labyrinthe radial.

Dans ce contexte l'objectif de cette deuxième étude était d'examiner les effets d'un régime enrichi en AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, sur l'activité des voies de signalisation des acides gras (PPAR/RXR) et de l'AR (RAR/RXR), et l'expression de leurs gènes cibles, impliqués dans les processus de plasticité synaptique. Sur un plan fonctionnel, nous avons évalué les conséquences de cette supplémentation en AGPI-LC n-3 sur la mémoire spatiale de référence et de travail.

II. Méthodologie

Comme dans la première étude, des rats Wistar mâles âgés de 13 mois ont été nourris avec un régime à base d'huile de poisson (contenant 18 % d'EPA et 12 % de DHA) pendant 21 semaines. Parallèlement, des rats arrivés au sevrage ou âgés de 13 mois ont reçu un régime à base d'huiles d'arachide et de tournesol (50/50), dépourvu d'AGPI-LC n-3, pendant la même période. Au bout de 18 semaines de régime, l'ensemble des rats a été soumis à un test comportemental dans le labyrinthe aquatique de Morris afin d'évaluer les capacités d'apprentissage et la mémoire spatiale de référence et de travail. A la fin des 21 semaines de régime, le statut nutritionnel des rats a été déterminé en analysant la composition en acides gras des membranes érythrocytaires. Chez les trois groupes expérimentaux, nous avons également étudié le niveau d'expression de plusieurs isoformes des récepteurs nucléaires PPAR, RAR et RXR, et de leurs gènes cibles impliqués dans les processus de plasticité synaptique (RC3, GAP-43, GluR2, NR2B, PSD-95) dans l'hippocampe et le striatum.

III. Principaux résultats

Brièvement, nos résultats ont montré une augmentation des AGPI-LC n-3 (EPA, DPA et DHA), concomitante avec une diminution des AGPI n-6 (LA et ARA), dans les membranes érythrocytaires des rats âgés supplémentés en EPA/DHA, ce qui nous a permis de valider notre modèle nutritionnel. Dans l'hippocampe et le striatum, le niveau d'expression des ARNm codant pour RXR γ , altéré au cours du vieillissement, est maintenu par la supplémentation en EPA/DHA. De plus, le vieillissement induit une altération de l'expression des ARNm codant pour GAP-43, NR2B et PSD-95 dans l'hippocampe et le striatum. Néanmoins, la supplémentation en AGPI-LC n-3 des animaux âgés restaure le niveau d'expression de GAP-43 et induit une surexpression de RC3 dans l'hippocampe. L'ensemble de ces modifications est associé à une amélioration de la mémoire de travail chez les animaux âgés supplémentés.

I.V. Conclusion

Cette étude conforte les propriétés neuroprotectrices des AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, grâce à une amélioration de la plasticité synaptique, et suggère que le RXR γ pourrait tout particulièrement être impliqué dans ces effets. L'ensemble de ces modifications biochimiques contribuerait à une amélioration de la mémoire spatiale de travail.

**Fish oil supplementation in aged rats improves spatial working memory and increases
GAP-43 and RXR γ mRNA expression in the hippocampus**

J. Commère Oustric¹, C. Georgeon Chartier¹, K. Touyarot¹, C. Vaysse², P. Higuieret¹,

V. Pallet^{1§**} and S. Alfos^{1‡§}

¹ *Université de Bordeaux, IPB, Unité de Nutrition et Neurosciences EA2975, Avenue des
Facultés, 33405 Talence Cedex, France*

² *ITERG – Equipe Nutrition Métabolisme & Santé, 33405 Talence Cedex, France*

§ Corresponding authors: Professor V. Pallet, Tel: +33 5 40 00 87 21, e-mail: veronique.pallet@enscbp.fr; and S. Alfos, Tel: +33 5 40 00 34 53, e-mail: serge.alfos@enscbp.fr

** These authors contributed equally to this work

Abstract

The central nervous system is highly enriched in long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) and mainly docosahexaenoic acid (DHA), a LC-PUFA of the n-3 series. Numerous studies suggest that n-3 LC-PUFAs are essential for adult brain function and are involved in the maintenance of cognitive functions during aging. It has been proposed that n-3 LC-PUFAs maintain learning and memory abilities by strengthening synaptic plasticity which is altered during aging. Several mechanisms might be involved in the neurobiological effects of n-3 LC-PUFAs including the regulation of gene transcription by binding to nuclear receptors: the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and the retinoid X receptor (RXR). RXR is the common dimerization partner of numerous receptors, including PPAR and the retinoic acid receptor (RAR). Therefore, we investigated in aged rats the effect of a fish oil (FO) dietary supplementation, rich in n-3 LC-PUFAs, on spatial memory and both on the fatty acids and retinoid signaling pathways and on some of their target genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus and the striatum. Our results showed that FO supplementation for 18 weeks improved spatial working memory which was altered in aged rats. In the hippocampus, FO supplementation reversed the age-related decrease in RXR γ mRNA level and increased RXR α mRNA level. This was associated with transcriptional changes in synaptic plasticity-associated target genes. Indeed, FO supplementation reversed the age-related decrease in GAP-43 mRNA level and increased RC3 mRNA expression. These results suggest that RXR signaling pathway might be involved in the beneficial effects of n-3 LC-PUFAs on working memory during aging by modulating the expression of genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus.

Keywords: age, n-3 long chain polyunsaturated fatty acids; spatial memory; synaptic plasticity; retinoic acid receptors (RAR), retinoid X receptors (RXR), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR).

1. Introduction

Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 *n*-3) is a long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) of the *n*-3 series, derived from the precursor α -linolenic acid (ALA, 18:3 *n*-3) through a series of desaturation and elongation reactions [1]. DHA, which the primary dietary source is fish, is highly enriched in the central nervous system, suggesting that this PUFA plays an important role in brain functions. Indeed, minor changes in nerve cell membrane phospholipid composition for this FA, as seen during aging, is sufficient to lead to alterations in brain functions such as memory loss and learning disabilities [2]. Animal studies have shown that *n*-3 PUFAs deficiency reduces DHA concentration in the brain and impairs cognitive functions, including spatial memory measured in the Morris water maze [3]. Moreover, in aged mice, DHA supplementation improves the age-related cognitive dysfunction [4]. Neurobiological basis that support these behavioral changes have been widely studied for last decades. In particular, it has been suggested that *n*-3 PUFAs maintain memory performances by strengthening synaptic plasticity [5]. This form of plasticity corresponds to the remodeling and reinforcement of connections between neurons. Thus, in 24-26 month-old rats, *n*-3 PUFA supplementation for 12 weeks reverses the age-related decrease in the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor subunit GluR2 and N-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor subunit NR2B, proteins implicated in synaptic plasticity, in the hippocampus and the striatum [6]. Moreover, He et al. [7] have also shown in adult (12-week-old) fat-1 transgenic mice, with high endogenous DHA levels compared to wild-type mice, an up-regulation of synaptic genes such as neuromodulin (GAP-43) and post-synaptic density protein-95 (PSD-95) in the hippocampus, associated with an improvement in water maze memory performances. These studies suggest that *n*-3 PUFAs supplementation promote synaptic genes and protein expression, thus increasing

synaptogenesis and neurite outgrowth to maintain memory function. At the moment, various mechanisms of action of n-3 PUFAs in the brain have been proposed, including the regulation of gene transcription [2]. Indeed, PUFAs are able to modulate gene expression by binding and activating nuclear receptors belonging to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily. It has first been shown that FAs are natural endogenous activators of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) [8], but more recently, some FAs, such as the DHA, have also been described as activators of the retinoid X receptor (RXR) [9, 10]. RXR, which can also be activated by the 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA, an active metabolite of vitamin A) [11], is the common dimerisation partner of numerous receptors, including the PPAR and the retinoic acid receptor (RAR, activated by all-*trans* RA). There is thus a close relationship between retinoid and FA signaling pathways [12, 13], and we have recently shown that FA dietary intake could modify the equilibrium between these two pathways [14]. Moreover, the retinoid signaling pathway also plays crucial roles in synaptic plasticity, *via* the regulation of genes encoding synaptic plasticity proteins such as the neurogranin (RC3) and GAP-43, and memory processes during aging [15].

The present study therefore investigates in aged rats, the impact of a fish oil dietary supplementation, rich in n-3 LC-PUFAs, on brain FAs and retinoid signaling pathways activity, and the consequences on the expression of synaptic plasticity markers, potentially regulated by FAs and/or RA, and on spatial learning and memory performances. In order to address this issue, we evaluated spatial reference and working memory performances using the Morris water maze. Furthermore, we quantified gene expression of RXR, PPAR and RAR, nutrient-activated transcription factors, in the hippocampus and the striatum, structures involved in learning and memory. Finally, gene and protein expression of GluR2, NR2B, PSD-95, GAP-43 and RC3, involved in synaptic plasticity and potentially regulated by FAs and/or retinoid signaling pathways, were examined.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

Three-week-old (weaning) and 13-month-old male Wistar rats were purchased from Janvier (France). They were first housed two per cage in a room with controlled temperature (21-23°C), humidity and airflow conditions, and a fixed 12:12 light-dark cycle. The rats were given *ad libitum* access to food and water. One week prior to the beginning of behavioral testing until sacrifice, all animals were individually housed. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations.

Animals were randomly assigned to one of the following experimental group: 13-month-old rats ($n = 10$) supplemented with a fish oil (FO) enriched diet, 3-week-old rats ($n = 8$) and 13-month-old rats ($n = 11$) receiving a low-EPA/DHA diet. The same diets as previously described [16] were given for 21 weeks; their compositions are presented in Table 1. The FO diet involved the addition of fish oil (OMEGAVIE® 1812 TG, Polaris, France), containing 18% EPA and 12% DHA as triglycerides, to a standard laboratory chow (UPAE-INRA, France). The low-EPA/DHA diet was made of peanut and sunflower oils (50/50) added to the standard laboratory chow. At the end of the 21-week period, food was withdrawn overnight and animals were sacrificed by decapitation the following morning. Blood was collected from the sectioned jugular vein and rapidly centrifuged to obtain red blood cells (RBC), which were stored at -80°C until used for lipid analysis. The brain was rapidly removed, and the individual brain regions (whole hippocampus and striatum) of each hemisphere were dissected out, rapidly frozen and stored at -80°C until used for western blot and qRT-PCR analysis.

2.2. *Water-maze testing*

Rats were tested in a Morris water maze (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (21-22°C) made opaque by addition of soluble nontoxic white paint. Before the start of testing, animals were habituated to the pool without the platform for 1 min/day for 2 days. After rats have to develop a spatial map of the extra-maze cues, which it then uses to locate an escape platform hidden 2 cm below the surface of the water (place or spatial version). The distance swum to the platform, as well as the latency to reach the platform, was measured with a computerized tracking system (Videotrack, Viewpoint, Lyon, France).

Reference and working memory performances were evaluated according to the protocol of Wainwright et al. [17] modified as follow.

Spatial reference memory version. On the first 9 days (acquisition stage), the rats were required to find the hidden platform, located in a fixed position, by using distal extramaze cues. There was one testing session per day, with four trials per session. On each trial, the rat was placed, facing the wall, in one of the four quadrants in the tank, and allowed to swim for a maximum of 90 s. Once the rat finds the platform, it remained there for 60 s before being returned to a different start point in the pool. Each of the four trials was started from a different quadrant, with the order determined pseudorandomly (not twice from the same quadrant) and varying from day to day. The distance swum to the platform should decrease over testing sessions (days) as the rat learns the location of the platform.

After the last training day, on day 10, animals were placed for 60 s in the pool without the platform (probe test). Performance was evaluated by the percentage of time spent in the quadrant where the platform was during acquisition (target quadrant). It is expected that if the rat has learned the location of the platform in relation to the extra-maze cues, its initial

response on the probe trial will be to swim directly to the target quadrant. Thus the distance swum and time spent in the quadrant should be greater than that in the other quadrants.

Spatial working memory version. After a 2-day interval following the probe trial, the rats were tested with the maze set up as previously, but with the following variation in the procedure. In each testing session, the rat received a pair of trials in which the start position was varied pseudorandomly, but the platform remaining in the same place. However, in contrast to the reference memory protocol, the localization of the platform moved to a different location between testing sessions, for 6 days. On the first 3 days, the intertrial interval (ITI) was 30 s, with the rats swimming for a maximum of 90 s on each trial and being allowed to remain on the platform for 30 s. Then, on the last 3 days, the ITI was 2 min. In this version of the task, each of the testing sessions can be considered as a separate “problem” in which the first of the two trials is a search trial and the second a test trial that measures the rat’s ability to remember the platform location from the immediately preceding trial. A significantly shorter distance (and latency) on the second trial is considered as an evidence of working memory.

Cued version. The rats were tested for another day (one session with four trials) on the cued version of the maze where the location of the platform is indicated by some prominent visual cue attached to the platform (intramaze cues). Differences in performance on this task would be indicative of alterations in the sensory, motor or motivational attributes of the animals.

2.3. *Quantitative real-time PCR*

Extraction of total RNA from the hippocampus and striatum was conducted using TRIzol reagent (Invitrogen, France), according to the manufacturer’s instructions. The concentration of the purified RNA was determined spectrophotometrically on a Nanodrop ND-1000 (Labtech, France) and their integrity was checked using RNA-6000 Nano LabChip kit in combination with the Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Preparation of cDNA

and mRNA quantification by real-time PCR were performed as previously described [16]. The oligonucleotides primers for peptidylpropyl isomerase B (Ppib, housekeeping gene), PPAR δ , RAR α , RAR β , RXR α , RXR β , RXR γ , GAP-43 and RC3 were the same as those previously used [14, 16]. The forward and reverse primer sequences for GluR2, NR2B and PSD-95 are shown in Table 2. Results were normalised by calculating the ratio of the concentration of the target gene to that of the reference gene Ppib in the same sample. We verified that the expression level of Ppib was unaffected by our experimental conditions.

2.4. Western blot analysis

Hippocampi and striatum from one hemisphere of adult and aged rats on a low-EPA/DHA diet or FO diet were used for protein analysis by Western blot. Total proteins were extracted as previously described by Dyall et al. [6] and protein content was determined by the Bradford assay [18]. Western blot analysis was performed as previously described [19]. Briefly, aliquots containing 20 μ g of total proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblots were carried out using a monoclonal mouse anti- β -actin antibody (diluted 1:8000, Sigma, France), a polyclonal rabbit anti-neurogranin antibody (diluted 1:20000, Affiniti Research, UK), a polyclonal rabbit anti-neuromodulin antibody (diluted 1:10000, Interchim, France) and a polyclonal goat anti-GluR2 antibody (diluted 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA). After washing, the membranes were incubated with relevant secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Following washes, the bands were visualized with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, France). The staining intensity of protein bands was determined using Quantity One analysis software (Biorad, France). The relative levels of proteins in aged and aged + FO rats were determined as a percentage of the same proteins in adult rats. The constant level of β -actin was verified and found to be identical in all groups (data not shown).

2.6. Lipid analysis

Total lipids of RBC membranes were extracted and analysed as previously described [16].

2.7. Statistical analysis

The results are expressed as mean values with their standard errors. The statistical significance of differences between means was calculated by analyses of variance (ANOVA). When appropriate, Student's t-test were performed (1) between the adult and aged groups in order to analyze the effect of age, and (2) between the aged and aged + FO groups to analyze the effect of n-3 LC-PUFA supplementation. The minimum level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Status of lipids

Table 3 shows the FA composition of RBC membrane total phospholipids as a percentage of the total FA content in adult, aged and aged + FO rats. Briefly, our results show greater amount of linoleic acid (LA, 18:2 n-6, + 20%, $p < 0.01$) and smaller amount of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-6, - 50%, $p < 0.001$) in aged compared to adult rats. Moreover, aged rats also exhibited increased level of total n-3, due to greater amount of DPA n-3 (+ 260%, $p < 0.01$) and DHA (+ 225%, $p < 0.01$). In FO-fed aged rats, the FA composition of RBC membranes exhibited a markedly decrease in total n-6 PUFAs whereas n-3 PUFAs were increased fivefold, when compared with aged rats. The diet-related decrease in n-6 PUFAs concerned both the precursor LA (- 39%, $p < 0.001$) and its derivative arachidonic acid (AA, 20:4 n-6, - 44%, $p < 0.001$). However, the diet-related increase in n-3

PUFA was due to the long-chain derivatives eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3), DPA n-3 and DHA.

3.2. Effects of aging and fish oil supplementation on spatial learning and memory

Spatial learning and reference memory. The swimming speed of rats during the acquisition of place learning, presented in Figure 1 A1, exhibited a main effect of experimental groups ($F_{(2, 26)} = 13.240, p < 0.001$), with adult rats swimming faster than aged. When examining the distances swum on the acquisition of place learning, shown in Figure 1 A2, there was a main effect of days ($F_{(8, 16)} = 9.138, p < 0.001$) with a progressive decrease in the distance covered to reach the hidden platform over the nine days of training, meaning that rats learn this task. Moreover, we observed a groups x days interaction ($F_{(16, 208)} = 2.984, p = 0.001$). Then, when comparing adult and aged rats only, there was no significant effect of age ($F_{(1, 17)} = 3.219, p = 0.09$), but an age x days interaction, $F_{(8, 136)} = 4.818, p < 0.001$ on the distance swum. When examining in particular the day 9, there was an effect of age ($p < 0.05$) revealing that aged rats swam longer distances than adult rats (9.7 m vs. 4.5 m). However, when comparing aged and aged + FO rats, there was no effect of diet ($F_{(1, 19)} = 1.331, p > 0.05$), nor diet x days ($F_{(8, 152)} = 1.170, p > 0.05$) interaction on the distance swum.

On the probe trial, shown in Figure 1 B, there were no effect of age and diet. Rats failed to display a memory for the platform location, as indicated by a percent time swimming in the target quadrant around the chance level (25 %).

Working memory. Distances swum to locate the platform on trial 2 (test trial) are presented in Figure 2, since trial 1 is a “search trial” where rats have never seen the platform position. When comparing adult and aged rats, there was an effect of age at the ITI of 30 s ($F_{(1, 17)} = 8.882, p < 0.01$) and at the ITI of 2 min ($F_{(1, 17)} = 13.522, p < 0.01$). Aged rats swam greater distances to reach the platform than did adult, revealing worst working memory

performances. When comparing aged and aged + FO rats, there was an effect of diet at the ITI of 30 s ($F_{(1, 19)} = 4.866, p < 0.05$) with aged rats swimming greater distances than supplemented aged rats, meaning better working memory performances for the aged + FO group. When the ITI was 2 min, aged + FO rats seem to better perform in the test than did aged rats even though the difference did not reach statistical significance ($p = 0.1$).

Cued Learning. On the cued learning, the distances swum to find the visible platform were identical for the different groups (data not shown). This indicates that there was no difference in motor or visual capabilities, thigmotaxic behavior, or more generally differences in health status.

3.3. Effects of aging and fish oil supplementation on nuclear receptors expression in the hippocampus and the striatum

As presented in Figure 3 A, in the hippocampus, aging increased the expression of RXR β (+ 39%, $p < 0.01$) and decreased the expression of RAR α mRNA (- 17%, $p < 0.05$) and RXR γ mRNA (- 16%, $p < 0.05$); FO feeding restored the age-related decrease in RXR γ mRNA, when compared aged and aged + FO rats (+ 33%, $p < 0.05$). Moreover, the supplementation also increased RXR α mRNA expression in the hippocampus of aged rats (+ 23%, $p < 0.05$).

In the striatum (Fig. 3 B), aging decreased the expression of RAR β mRNA (- 22%, $p < 0.05$) and RXR γ mRNA (- 19%, $p < 0.05$). Nevertheless, FO feeding restored mRNA levels of RAR β (+ 30%, $p < 0.01$) and RXR γ (+ 23%, $p < 0.05$), when compared aged and aged + FO rats. Moreover, in the striatum, the FO supplementation increased PPAR δ mRNA expression in aged rats (+ 27%, $p < 0.001$).

3.4. Effects of aging and fish oil supplementation on synaptic plasticity protein and gene expression in the hippocampus and the striatum

As shown in the Figure 4 A, in the hippocampus aging decreased the expression of GAP-43 (- 23 %, $p < 0.01$), NR2B (- 13%, $p < 0.05$) and PSD-95 (- 23%, $p < 0.05$) mRNA. The FO supplementation restored the age-related decrease in GAP-43 (+ 27%, $p < 0.001$), when aged and aged + FO were compared. Moreover, the supplementation increased mRNA level of RC3 in aged rats (+ 18%, $p < 0.05$).

In the striatum (Fig. 4B), results show an age-related decrease of GAP-43 (- 22%, $p < 0.01$), GluR2 (- 14%, $p < 0.05$), NR2B (- 17%, $p < 0.01$) and PSD-95 (- 12%, $p < 0.05$) mRNA. Expression level of RC3 mRNA also decreased with aging but it did not reach statistical significance (- 11%, $p = 0.09$). In this structure, FO supplementation had no effect on the synaptic plasticity markers studied.

As shown in Figure 5, protein expressions of RC3, GAP-43 and GluR2 did not presented any statistical differences between experimental groups in the hippocampus and the striatum. Nevertheless, in the striatum, GluR2 expression decreased with aging, but it did not reach statistical significance (- 35%, $p = 0.06$).

4. Discussion

4.1. Nutritional status of rats

To assess our nutritional model and objectify the nutritional impact of FO, we analyzed the FA composition of total phospholipids from RBC membranes. In brief, we observed an increase in n-3 PUFAs, concomitantly to a decrease in n-6 PUFAs in the RBC membranes of aged + FO rats, which confirms the efficacy of FO supplementation. On the other hand, rats fed the low EPA/DHA diet, exhibited very low levels of n-3 PUFAs and high

levels of n-6 PUFAs. Similar results have previously been observed [16]. Moreover, on the basis of a recent work [20] we suggested that the modifications observed in the RBC should reflect variations in brain cellular membranes.

4.2. Effects of aging and fish oil supplementation on learning and spatial memory

In our study, distance can be considered a better measure of performances in the maze than latency because it will not be affected by possible differences in performance factors such as swimming speed. Thus, all our results were based on the measure of swum distance. In the spatial reference memory version, difference in learning abilities has been observed between adult and aged rats. Both groups did not learn the platform position in the same way. Adult rats seemed to learn faster and better than did aged rats. Indeed, the last day of the learning stage, adult rats swam a significantly shorter distance to reach the submerged platform than aged rats, revealing better knowledge of the platform position. Similar differences have previously been described [21, 22]. Nevertheless, on the probe trial, both groups show poor reference memory performances and no difference between groups has been observed. Altogether, these results suggest that rats have learned the platform position using another strategy (non-spatial), leading to a failure at the probe test. In the spatial working memory version, results show an age-related impairment at both ITI used. Similar results have previously been observed [23]. Indeed, performance in the maze, including the working memory paradigm, has been shown to deteriorate with aging, due to specific deficit in the ability of aged rats to utilize spatial information [24]. Memory deficits evidenced in aged rats did not result from visual alterations or motor impairments, as they were able to find a visible platform.

When aged rats were fed the FO enriched diet, no changes in spatial learning and reference memory were observed, but the supplementation has partially maintained working

memory abilities. Thus, altogether our results and others suggest that, when studying rat models with modified FA status, the working memory test of the Morris maze, may be more sensitive than the reference memory version [17, 25]. Nevertheless, other authors have shown positive effects of DHA on learning and memory abilities of aged mice using other behavioural tests such as the step-through test and the passageway water maze [4]. Moreover in 24-month-old rats fed a fish oil-deficient diet through three generations, DHA administration for 5 weeks significantly decreased the number of reference memory errors and working memory errors measured in the radial maze [26]. Finally, one very recent work on aged (20-22 months) rats fed a control, or a n-3 EPA, or a n-3 DPA diet have shown positive effects of n-3 enriched diets on spatial learning performances in the Morris water maze [27]. Thus, all these studies used different nutritional models and different behavioural tests with various protocols, leading to differences in results interpretation. Nevertheless, n-3 LC-PUFAs seem to affect spatial memory in a positive way. Moreover, interestingly, Shukitt-Hale et al. [24] show that spatial working memory declines early in the lifespan of the male F344 rats, between 6 and 12 months of age; suggesting that prevention of this adverse change should be initiated early in the life of rat, i.e., 6 months of age. In our model, rats were supplemented from 13 months and this could be too late to totally reverse working memory deficits. Indeed, in the present study we have only partially reversed working memory abilities since performances at 2 min-ITI tended to decrease in the aged + FO group but it did not reach statistical significance.

4.3. Effects of aging and fish oil supplementation on FA and RA nuclear receptors

In our study we have shown a hypo-expression of retinoid signaling pathway with aging, characterized by a decrease in RAR α and RXR γ in the hippocampus and in RAR β and RXR γ in the striatum. These results are in agreement with previous [6, 15, 28]. All these

decreases were fully restored by FO supplementation except for RAR α whose increase did not reach statistical significance. In a previous work, we have already shown that FO supplementation could modulate RXR γ mRNA expression in aged rats [16]. The RXR is a key nuclear receptor, being involved in many signaling pathways. In particular, FAs and RA signaling are closely linked, notably because this nuclear receptor can be activated by 9-*cis* RA but also by FAs such as DHA [9]. Moreover RXR could heterodimerize with other nuclear receptors, such as PPAR and RAR, and thereby allows the transcription of target genes. It has also been demonstrated that RXR homodimers could activate PPAR target genes, by selectively binding to a functional PPRE, inducing transactivation [29]. We could thus hypothesized that DHA, contained in the FO diet, would activate RXR γ and induced the transcription of target genes, including their own genes, through activation of RXR signaling pathway (RXR/PPAR or RXR/RAR, for example). Interestingly, Wietrych et al. [30] have shown that RAR β and RXR γ double mutant appeared deficient in spatial working memory. In particular, RXR γ , but not RAR β single null mutant mice exhibited deficits similar to those observed in the double mutants, suggesting that RXR γ should be the functionally predominant receptor involved in the modulation of working memory. Thus, in the present study the restoration of RXR γ mRNA levels could explain in part the improvement in spatial working memory observed in FO-fed aged rats. Moreover, our results show that FO supplementation increased PPAR δ mRNA levels in the striatum. The role of this isoform in the neurobiological processes is still poorly known. Some studies have suggested that PPAR δ could be involved in oligodendrocyte precursor cells differentiation [31], but its action on neuronal differentiation is still under investigation. One study has shown that, exposure of PPAR δ expressing cells to PPAR δ agonists triggers neuronal differentiation [32]. Nevertheless, at the

moment we do not know the functional significance of an increase in this isoform in the striatum.

4.4. Effects of aging and fish oil supplementation on synaptic plasticity

Our results show an age-related decrease in GAP-43, NR2B and PSD-95 mRNA levels in the hippocampus and the striatum. Mingaud et al. [33] have previously shown a decrease in the level of GAP-43 mRNA in the hippocampus of 21-23 months old mice, when compared with 4-5 months old mice. Interestingly, this decline was associated with an hypo-expression of retinoid signaling and deterioration in short-term/working memory. Concerning NR2B, an age-related decrease in mRNA level has previously been shown in the dentelate gyrus of the hippocampus [34]. Moreover, the hippocampal decrease in NR2B protein content in 26 months old mice (compared with 4-month-old mice), was associated with long-term spatial memory deficits [35]. For PSD-95, VanGuilder et al. [36] revealed altered protein expression in hippocampal synaptosomes from aged rats (26 months) compared with young-adult rats (3 months). Other authors have observed in the cortex of aged rats cognitively impaired, significant changes in the ratio of PSD-95/synapse-associated protein-90 kDa (SAP90), compared to young rats [37]. Furthermore, our results show an age-related decrease in the striatal level of GluR2 mRNA. Dyall et al. [6] have previously observed decreased protein content of GluR2 subunit in the striatum of 24-26 months old rats. In the present study, we show for the first time that FO supplementation in aged rats restored GAP-43 mRNA levels to that of adult rats. He et al. [7] have previously shown increased expression of synaptic genes in the hippocampus, including those coding for GAP-43, and better water-maze learning memory performance in fat-1 transgenic mice with high endogenous DHA levels compared to the wild-type mice. Furthermore, our supplementation enriched in *n-3* LC-PUFAs also significantly increased RC3 mRNA level in the hippocampus of aged rats. This is a very

interesting result knowing the important role of RC3, a Ca^{2+} -sensitive calmodulin-binding protein, in hippocampal long-term potentiation (LTP) and spatial learning [38]. Moreover, RC3 is traditionally known as a target gene of RA, and this is the first time it has been shown that this gene could also be regulated by n-3 LC-PUFAs. Altogether, our results suggest that n-3 LC-PUFAs could reverse some aging alterations on synaptic plasticity related genes and then improve working memory performances. Other authors also suggested that FA and RA could reverse age-related synaptic plasticity changes, likely through the activation of NR and target genes [5, 15]. Nevertheless, note that in our conditions, none of the quantified proteins in the hippocampus and the striatum exhibited any variations between groups. Divergences with the literature concerning these protein levels, could be explain by the quantification method (western bolt vs. immunohistochemistry), the ages of animals, the duration and the dose of the supplementation used.

In conclusion, altogether our results suggest that the hypo-expression of retinoid signaling during aging would contribute to alterations in synaptic plasticity related genes, leading to working memory deficits. More interestingly, the present study highlights an interaction between fatty acid and retinoid signaling pathways. Specifically, our data suggest that dietary n-3 LC-PUFAs could regulate $\text{RXR}\gamma$ in aged rats, contributing to increase GAP-43 and RC3 mRNA, synaptic plasticity associated genes also regulated by RA, then leading to improved cognitive functions, in particular spatial working memory. Now, further investigations are needed, to optimize and accentuate the neuroprotective effects of n-3 LC-PUFAs in aging disorders.

References

- [1] Jump, D.B., *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem, 2002. 277(11): p. 8755-8758.
- [2] Alessandri, J.M., P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, S. Aid, C. Poumes-Ballihaut, G. Champeil-Potokar and M. Lavialle, Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*, 2004. 44(6): p. 509-38.
- [3] Fedorova, I. and N. Salem, Jr., Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006. 75(4-5): p. 271-89.
- [4] Jiang, L.H., Y. Shi, L.S. Wang and Z.R. Yang, The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem*, 2009. 20(9): p. 735-41.
- [5] Su, H.M., Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem*, 2010. 21(5): p. 364-73.
- [6] Dyall, S.C., G.J. Michael, R. Whelpton, A.G. Scott and A.T. Michael-Titus, Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging*, 2007. 28: p. 424-439.
- [7] He, C., X. Qu, L. Cui, J. Wang and J.X. Kang, Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(27): p. 11370-5.
- [8] Chambrier, C., J.P. Bastard, J. Rieusset, E. Chevillotte, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, B. Hainque, J.P. Riou, M. Laville and H. Vidal, Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res*, 2002. 10(6): p. 518-25.

- [9] de Urquiza, A.M., S. Liu, M. Sjoberg, R.H. Zetterstrom, W. Griffiths, J. Sjoball and T. Perlmann, Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*, 2000. 290(5499): p. 2140-4.
- [10] Lengqvist, J., A. Mata De Urquiza, A.C. Bergman, T.M. Willson, J. Sjoball, T. Perlmann and W.J. Griffiths, Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(7): p. 692-703.
- [11] Zetterstrom, R.H., E. Lindqvist, A. Mata de Urquiza, A. Tomac, U. Eriksson, T. Perlmann and L. Olson, Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(2): p. 407-16.
- [12] van Neerven, S., E. Kampmann and J. Mey, RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol*, 2008.
- [13] Krzyzosiak, A., M. Szyszka-Niagolov, M. Wietrzych, S. Gobaille, S. Muramatsu and W. Krezel, Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 2010. 66(6): p. 908-20.
- [14] Buaud, B., L. Esterle, C. Vaysse, S. Alfos, N. Combe, P. Higuieret and V. Pallet, A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr*, 2010: p. 1-10.
- [15] Etchamendy, N., V. Enderlin, A. Marighetto, R.M. Vouimba, V. Pallet, R. Jaffard and P. Higuieret, Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci*, 2001. 21(16): p. 6423-9.
- [16] Commère Oustric, J., C. Georgon Chartier, K. Touyarot, C. Vaysse, P. Higuieret, S. Alfos and V. Pallet, Fish oil supplementation in aged rats restores retinoid and fatty

- acid signaling pathways and improves neurogenesis in the hippocampus. *Neurobiology of aging*, 2010. in submission.
- [17] Wainwright, P.E., H.C. Xing, G.R. Ward, Y.S. Huang, E. Bobik, N. Auestad and M. Montalto, Water maze performance is unaffected in artificially reared rats fed diets supplemented with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *J Nutr*, 1999. 129(5): p. 1079-89.
- [18] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
- [19] Boucheron, C., S. Alfos, V. Enderlin, M. Husson, V. Pallet, R. Jaffard and P. Higuieret, Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging*, 2006. 27(9): p. 1326-34.
- [20] McNamara, R.K., J. Able, R. Jandacek, T. Rider and P. Tso, Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. 34(4): p. 532-9.
- [21] Driscoll, I., S.R. Howard, J.C. Stone, M.H. Monfils, B. Tomanek, W.M. Brooks and R.J. Sutherland, The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, 2006. 139(4): p. 1173-85.
- [22] Bizon, J.L., H.J. Lee and M. Gallagher, Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell*, 2004. 3(4): p. 227-34.
- [23] Shukitt-Hale, B., V. Cheng and J.A. Joseph, Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci*, 2009. 12(3): p. 135-40.

- [24] Shukitt-Hale, B., G. Mouzakis and J.A. Joseph, Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Exp Gerontol*, 1998. 33(6): p. 615-24.
- [25] Wainwright, P.E., H.C. Xing, T. Girard, L. Parker and G.R. Ward, Effects of dietary n-3 deficiency on Morris water-maze performance and amphetamine-induced conditioned place preference. *Nutr Neurosci*, 1998. 1: p. 281-293.
- [26] Gamoh, S., M. Hashimoto, S. Hossain and S. Masumura, Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001. 28(4): p. 266-70.
- [27] Kelly, L., B. Grehan, A.D. Chiesa, S.M. O'Mara, E. Downer, G. Sahyoun, K.A. Massey, A. Nicolaou and M.A. Lynch, The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol Aging*.
- [28] Enderlin, V., V. Pallet, S. Alfos, E. Dargelos, R. Jaffard, H. Garcin and P. Higuieret, Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett*, 1997. 229: p. 125-129.
- [29] IJpenberg, A., N.S. Tan, L. Gelman, S. Kersten, J. Seydoux, J. Xu, D. Metzger, L. Canaple, P. Chambon, W. Wahli and B. Desvergne, In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *Embo J*, 2004. 23(10): p. 2083-91.
- [30] Wietrzych, M., H. Meziane, A. Sutter, N. Ghyselinck, P.F. Chapman, P. Chambon and W. Krezel, Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem*, 2005. 12(3): p. 318-26.
- [31] Hall, M.G., L. Quignodon and B. Desvergne, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta in the Brain: Facts and Hypothesis. *PPAR Res*, 2008. 2008: p. 780452.
- [32] Cimini, A., E. Benedetti, L. Cristiano, P. Sebastiani, M.A. D'Amico, B. D'Angelo and S. Di Loreto, Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and

- retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience*, 2005. 130(2): p. 325-37.
- [33] Mingaud, F., C. Mormede, N. Etchamendy, N. Mons, B. Niedergang, M. Wietrzyk, V. Pallet, R. Jaffard, W. Krezel, P. Higuere and A. Marighetto, Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci*, 2008. 28(1): p. 279-91.
- [34] Zhao, X., R. Rosenke, D. Kronemann, B. Brim, S.R. Das, A.W. Dunah and K.R. Magnusson, The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience*, 2009. 162(4): p. 933-45.
- [35] Magnusson, K.R., Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *J Neurosci*, 2000. 20(5): p. 1666-74.
- [36] VanGuilder, H.D., H. Yan, J.A. Farley, W.E. Sonntag and W.M. Freeman, Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem*. 113(6): p. 1577-88.
- [37] Majdi, M., A. Ribeiro-da-Silva and A.C. Cuello, Cognitive impairment and transmitter-specific pre- and postsynaptic changes in the rat cerebral cortex during ageing. *Eur J Neurosci*, 2007. 26(12): p. 3583-96.
- [38] Pak, J.H., F.L. Huang, J. Li, D. Balschun, K.G. Reymann, C. Chiang, H. Westphal and K.P. Huang, Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(21): p. 11232-7.

- [39] Folch, J., M. Lees and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 1957. 226(1): p. 497-509.

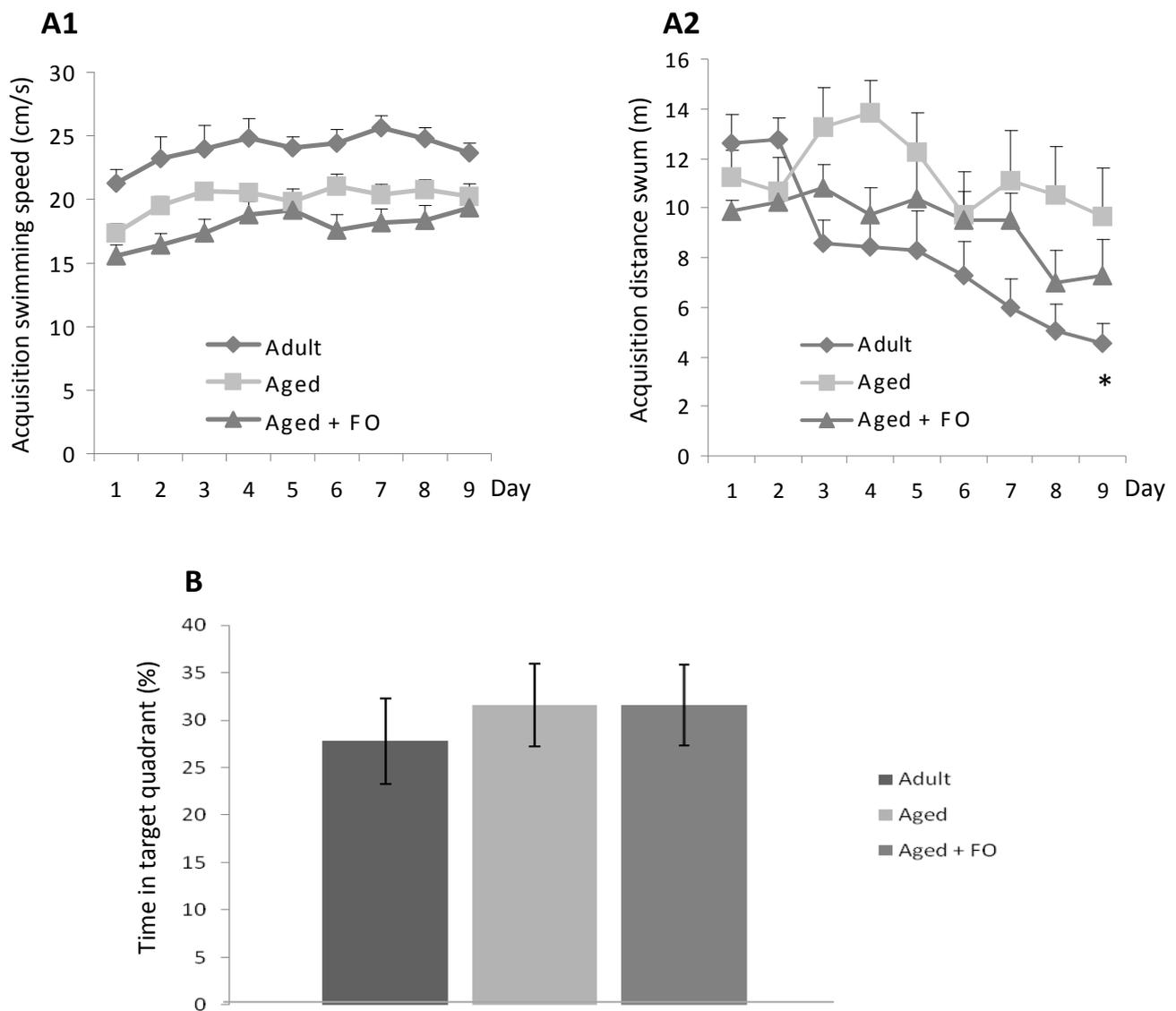


Figure 1

Learning abilities and spatial memory performances of adult, aged and aged + fish oil (FO) rats, in the Morris Water Maze. The figure shows (A1) mean swimming speed of each experimental group over 9 days of acquisition; (A2) mean distance swum over days to locate a hidden platform in a fixed position; and (B) percentage of time spent by rats in the target quadrant with the platform removed. Values represent group means \pm SEM, $n = 8-11$ rats, * $p < 0.05$.

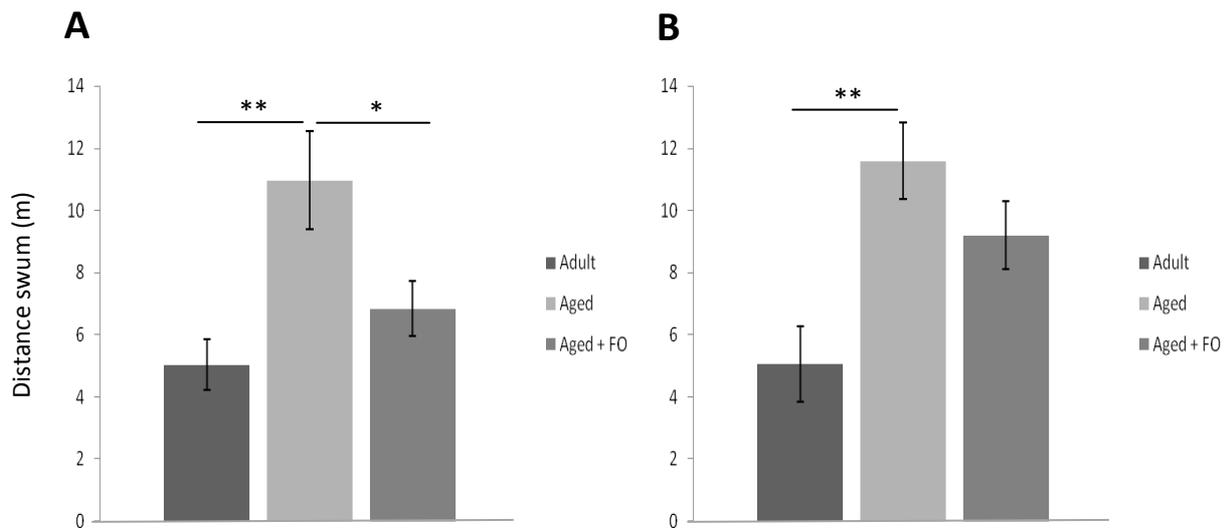


Figure 2

Morris water maze performance of adult, aged and aged + fish oil (FO) rats, in the spatial working memory test version. The hidden platform was moved to a different location for each day and rats received a pair of trials. Two different intertrial intervals (ITI) were tested: (A) 30 seconds and (B) 2 minutes. Histograms show mean distance to locate the platform on trial 2 (test trial). Scores were averaged across problems with the same ITI, and values represent means \pm SEM, $n = 8-11$ rats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

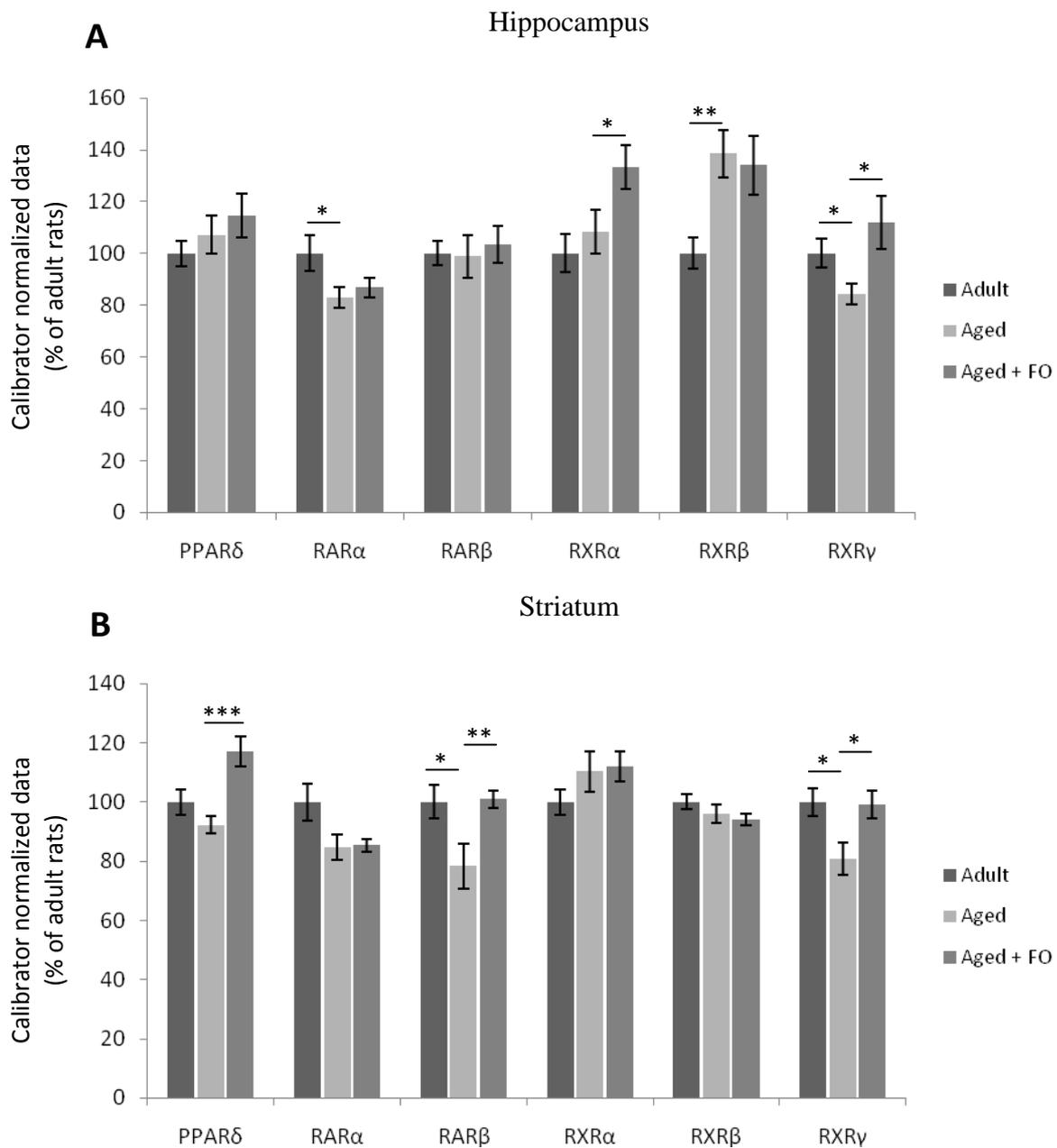


Figure 3

Quantification of nuclear receptors mRNA expression by quantitative RT-PCR. Histograms show levels of PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor δ), RAR α (retinoic acid receptor α), RAR β , RXR α (retinoid X receptor α), RXR β and RXR γ mRNA in the hippocampus (A) and the striatum (B) of adult, aged and aged + FO rats. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using Student's t-test (n = 7-12 rats per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

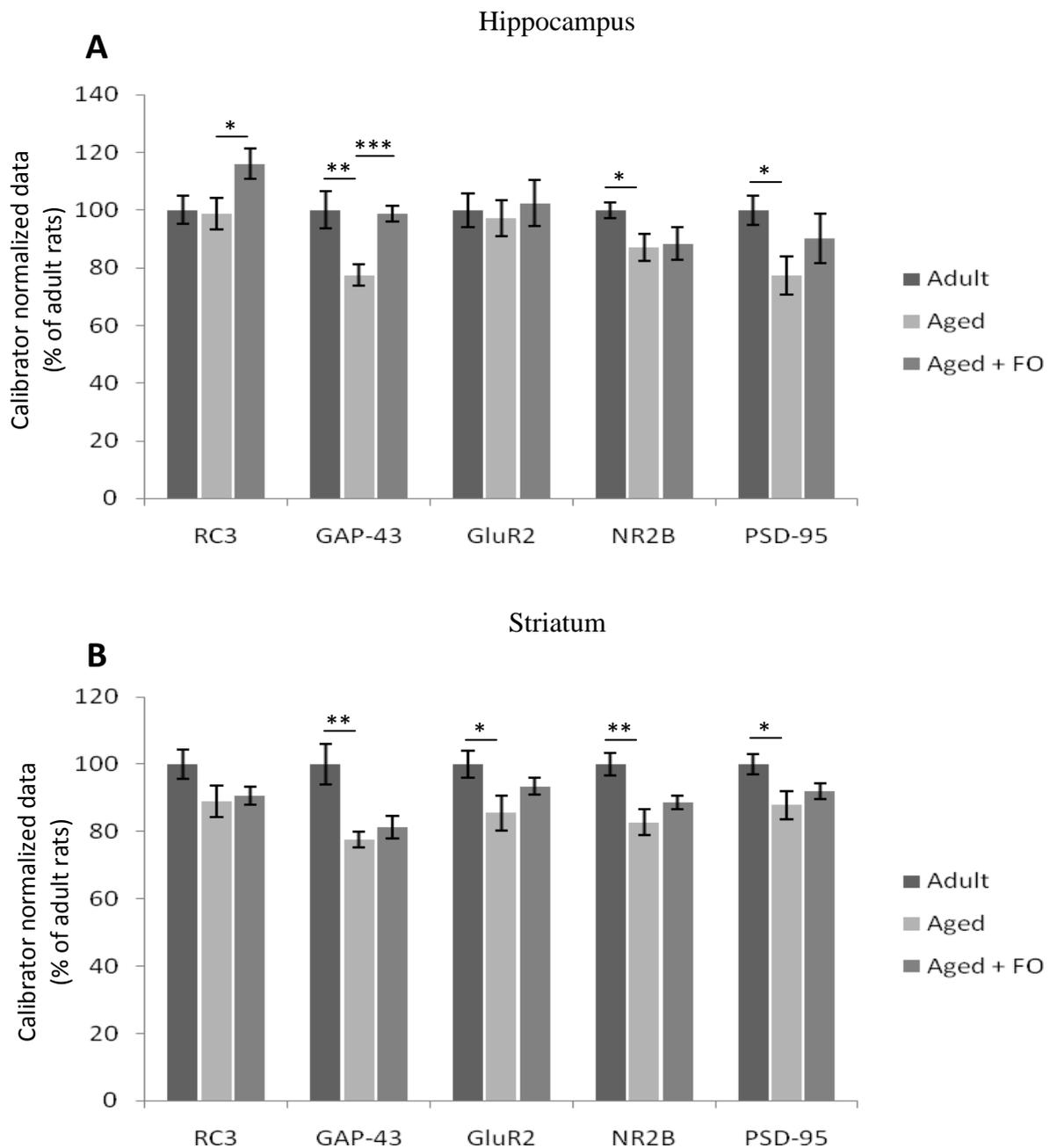


Figure 4

Quantification of synaptic plasticity markers mRNA expression by quantitative RT-PCR. Histograms show levels of RC3 (neurogranin), GAP-43 (neuromodulin), GluR2 (AMPA receptors subunit), NR2B (NMDA receptors subunit) and PSD-95 (postsynaptic density protein 95) mRNA in the hippocampus (A) and the striatum (B) of adult, aged and aged + FO rats. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using Student's *t*-test ($n = 8-12$ rats per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

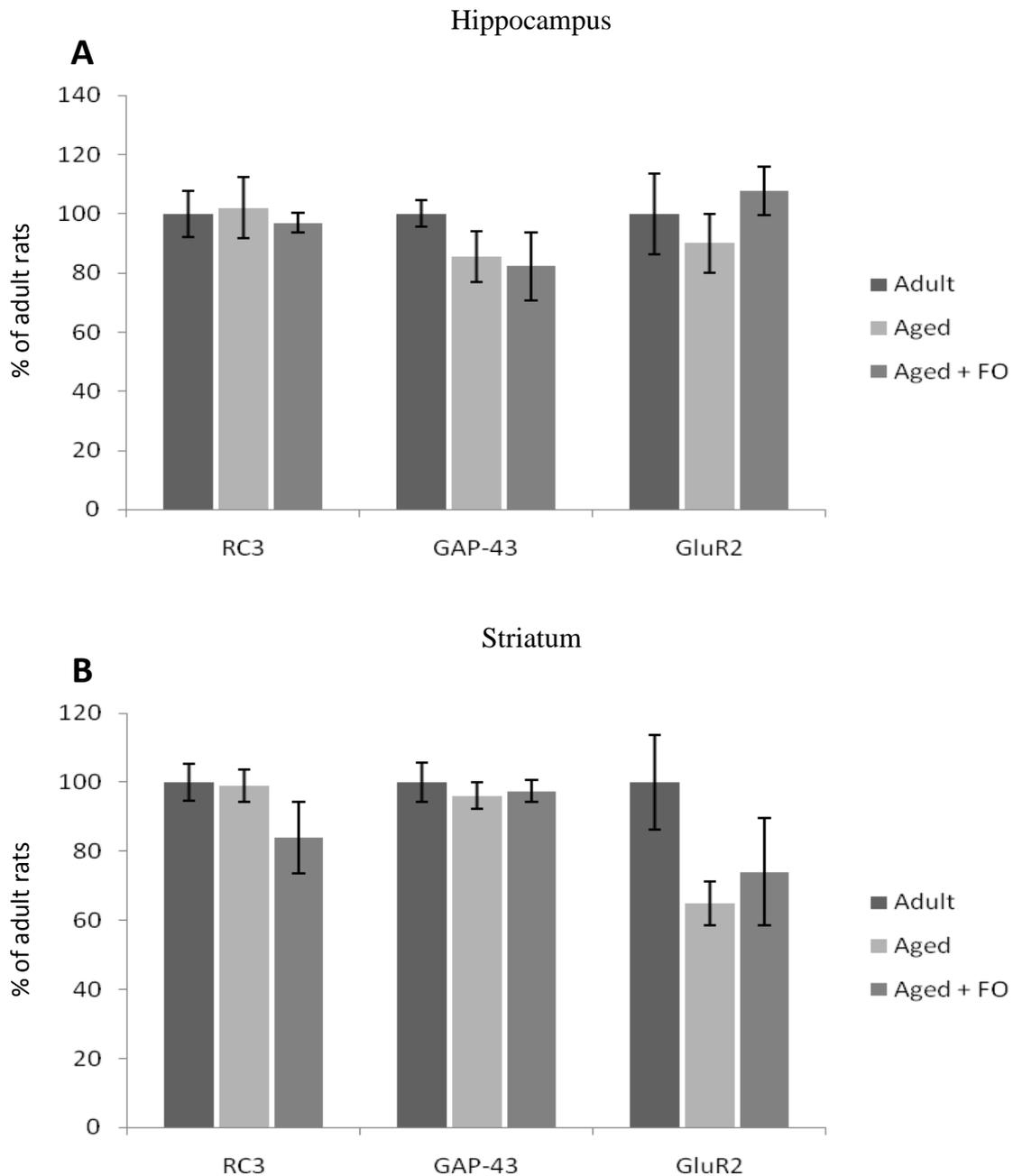


Figure 5

Quantification of synaptic plasticity associated proteins by western blot. Histograms show levels of RC3 (neurogranin), GAP-43 (neuromodulin) and GluR2 (AMPA receptors subunit) in the hippocampus (A) and the striatum (B) of adult, aged and aged + FO rats. Results are expressed as means \pm S.E.M and were analyzed using Student's *t*-test ($n = 5$ rats per group).

Table 1

Composition of experimental diets.

	<i>Low-EPA/DHA diet</i>	<i>Fish oil diet</i>
<u>Ingredients (% of energy)</u>		
Lipids*	11.20	11.20
Saturated	1.61	3.56
Monounsaturated	4.21	3.45
Polyunsaturated	5.37	4.19
Proteins	18.01	18.01
Carbohydrates	70.79	70.79
Energy (kJ/g of diet)	16.8	16.8
Vitamin A (UI/g of diet)	5	5
<u>Fatty acids composition (g/100 g of diet)</u>		
16:0	0.41	0.88
18:0	0.14	0.17
18:1 n-9	1.77	0.49
18:2 n-6	2.38	0.07
20:4 n-6	N.D.	0.06
22:5 n-6	N.D.	N.D.
18:3 n-3	0.01	0.04
20:5 n-3	N.D.	0.98
22:5 n-3	N.D.	0.11
22:6 n-3	N.D.	0.54
Total saturated	0.72	1.59
Total monounsaturated	1.86	1.35
Total polyunsaturated	2.40	1.87
Total n-6	2.38	0.19
Total n-3	0.01	1.68
n-6/n-3	238	0.11

N.D., not detected.

* Lipids were extracted from food according to the method of Folch et al. [39], transmethylated and subjected to gas chromatography.

Table 2

Primers used for quantitative RT-PCR.

Gene name	Nucleotide sequence	Product length (bp)
GluR2	F: 5'- GCGTTACGAGGGCTACTGTGT-3' R: 5'- CTCTCCAACCATACCATTCCAAAT-3'	142
NR2B	F: 5'- TCCGAAGCTGGTGATAATCC- 3' R: 5'- TGGTCATCCTCTTGCTCCTC -3'	138
PSD-95	M : 5'- AGACTCGGTTCTGAGCTATG -3' V : 5'- TCTTTGGTGGGTCCAAGGAT -3'	84

Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. GluR2: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor subunit; NR2B: *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor subunit; PSD-95: postsynaptic density protein 95.

Table 3

Fatty acid composition of red blood cell membrane lipids.

Fatty acids (g/100 g total fatty acids)	Adult	Aged	Aged + FO
16:0	27.38 ± 0.69	28.98 ± 0.65	32.05 ± 0.53 ^b
18:0	14.50 ± 0.55	12.088 ± 0.38 ^a	11.22 ± 0.27
18:1 <i>n</i> -9	5.67 ± 0.20	5.80 ± 0.24	6.36 ± 0.09
18:2 <i>n</i> -6	5.69 ± 0.25	6.85 ± 0.20 ^a	4.20 ± 0.26 ^b
20:4 <i>n</i> -6	22.25 ± 0.63	22.02 ± 0.39	12.26 ± 0.75 ^b
22:5 <i>n</i> -6	1.73 ± 0.06	0.87 ± 0.11 ^a	0.65 ± 0.38
18:3 <i>n</i> -3	N.D.	N.D.	N.D.
20:5 <i>n</i> -3	0.31 ± 0.20	0.24 ± 0.10	6.28 ± 0.34 ^b
22:5 <i>n</i> -3	0.19 ± 0.11	0.69 ± 0.10 ^a	3.15 ± 0.16 ^b
22:6 <i>n</i> -3	0.54 ± 0.15	1.76 ± 0.20 ^a	4.89 ± 0.21 ^b
Total saturated	51.67 ± 0.72	50.89 ± 0.73	53.11 ± 1.06
Total monounsaturated	13.75 ± 0.42	13.54 ± 0.72	13.71 ± 0.48
Total polyunsaturated	34.13 ± 0.51	35.26 ± 0.40	32.74 ± 1.12
Total <i>n</i> -6	32.91 ± 0.66	32.45 ± 0.61	18.20 ± 0.61 ^b
Total <i>n</i> -3	1.08 ± 0.50	2.70 ± 0.36 ^a	14.35 ± 0.67 ^b

N.D., not detected.

Data represent the mean ± S.E.M of measures performed on 6-8 rats and were analyzed using

Student's *t*-test. ^a $p < 0.05$, adult vs. aged. ^b $p < 0.05$, aged vs. aged + FO.

*Discussion
générale*

DISCUSSION GENERALE

Dans les pays industrialisés d'Europe et d'Amérique du Nord, de nombreuses données ont établi que la part des lipides consommée dans l'alimentation présente un excès d'AGPI n-6 et un déficit en AGPI n-3, et plus particulièrement d'AGPI-LC n-3, comparé aux recommandations nutritionnelles (Musket et al., 2004). De plus, dans ces pays où la population vieillissante ne cesse d'augmenter, ce déséquilibre d'apport en AGPI n-3 par rapports aux AGPI n-6, semble être associé au développement de maladies neurodégénératives (Dyall et al., 2008 ; Jicha and Markesbery, 2010 ; Cunnane et al., 2009). En effet, de nombreuses études suggèrent que les AGPI n-3 pourraient intervenir dans la régulation des fonctions neurobiologiques qui sous-tendent les processus mnésiques (Su, 2010). Plusieurs mécanismes d'action cellulaire des acides gras ont été décrits dans la littérature afin d'expliquer ces effets. En particulier, il est maintenant bien admis que les acides gras ont une action génique en se liant et en activant des récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription : les PPAR et RXR.

D'autres travaux, réalisés au sein de l'Unité de Nutrition et Neurosciences, montrent que la vitamine A, et plus particulièrement son métabolite actif l'acide rétinoïque (AR), joue également un rôle important dans les processus cognitifs, notamment au cours du vieillissement, en intervenant dans la régulation de la plasticité cérébrale *via* l'activation de récepteurs nucléaires spécifiques : les RAR et les RXR (Etchamendy et al., 2001 ; Bonnet et al., 2008 ; Mingaud et al., 2008).

Ces travaux suggèrent qu'il existe des interactions entre les voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes, car ces nutriments sont des ligands du même récepteur, le RXR, et que celui-ci est le partenaire d'hétérodimérisation commun à de nombreuses voies de signalisation des nutriments et hormones à action nucléaire. Récemment, nous avons ainsi montré au laboratoire qu'un régime alimentaire riche en acides gras saturés, générant un profil de déficience en AGPI n-3, pouvait modifier l'activité cérébrale des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras, et induire des altérations de la plasticité synaptique (Buaud et al., 2010). D'autres travaux ont également mis en avant l'interaction et l'importance de l'équilibre entre ces deux voies de signalisation dans la

répression de l'inflammation ou la régulation de la balance énergétique par exemple (Ziouzenkova et Plutzky, 2008 ; van Neerven et al., 2008).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, l'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier chez le rat âgé les effets d'un apport alimentaire enrichi en AGPI-LC n-3 sur l'activité des voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes, la plasticité cérébrale et les capacités mnésiques, au cours du vieillissement.

Le modèle nutritionnel utilisé consiste à supplémenter des rats, à partir de la mi-vie, avec un régime à base d'huile de poisson, riche en EPA et DHA. Afin d'étudier l'effet spécifique de l'enrichissement en EPA/DHA, le régime contrôle était dépourvu d'AGPI-LC n-3. De plus, pour éviter la synthèse endogène d'AGPI-LC n-3, et compte tenu de l'efficacité de la biosynthèse des AGPI-LC n-3 à partir de leur précurseur chez le rat, les régimes supplémenté et contrôle ne contenaient pas d'ALA. Ainsi, les rats contrôles âgés de 13 mois ont reçu un régime à base d'huiles d'arachide et de tournesol. Par ailleurs, afin d'évaluer les effets du vieillissement, ces animaux âgés contrôles ont été comparés à des rats pris au sevrage et soumis au même régime. Dans les deux études de cette thèse, les trois groupes d'animaux ont été soumis à 21 semaines de régime.

Dans ce travail nous avons mesuré l'expression des récepteurs nucléaires et de leurs gènes cibles dans deux structures cérébrales, l'hippocampe et le striatum. Ces deux structures sont impliquées dans les processus de mémoire et présentent des niveaux d'activité importants de la voie des rétinoïdes. Ainsi, sur un plan fonctionnel il été montré que l'hippocampe et le striatum peuvent jouer des rôles dans les processus de mémoire de travail *via* une interaction avec le cortex préfrontal (Newman and Grace, 1999 ; Landau et al., 2009). Sur un plan biochimique, l'hippocampe et le striatum sont parmi les structures cérébrales présentant des niveaux les plus élevés en acide rétinoïque (Kane et al., 2005) et en certaines isoformes des récepteurs nucléaires des rétinoïdes dont le RAR β , le RAR α , le RXR β et le RXR γ (Zetterstrom et al., 1999 ; Krezel et al., 1999 ; Moreno et al., 2004), suggérant un rôle physiologique important de la voie de signalisation des rétinoïdes dans ces structures (Lane and Bailey, 2005). De plus des données ont montré que ces deux

structures cérébrales étaient sensibles à des variations du niveau d'apport en vitamine A (Husson et al., 2004 ; Carta et al., 2006) ou en acides gras (Buaud et al., 2010).

I. Résumé des principaux résultats obtenus

I.1. Première étude : Effets d'une supplémentation en huile de poisson sur l'activité des voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la neurogenèse hippocampique, chez le rat âgé

Afin de valider notre modèle nutritionnel de supplémentation en EPA/DHA, nous avons analysé le profil en acides gras des phospholipides totaux des membranes érythrocytaires. Nos résultats mettent en évidence que les taux de DPA n-3 et de DHA sont augmentés, tandis que la quantité de DPA n-6 est diminuée chez les rats âgés comparés aux rats adultes. Concernant l'effet de la supplémentation en huile de poisson, nous avons observé une augmentation des AGPI-LC n-3 (EPA, DPA et DHA), concomitante avec une diminution des AGPI n-6 (LA et ARA), chez les rats âgés supplémentés comparés aux rats du même âge soumis au régime arachide/tournesol. Notons, que le contenu membranaire en ALA, précurseur de la série n-3, ne présentait pas de variation.

Nous avons également examiné les effets d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur l'activité des voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes, dans l'hippocampe et le striatum au cours du vieillissement. Pour cela, nous avons mesuré les niveaux d'expression des ARNm codant pour (1) les récepteurs nucléaires PPAR, RXR et RAR, et (2) les protéines de transport intracellulaire des AG et de l'AR : B-FABP, E-FABP et H-FABP. Précisons que ces protéines de transport jouent un rôle clef dans la transcription génique en régulant la biodisponibilité du ligand vis-à-vis de leurs récepteurs. Nos résultats ont principalement montré une baisse du niveau d'expression des ARNm codant pour RXR β et RXR γ dans l'hippocampe, et une augmentation des ARNm codant pour

RXR α dans l'hippocampe et le striatum des rats âgés, comparés aux rats adultes soumis au même régime arachide/tournesol. Chez les rats âgés recevant de l'huile de poisson, les niveaux d'expression des RXR β et RXR γ , diminués au cours du vieillissement, sont restaurés. Concernant les protéines de transport, nous avons observé une baisse d'expression des ARNm de la B-FABP, concomitante avec une augmentation des ARNm de la H-FABP au cours du vieillissement. Chez les rats âgés, la supplémentation en huile de poisson corrige les variations d'expression liées à l'âge de ces protéines de transport.

Afin d'aborder les conséquences fonctionnelles de ces modifications d'activité des voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes, nous avons étudié une forme de plasticité cérébrale spécifique : la neurogenèse hippocampique. Rappelons que la neurogenèse comprend plusieurs étapes successives qui conduisent à l'intégration fonctionnelle des néo-neurones : la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et la différenciation neuronale. Nos résultats ont mis en évidence une baisse (i) de la prolifération cellulaire, (ii) du nombre de cellules qui survivent au bout de 3 semaines et (iii) du nombre de neurones nouvellement formés dans le gyrus dentelé de l'hippocampe des rats âgés, comparés aux rats adultes. En revanche, chez les rats âgés supplémentés en huile de poisson, le nombre de neurones récemment formés est supérieur à celui observé chez rats âgés contrôles. Le régime enrichi en AGPI-LC n-3 a donc permis de maintenir partiellement le nombre de neurones nouvellement formés. Afin de compléter cette étude, nous avons également mesuré l'expression des ARNm codant pour des neurotrophines (BDNF et NGF) et leurs récepteurs (TrkB et TrkA), facteurs impliqués dans la survie et la différenciation neuronale (Lee and Son, 2009). Nos résultats font apparaitre une augmentation de l'expression des ARNm de TrkA dans l'hippocampe des rats âgés, tandis que la supplémentation en huile de poisson induit une hyper-expression des ARNm de TrkB dans le striatum.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, notre étude contribue à mettre en évidence un effet neuroprotecteur des AGPI-LC n-3 dans le cerveau âgé, qui agissent notamment en maintenant le nombre de nouveaux neurones dans l'hippocampe. De plus, l'action de l'huile de poisson sur l'expression du RXR γ et de la B-FABP dans l'hippocampe suggère

un rôle de ces protéines dans la médiation des effets des AGPI-LC observés sur la neurogenèse.

1.2. Deuxième étude : Effets d'une supplémentation en huile de poisson sur l'activité des voies de signalisation de la vitamine A et des acides gras, et ses conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire spatiale, chez le rat âgé

Comme précédemment, le statut lipidique des trois groupes de rats (adultes et âgés soumis au régime arachide/tournesol ; et âgés soumis au régime huile de poisson) a été vérifié par des analyses de la composition lipidique des membranes érythrocytaires, et des résultats similaires à ceux de la première étude ont été obtenus ; validant ainsi notre modèle de supplémentation nutritionnelle en huile de poisson à partir de la mi-vie chez le rat.

Au bout de 18 semaines de régime, la mémoire spatiale de référence et de travail des animaux a été évaluée dans le labyrinthe aquatique de Morris. Cette épreuve comportementale nous a permis de mettre en évidence des différences de vitesse d'apprentissage chez les rats âgés comparés aux rats jeunes-adultes ; ces derniers apprenant plus vite et terminant la phase d'apprentissage avec un niveau supérieur. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet de l'âge sur la mémoire spatiale de référence, tandis que la mémoire spatiale de travail était significativement altérée. La supplémentation en huile de poisson n'a pas induit de modification des niveaux d'apprentissage ni de la mémoire de référence, mais elle a permis une amélioration partielle de la mémoire de travail chez des animaux âgés.

Après 21 semaines de régime, comme lors de la première étude, nous avons examiné l'effet de l'âge et de la supplémentation en AGPI-LC n-3 sur l'activité des voies de signalisation des AG et de l'AR dans l'hippocampe et le striatum. Nos résultats ont montré une diminution d'expression des ARNm codant pour RAR α dans l'hippocampe et

RAR β dans le striatum des rats âgés, comparés aux rats adultes soumis au même régime arachide/tournesol. De plus, le vieillissement a induit une hyper-expression des ARNm codant pour RXR β dans l'hippocampe et une hypo-expression du RXR γ dans l'hippocampe et le striatum. La supplémentation en huile de poisson chez les animaux âgés restaure les niveaux d'expression des ARNm des RXR γ et RAR β , et induit une hyper-expression des ARNm du PPAR δ dans le striatum.

Finalement nous avons étudié les effets induits par les modifications des voies de signalisation de l'AR et des AG, sur des marqueurs de la plasticité synaptique. Nous avons ainsi observé une hypo-expression des ARNm codant pour GAP-43, NR2B et PSD-95 dans l'hippocampe et le striatum des rats âgés, ainsi qu'une hypo-expression de GluR2 dans le striatum. Dans l'hippocampe des animaux âgés, la supplémentation en huile de poisson restaure le niveau d'expression de GAP-43, gène régulé par l'AR et les AG (Mingaud et al., 2008 ; He et al., 2009), et induit une hyper-expression des ARNm de RC3, gène dont la régulation de la transcription avait déjà été mise en évidence par l'AR notamment (Etchamendy et al., 2001 ; Etchamendy et al., 2003). Nous avons également mesuré les niveaux protéiques de RC3, GAP-43 et GluR2 dans l'hippocampe et le striatum, mais nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes d'animaux.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, notre travail suggère une action des AGPI-LC n-3 sur la plasticité synaptique par l'intermédiaire d'une activation de la voie de signalisation des rétinoides. Ainsi chez l'animal âgé, la restauration du niveau d'expression du RXR γ notamment, pourrait contribuer à l'hyper-expression de RC3 et GAP-43, gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique, et ainsi participer à la préservation des performances de mémoire de travail altérées avec l'âge.

II. Une supplémentation en AGPI-LC n-3 modifie l'activité cérébrale des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras au cours du vieillissement

II.1. Expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des acides gras dans l'hippocampe et le striatum au cours du vieillissement

Les données rapportées dans ce mémoire, concernant l'expression des récepteurs nucléaires, montrent principalement une hypo-expression des ARNm codant pour RAR α et RXR γ dans l'hippocampe des animaux âgés. Ces observations sont en accord avec les résultats déjà obtenus au laboratoire et mettent en évidence une diminution de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement (Enderlin et al. 1997b ; Féart et al., 2005a ; Etchamendy et al., 2001). La baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes est aujourd'hui admise comme étant un élément important dans l'étiologie des troubles neurobiologiques associés au vieillissement. En effet, les différents modèles utilisés pour étudier les conséquences d'une hypo-expression des récepteurs des rétinoïdes, que ce soit les souris knock-out, le modèle de carence vitaminique A, ou le vieillissement lui même, ont mis en évidence la genèse d'altérations de la plasticité synaptique (Chiang et al., 1998 ; Enderlin et al., 1997b ; Etchamendy et al., 2001 ; Etchamendy et al., 2003), la diminution de la neurogenèse hippocampique (Bonnet et al., 2008), ou encore la mise en place de lésions du type de celles retrouvées dans le cerveau des personnes atteintes de la MA (Husson et al., 2006 ; Jarvis et al., 2010). Au niveau fonctionnel, ces différents modèles ont également permis de mettre en évidence la participation de la voie de signalisation des rétinoïdes dans le maintien des performances de mémoire et d'apprentissage (Etchamendy et al., 2001 ; Bonnet et al., 2008 ; Mingaud et al., 2008).

Cette hypo-expression des récepteurs des rétinoïdes advenant avec l'âge est couramment imputée à une diminution de la biodisponibilité de l'AR, elle même liée à un déficit de métabolisation voir de mobilisation de la vitamine A, se mettant en place au cours du vieillissement (Borel et al., 1998 ; van der Loo et al., 2004). Cependant, on peut

également supposer que l'hypo-expression des récepteurs des rétinoïdes observée chez l'animal âgé, soit en partie causée par l'interférence connue avec d'autres voies de signalisation médiées par les récepteurs nucléaires, en particulier celle des acides gras dont les médiateurs sont le PPAR mais surtout le RXR lui-même.

II.2. La supplémentation en AGPI-LC n-3 modifie les niveaux d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des acides gras au cours du vieillissement

Les résultats des travaux de cette thèse ont montré qu'un apport alimentaire enrichi en AGPI-LC n-3 est susceptible de prévenir les modifications de l'expression des récepteurs des rétinoïdes et des acides gras liées au vieillissement. Cet effet est surtout révélé sur l'expression du récepteur nucléaire RXR, et en particulier l'isoforme γ . Ainsi, dans nos études, le régime à base d'huile de poisson a permis de corriger totalement l'hypo-expression de RXR γ liée à l'âge. Les RXR constituent une famille de récepteurs nucléaires qui régulent de multiples voies de signalisation. La complexité de ces récepteurs vient de leur capacité à activer la transcription génique soit en tant qu'homodimère, soit comme partenaire d'hétérodimerisation obligatoire d'une multitude d'autres récepteurs nucléaires (les RAR et les PPAR, par exemple). De plus, selon la présence ou non de ligand, RXR peut former des hétérodimères autorisant ou non la transcription du gène cible (du fait du recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs). Le ligand est donc un acteur crucial dans l'action des RXR (Ahuja et al., 2003 ; Germain et al., 2006c). Si l'AR-9-*cis* a initialement été décrit comme l'unique ligand des RXR, des travaux plus récents tendent à prouver que les acides gras insaturés, en particulier le LA, l'ALA et le DHA, sont également des ligands endogènes de ces récepteurs nucléaires (Wolf, 2006). Certains auteurs présentent ainsi RXR comme un récepteur opportuniste, qui pourrait lier avec différentes affinités plusieurs ligands, et avoir subséquentement plusieurs activités de régulation transcriptionnelle ; RXR agirait alors comme un senseur du métabolisme de la cellule (Egea et al., 2002). Nous pouvons donc supposer que dans les deux études réalisées au cours de cette thèse, le régime à base d'huile de poisson, riche en DHA, a

induit l'expression du gène codant pour RXR γ , de la même façon qu'il a déjà été démontré que la concentration cellulaire en AR détermine le niveau d'expression des RXR, selon un processus d'autorégulation (Wan et al., 1994 ; Duprez et al., 1996). Enfin, dans nos conditions expérimentales, l'expression du PPAR δ ne semble pas être modifiée par le vieillissement, néanmoins elle est significativement stimulée par le régime enrichi en AGPI-LC n-3 dans le striatum.

La comparaison des profils d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des acides gras dans les deux études expérimentales met en évidence des différences dans les niveaux d'expression des ARNm. Même s'il est difficile de comparer statistiquement ces deux séries expérimentales réalisées dans des conditions différentes, il apparaît des augmentations d'expression évidentes dans certains groupes pour le PPAR δ , le RAR α , le RAR β et le RXR γ dans le striatum ainsi que pour le RXR γ dans l'hippocampe. Rappelons, que dans la première étude la quantification par RT-qPCR de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires a été réalisée sur des rats soumis à 21 semaines de régime, restés dans leur cage à l'animalerie ; tandis que dans la seconde étude, cette quantification a été réalisée sur des rats recevant la même durée de régime mais soumis une épreuve comportementale dans le labyrinthe aquatique de Morris. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que l'épreuve comportementale est responsable des différences d'expression des récepteurs nucléaires observées entre ces deux séries expérimentales. A notre connaissance il n'existe aucune donnée montrant un effet d'une épreuve comportementale sur l'expression des récepteurs nucléaires PPAR, RAR ou RXR. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le lien entre la réalisation de l'épreuve et les variations d'expression des récepteurs nucléaires. Une première hypothèse faisant intervenir l'activité physique peut être évoquée. En effet, l'épreuve d'apprentissage et de mémoire dans le labyrinthe aquatique de Morris nécessite une activité physique quotidienne, non négligeable, sous forme de nage. Des études ont montré que l'activité physique, que ce soit chez l'homme ou les rongeurs, pouvait augmenter les niveaux d'expression des récepteurs nucléaires RXR, dans le foie, et PPAR, dans le muscle (Russel et al., 2005 ; Ondkova et al., 2010). Ainsi, nous pouvons supposer

que l'augmentation de l'activité physique chez les rats, au cours de l'épreuve comportementale, puisse moduler l'expression des récepteurs nucléaires dans le cerveau comme cela se produit dans d'autres organes. Une seconde hypothèse fait intervenir les co-régulateurs des récepteurs nucléaires. En effet, il est maintenant bien admis que l'activité de régulation de la transcription des récepteurs nucléaires RAR, RXR ou PPAR nécessite l'interaction avec des co-régulateurs : co-répresseurs et co-activateurs (Lonard and O'Malley, 2007). Parmi les co-activateurs certains ont une activité histone acétyltransférase permettant de modifier la structure de la chromatine et ainsi de faciliter la transcription. C'est le cas notamment de CBP (CREB-binding protein), p300 et PCAF (p300/CBP-associated factor), co-activateurs des récepteurs nucléaires (Wu and Zhang, 2009). Les travaux les plus récents s'intéressant aux mécanismes moléculaires sous-tendant les processus de plasticité synaptique et de mémoire ont mis en exergue l'importance du remodelage de la chromatine dans l'établissement de la trace mnésique. Ainsi, des études sur des souris transgéniques délétées pour les gènes codant pour des histone acétyltransférases tels que CBP, p300 et PCAF ont révélé des déficits de mémoire et de plasticité synaptique chez ces animaux (revue dans Barrett and Wood, 2008). De plus, très récemment, il a été mis en évidence que des rats soumis à une épreuve d'apprentissage et de mémoire dans le labyrinthe aquatique de Morris présentaient une augmentation d'expression de CBP, p300 et PCAF dans l'hippocampe dorsal, comparés à des rats non soumis à l'épreuve comportementale (Bousiges et al., 2010). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les animaux de la deuxième étude, soumis à l'épreuve d'apprentissage dans le labyrinthe aquatique de Morris, présentent une sur-expression de certaines histone acétyltransférases, co-activateurs des récepteurs nucléaires, qui favoriseraient l'activité transcriptionnelle, générant alors un profil d'expression des récepteurs nucléaires différent de celui des animaux naïfs, non-soumis à la tâche comportementale.

II.3. La supplémentation en AGPI-LC n-3 module le niveau d'expression des protéines de transport cytosoliques FABP au cours du vieillissement

L'étude de l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras a été complétée par des mesures du niveau d'expression des protéines de transport intracellulaires des molécules lipophiles : les FABP. Trois types de FABP sont exprimés dans le cerveau adulte : la Brain-FABP (B-FABP), l'Epidermal-FABP (E-FABP) et la Heart-FABP (H-FABP) (Owada et al., 2008). Des travaux récents montrent que les protéines cytosoliques, FABP et CRABP, transportant les AG et l'AR vers le noyau, sont des éléments clés de la signalisation cellulaire des PPAR et RAR et de leur interaction, exerçant une modulation de leur activité transcriptionnelle (Schroeder et al., 2007 ; Schug et al., 2007). On sait en particulier que les FABP participent au contrôle de l'activité transcriptionnelle de leur propre ligand en les transportant, au niveau du noyau, à leurs récepteurs nucléaires. Elles permettent ainsi au PPAR d'exercer son activité biologique (Tan, 2002).

Nos résultats montrent une variation d'expression des ARNm codants pour ces protéines au cours du vieillissement, en particulier une hypo-expression des ARNm de la B-FABP et une hyper-expression des ARNm de la H-FABP dans l'hippocampe. Une diminution de l'expression de la B-FABP avait déjà été mise en évidence dans les synaptosomes de souris âgées (Pu et al., 1999), mais notre étude est la première à s'intéresser aux profils d'expression des FABP dans l'hippocampe et le striatum de rats âgés, recevant des AGPI-LC n-3. Elle met en évidence que la supplémentation nutritionnelle en huile de poisson contrecarre, d'une certaine manière, les variations d'expression de ces protéines, induites par l'âge. Ainsi, la supplémentation alimentaire en EPA et DHA induit (i) une augmentation de l'expression de la B-FABP dont l'expression est sans cela diminuée au cours du vieillissement, et (ii) une diminution de l'expression de la H-FABP dont l'expression est, lorsque l'animal n'est pas supplémenté, augmentée avec l'âge. Ces résultats sont cohérents avec ce que l'on sait de l'affinité de ces FABP pour les différents acides gras, à savoir que la H-FABP lie préférentiellement les acides gras de la série n-6 tandis que la B-FABP a une forte affinité pour les AGPI n-3 (Hanhoff et al.,

2002). Ces observations sont également en accord avec la composition en acides gras des membranes des globules rouges de notre modèle qui présente un taux élevé d'AGPI n-3 et un faible taux d'AGPI n-6. Nous savons par ailleurs que les profils d'acides gras des membranes des globules rouges sont considérés comme de bons « prédicteurs » des contenus des membranes cérébrales. En effet, une relation entre le niveau de DHA dans les GR et celui de régions cérébrales a déjà été démontré (Mc Namara et al., 2009). Des études récentes ont également montré qu'une supplémentation en huile de poisson chez des rats âgés ou déficients en n-3 était à même d'induire une augmentation du taux de DHA dans les phospholipides cérébraux, particulièrement dans l'hippocampe et le striatum (Dyall et al., 2007 ; Chung et al., 2008). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que les variations d'expression des protéines FABP que nous observons dans l'hippocampe, consécutives à la supplémentation en EPA et DHA, constituent une réponse à la variation du contenu en AGPI dans cette structure. D'autant que des auteurs ont récemment fait la relation entre l'augmentation du niveau d'EPA et de DHA et l'augmentation des taux d'ARNm de la B-FABP dans le sérum et les tumeurs cérébrales de rats nourris avec un régime riche en DHA (Nasrollahzadeh et al., 2008). A la lumière de ces données, nos résultats suggèrent que les taux d'ARNm de la B-FABP et de la H-FABP peuvent être régulés en réponse au type et à la quantité d'acides gras contenus dans la ration alimentaire. Nous n'avons pas clairement élucidé les mécanismes mis en jeu dans la régulation transcriptionnelle de l'expression de ces protéines de transport en réponse au contenu lipidique du régime. Cependant, si on se réfère aux données concernant la Liver-FABP (L-FABP) et la CRABP, (protéine de transport de l'acide rétinoïque), nous pouvons émettre l'hypothèse que les acides gras régulent l'expression de la B-FABP aussi bien *via* un élément de réponse au RXR (RXRE) que *via* un élément de réponse au PPAR (PPARE) (Mochizuki et al., 2001). Dans ce cas, on peut supposer que le RXR γ , hyper-exprimé en réponse au régime riche en huile de poisson, pourrait intervenir dans la régulation de la B-FABP en réponse à ce régime.

Depuis peu, une relation apparaît clairement dans la littérature entre l'expression de la B-FABP et le niveau de neurogenèse dans l'hippocampe. On savait depuis quelques temps déjà que des anticorps anti-B-FABP bloquaient la différenciation des neurones et des cellules gliales en culture, sans affecter la prolifération (Feng et al., 1994). Plus

récemment, il a été montré que les souris KO pour le gène de la B-FABP présentent une altération de la neurogenèse dans le gyrus dentelé de la formation hippocampique (Watanabe et al., 2007). Enfin, sur un modèle de lésion ischémique chez le singe, il a été suggéré que les AGPI tel que le DHA agissent *via* la B-FABP pour réguler la neurogenèse chez le primate adulte (Ma et al., 2010). Nos propres résultats vont également dans le sens d'une implication de la B-FABP dans le processus de neurogenèse hippocampique. Dans ce travail, nous avons en effet observé une amélioration de la neurogenèse sous l'effet de la supplémentation en AGPI-LC, concomitante avec la surexpression des ARNm de la B-FABP dans l'hippocampe. Plus précisément, chez les rats nourris avec le régime riche en EPA+DHA, le nombre de neurones nouvellement formés est significativement supérieur sans pour autant modifier la prolifération cellulaire.

L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une implication de la B-FABP, *via* une régulation par le RXR γ , dans les mécanismes par lesquels les AGPI-LC n-3 améliorent la neurogenèse hippocampique (plutôt dans la phase de différenciation neuronale) et la mémoire spatiale au cours du vieillissement.

III. Les modifications de l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras induites par les AGPI-LC n-3 au cours du vieillissement, contribuent à l'amélioration de la plasticité cérébrale et des capacités mnésiques

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent, la supplémentation en huile de poisson modifie l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras. Les conséquences potentielles de ces phénomènes sont importantes. On sait que les conséquences neurobiologiques du niveau d'activité de la voie d'action des rétinoïdes sont potentiellement très étendues puisque l'AR joue des rôles essentiels dans le cerveau adulte, notamment dans les processus neurobiologiques et cognitifs (Chiang et al., 1998 ; Cocco et al., 2002 ; Smith et al., 2002). Il est admis que le renforcement des connexions synaptiques ainsi que la formation des nouvelles synapses puissent être à l'origine de

l'amélioration du phénomène de PLT et des capacités mnésiques (Moser, 1999 ; Gazzaley et al., 2002). On sait de plus que le niveau d'activité de la voie de signalisation, médié par le PPAR δ , est déterminant puisque d'une manière semblable à l'activation du RAR β , l'activation de PPAR dans les neurones peut directement influencer la différenciation et la viabilité neuronale (Park et al., 2004 ; Smith et al., 2004). De plus, PPAR δ assure la promotion de la différenciation des oligodendrocytes et la maturation et le turnover de la gaine de la myéline (Dehmer et al., 2000 ; Cimini et al., 2003).

III.1. Altérations des processus de plasticité cérébrale au cours du vieillissement

Les études réalisées dans cette thèse, nous ont conduits à observer un effet du vieillissement sur les processus de plasticité cérébrale : neurogenèse hippocampique et plasticité synaptique.

Ainsi, nos résultats, conformément à des observations déjà publiées, mettent en évidence une baisse de la prolifération cellulaire (Rao et al., 2006), du nombre de cellules marquées à la BrdU qui survivent après 3 semaines (Bizon et al., 2004) et du nombre de neurones nouvellement formés (McDonald and Wojtowicz, 2005) dans le gyrus dentelé de l'hippocampe de rats âgés. Selon les données de la littérature, le vieillissement serait associé à une forte altération de la prolifération cellulaire, vraisemblablement due à un ralentissement du turnover des cellules granulaires plutôt qu'à une diminution de leur nombre. En revanche, la survie et la différenciation neuronale seraient peu affectées par le vieillissement (Drapeau and Abrous, 2008). Dans notre étude, la diminution de nombre de cellules qui survivent et du nombre de nouveaux neurones, pourrait donc être principalement la conséquence de la baisse de prolifération cellulaire au cours du vieillissement.

Récemment, Goodman et al. (2010) ont démontré que les performances de mémoire spatiale, hippocampo-dépendantes, sont sensibles à une réduction, même partielle, de la neurogenèse chez la souris adulte. D'après ces auteurs, le nombre de

nouveaux neurones est crucial pour la mémoire spatiale à court ou long terme. De plus, de nombreux autres auteurs ont montré que le déclin cognitif lié à l'âge était associé à une diminution de la neurogenèse hippocampique (Drapeau et al., 2003 ; Driscoll et al., 2006).

Cependant, outre la diminution du nombre de ses neurones, l'hippocampe subit au cours du vieillissement une somme de changements morphologiques, déterminant probablement son déclin fonctionnel, parmi lesquels on compte notamment une réduction de l'arborisation dendritique et de la densité des épines.

Dans ce travail nous avons mesuré l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la plasticité synaptique : RC3, GAP-43, NR2B, GluR2 et PSD-95. Nos résultats montrent que le vieillissement s'accompagne d'une hypo-expression (dans l'hippocampe et le striatum) des gènes codant pour GAP-43, NR2B et PSD-95. Cet effet de l'âge avait déjà été observé par d'autres auteurs (Mingaud et al., 2008 ; Zhao et al., 2009 ; VanGuilder et al., 2010). Nous observons également une diminution de l'expression des ARNm de GluR2 dans le striatum. Cette donnée confirme les observations de Dyllal et al. (2007) qui montrent une diminution du niveau protéique de cette sous unité dans le striatum de rats âgés de 24-26 mois. Le gène codant pour GAP-43 est admis comme étant un gène cible des rétinoïdes (Routtenberg et al., 2000). En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'association entre l'hypo-expression des récepteurs des rétinoïdes et celle de GAP-43 ainsi que leur réversibilité par un traitement par les rétinoïdes (AR ou vitamine A) (Husson et al., 2003 ; Feart et al., 2005a ; Mingaud et al., 2008). Cette diminution du taux des ARNm de GAP-43, est donc cohérente avec celle des récepteurs des rétinoïdes et confirme qu'une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes advient avec l'âge dans notre modèle. On sait que GAP-43 joue un rôle dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique et la formation de la trace mnésique (Saunders et al., 1995). Cette protéine, substrat de la protéine kinase C, exprimée lors de la croissance neuritique, est concentrée dans les cônes de croissances et les axones (Meiri et al., 1988 ; Van Lookeren Campagne et al., 1992). On sait également que GAP-43 est impliquée dans différentes formes de plasticité synaptique, incluant le développement et la régénération des neurites ainsi que la potentialisation à long terme. D'autre part, un effet régulateur de l'AR sur l'expression de PSD-95, intervenant lors des processus de

neurotogenèse et de formation des épines dendritiques, a également été évoqué à plusieurs reprises dans la littérature (Zhang et al., 2006 ; Chen et al., 2008). Enfin, la régulation positive de l'expression des ARNm du récepteur NMDA par l'AR, a été mise en évidence sur un modèle de cellules NG108-15 (Lane and Bailey, 2005). Chez le primate et le rongeur, il a été montré que l'âge s'accompagne d'une diminution de NR2B (Sonntag et al., 2000 ; Bai et al., 2004) et que ce déficit est corrélé avec un déclin des performances d'apprentissage (Magnusson, 1998).

Les conséquences potentielles de ces phénomènes sont importantes car un ensemble de données montre que la diminution de l'expression de ces protéines synaptiques peut conduire à une altération de la neurotransmission ainsi que de la formation des vésicules, processus nécessaires pour l'apprentissage, et la formation et la persévérance de la mémoire (Giza and Prins, 2006 ; Cohen and Greenberg, 2008).

III.2. Altérations des processus mnésiques au cours du vieillissement

Dans notre étude, lorsque l'on soumet les animaux au test du labyrinthe aquatique de Morris, on constate que les capacités d'apprentissage des rats âgés et adultes sont différentes. En effet, les deux groupes apprennent la position de la plate-forme de manière différente : les rats adultes semblent apprendre plus vite et mieux que les rats âgés. Ainsi, le dernier jour de la phase d'apprentissage, les animaux adultes parcourent une distance significativement plus courte pour atteindre la plateforme immergée. Ceci révèle une meilleure connaissance de leur part, de la position de celle-ci. Des différences semblables entre animaux jeunes et âgés ont déjà été décrites dans la littérature (Driscoll et al., 2006 ; Bizon et al., 2004). Néanmoins, dans la phase de test du paradigme de mémoire de référence que nous avons utilisé, nous n'observons pas de différence entre les deux groupes. Ces résultats comportementaux peuvent suggérer que les animaux n'ont pas utilisé une stratégie spatiale *stricto sensu* lors de l'apprentissage, ce qui se traduit dans la phase test (probe test) par des temps passés dans le quadrant cible proches du hasard (25 %). Dans le test de mémoire spatiale de travail, nous avons utilisé deux intervalles de temps inter-essai (ITI) et pour chacun d'eux nous observons un déficit de performances

de mémoire chez les rats âgés comparés aux jeunes. Un résultat semblable a déjà été décrit dans la littérature par Shukitt-Hale et al. (2009). Cette équipe avait alors montré que les rats âgés présentaient, dans le labyrinthe aquatique de Morris, une altération globale de leurs performances de mémoire, y compris dans le paradigme de mémoire de travail. Pour ces auteurs, ce déficit de mémoire résulterait d'une diminution des capacités des rats âgés à utiliser les informations spatiales.

III.3. Les modifications d'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras, induites par la supplémentation, contribuent à l'amélioration de la plasticité cérébrale au cours du vieillissement

✧ La neurogenèse hippocampique :

Nos résultats montrent que la supplémentation à base d'huile de poisson pendant 21 semaines chez l'animal âgé, maintient le nombre de nouveaux neurones hippocampiques. Cependant, même si la supplémentation en DHA/EPA réduit significativement l'effet de l'âge sur la neurogenèse, le nombre de neurones néo-formés demeure très significativement inférieur à celui retrouvé chez les animaux adultes. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux rapportés par Dyllal et al. (2010) et suggèrent que ces AGPI favorisent le processus de différenciation neuronale. Ceci paraît d'autant plus probable, que la supplémentation en DHA/EPA n'a modifié ni la prolifération cellulaire, ni le nombre de cellules ayant survécues après trois semaines. Les données concernant l'effet des AGPI-LC n-3 sur la prolifération sont contradictoires. Les différents auteurs observent soit (i) une augmentation de la prolifération cellulaire, c'est le cas des observations réalisées sur le modèle de souris transgéniques fat-1 qui « sur-synthétisent » le DHA (He et al., 2009), soit, (ii) une baisse de la prolifération cellulaire, sur des cellules souches (Kawakita et al., 2006). Néanmoins, nos résultats et ceux d'autres auteurs, suggèrent que le AGPI n-3 interviennent, au cours du vieillissement, dans des mécanismes qui conduisent à la genèse de nouveaux neurones, améliorant ainsi les propriétés du réseau de neurones et les capacités de traitement de l'information,

contribuant sur un plan fonctionnel, au maintien des performances d'apprentissage et de mémoire.

Pour aborder les dits mécanismes, certains auteurs ont suggéré que l'effet positif des AGPI-LC n-3 sur la neurogenèse pourrait être médié par des facteurs neurotrophiques (Blondeau et al., 2009), d'autant que ces acides gras peuvent induire l'expression de BDNF (Wu et al., 2004) et semblent nécessaires pour assurer une synthèse optimale de NGF dans l'hippocampe (Ikemoto et al., 2000). Nous n'avons pas, quant à nous, obtenus de tels résultats. Dans notre modèle nous n'observons qu'une augmentation marginale des ARNm de BDNF et une augmentation significative de l'expression de son récepteur TrkB dans le striatum des rats supplémentés. Ces résultats sont néanmoins cohérents avec ceux de Bousquet et al. (2009) qui rapportent un effet du DHA+EPA sur le taux d'ARNm de BDNF et TrkB dans le striatum sur un modèle murin de maladie de Parkinson. Il est alors possible d'envisager que les AGPI n-3 agissent dans le striatum, où ils favorisent la survie cellulaire et la poussée dendritiques, comme cela a été décrit Huang et Reichardt (2003). L'ensemble de ces mécanismes conduirait ainsi à une amélioration de la mémoire de travail, observée chez des rats supplémentés avec le l'huile de poisson (Chung et al., 2008).

◇ La plasticité synaptique :

La présente étude est la première, à notre connaissance, à mettre en évidence que la supplémentation en AGPI-LC n-3 corrige chez l'animal âgé, l'hypo-expression des ARNm de GAP-43, à un niveau comparable à celui des animaux jeunes. He et al. (2009) avaient montré l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines synaptiques, parmi lesquelles GAP-43, dans l'hippocampe de souris transgéniques fat-1, associée à de meilleures performances d'apprentissage et de mémoire dans le labyrinthe aquatique de Morris. Dans notre étude, il apparaît également que le régime enrichi en DHA/EPA induit une augmentation de l'expression des ARNm de RC3 dans l'hippocampe des rats âgés. Ceci est particulièrement intéressant car RC3 joue un rôle dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique et la formation

de la mémoire (Iniguez et al., 1994). Cette protéine, substrat de la protéine kinase C, est exprimée au niveau des synapses neuronales et impliquée dans la formation des épines dendritiques (Gerendasy et al., 1994) ; de ce fait elle permet de traduire leur densité. De plus, RC3, protéine de liaison de la calmoduline, joue un rôle important dans la transmission du signal calcique, la LTP hippocampique et la mémoire spatiale (Pak et al., 2000). Il faut souligner que RC3 est, comme GAP-43, un gène cible des rétinoïdes, et c'est la première fois que la régulation positive de son expression par les AGPI-LC n-3 est mise en évidence. On peut rapprocher ces résultats de ceux que nous avons obtenus sur l'effet bénéfique de la supplémentation en huile de poisson sur l'expression des RXR, en particulier l'isoforme γ . En effet, plusieurs études ont mis en relation la régulation de RC3 par la voie de signalisation des rétinoïdes et en particulier *via* l'hétérodimère RAR β -RXR β/γ (Chiang et al., 1998 ; Etchamendy et al., 2001 ; Féart et al., 2005a). Enfin, Buaud et al. (2010) ont récemment montré que le niveau d'expression de RC3 pouvait être modulé sous l'effet d'un régime de type « high fat » ; et que cette modification était associée à une variation d'expression des voies de signalisation de l'AR et des AG, en particulier des récepteurs RXR β/γ , RAR β et PPAR δ . D'autres données plaident également en faveur d'un rôle de RXR γ et RXR β dans la plasticité cérébrale, notamment dans la croissance des neurites induite par le DHA (Calderon and Kim, 2007), et dans la modulation de la morphologie dendritique de neurones hippocampiques en culture (Liu et al., 2003).

D'autre part, plusieurs études ont permis de faire le lien entre le niveau d'expression de RC3 et GAP-43 et les performances de mémoire et d'apprentissage (Etchamendy et al., 2001 ; Etchamendy et al., 2003). Il nous semble important de souligner que ce résultat s'apparente à ceux obtenus sur des modèles d'hypo-activation de la voie de signalisation des rétinoïdes (animaux âgés ou carencés en vitamine A) sur lesquels, l'acide rétinoïque par voie pharmacologique, ou la vitamine A par voie nutritionnelle, corrigent les déficits d'expression des récepteurs des rétinoïdes, de RC3, de GAP-43 ainsi que les déficits de mémoires associés. Cette similitude d'action entre rétinoïdes et AGPI-LC n-3, va selon nous, dans le sens d'une implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les effets bénéfiques des AGPI-LC n-3 que nous observons, sur la plasticité cérébrale et les performances de mémoire, chez l'animal âgé.

Notons enfin que le potentiel de l'huile de poisson à améliorer les propriétés de plasticité synaptique avait déjà été évoqué, en particulier sa capacité à corriger la diminution d'expression liée à l'âge des sous unités GluR2 et NR2B des récepteurs au glutamate (Dyall et al., 2007). Une augmentation de l'expression de la sous unité NR2B conduit, dans le cerveau antérieur de souris, à une activation du récepteur NMDA et améliore les performances de mémoire et d'apprentissage (Tang et al., 1999).

III.4. Les modifications d'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras, induites par la supplémentation, contribuent à l'amélioration de la mémoire de travail au cours du vieillissement

Nos résultats montrent un effet correcteur de la supplémentation en huile de poisson sur les déficits de mémoire de travail liés à l'âge et non sur la mémoire de référence. Cette action sélective des AGPI avait déjà été rapportée par d'autres auteurs qui suggèrent que pour l'étude de modèles ayant des apports en acides gras modifiés, le test de mémoire de travail dans le labyrinthe aquatique de Morris semble plus sensible que le paradigme permettant d'évaluer la mémoire de référence (Wainwright et al., 1998 ; Wainwright et al., 1999). Nous observons que l'effet de la supplémentation en AGPI-LC n-3 n'est significatif que lorsque nous testons les animaux en utilisant l'ITI le plus court (i.e. 30 s). Il semble donc que l'efficacité de ces AGPI est limitée, puisqu'elle n'est plus significative lorsque le niveau de difficulté de la tâche augmente. On peut également supposer que l'administration des AGPI intervient peut être trop tardivement (13 mois) dans notre modèle, à un âge où les déficits sont déjà en place, ou bien ont atteint une amplitude trop importante (Shukitt-Hale et al., 1998).

Signalons que l'effet positif du DHA sur la mémoire et l'apprentissage a été mis en évidence à plusieurs reprises par des auteurs qui ont utilisés différents tests comportementaux tels que le step-through test et le passageway water maze (Jiang et al., 2009), ou encore le labyrinthe radial (Gamoh et al., 2001). Enfin, très récemment Kelly et al. (2010) ont montré qu'une supplémentation en EPA, ou bien en DPA n-3, améliorait

les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique de Morris, chez des rats âgés (20-22 mois).

Rappelons que l'effet que nous observons sur la mémoire de travail s'accompagne d'une amélioration du niveau d'expression du RXR γ à la fois dans l'hippocampe et le striatum et du RAR β dans le striatum uniquement. Ces résultats doivent être comparés aux travaux de Wietrzych et al. (2005) qui montrent, en utilisant des souris mutantes, un rôle important de ces deux récepteurs, et plus particulièrement du RXR γ , dans la modulation de la mémoire de travail. Ces auteurs suggèrent que le RXR γ module les fonctions mnésiques sous forme d'hétérodimère avec RAR, ou bien un autre récepteur nucléaire tel que PPAR. De plus, des données ont déjà mis en évidence une relation entre l'hypo-expression de la voie des rétinoïdes chez des souris âgées et l'altération des fonctions cognitives, notamment de la mémoire de travail (Mingaud et al., 2008), suggérant que le dérèglement de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes pourrait être un facteur étiologique de la détérioration cognitive au cours de la sénescence. Ainsi, une stratégie nutritionnelle, permettant de maintenir, ou bien de restaurer, le niveau d'expression des récepteurs RXR γ et RAR β pourrait contribuer à préserver les performances de mémoire de travail au cours du vieillissement.

De plus, l'augmentation de l'expression de PPAR δ , induite par la supplémentation dans le striatum, pourrait également avoir des conséquences neurobiologiques et fonctionnelles. Cependant il existe encore peu de données sur les gènes régulés par les PPAR dans le cerveau et potentiellement impliqués dans les processus de plasticité synaptique permettant de faire un lien entre l'augmentation d'expression du PPAR δ suite à une supplémentation en huile de poisson et les effets bénéfiques sur la mémoire de travail. Toutefois, d'une manière semblable à l'activation du RAR β , l'activation de PPAR δ dans les neurones peut directement influencer la différenciation et la viabilité neuronale (Park et al., 2004 ; Smith et al., 2004).

Dans notre travail nous avons observé des augmentations d'expression des récepteurs nucléaires PPAR δ , RAR β et RXR γ dans le striatum suite à la supplémentation en huile de poisson sans variation significative des gènes cibles de la plasticité synaptiques

étudiés ici. Il est admis que le striatum, tout comme l'hippocampe, peut être impliqué dans les processus de mémoire de travail *via* notamment une interaction avec le cortex préfrontal (Newman and Grace, 1999 ; Landau et al., 2009). Par ailleurs la voie de signalisation des rétinoïdes joue des rôles fonctionnels importants dans le striatum et notamment sur le système dopaminergique (Lane et Bailey, 2005). Ainsi, nous pouvons supposer que l'augmentation d'expression des récepteurs nucléaires PPAR δ , RAR β et RXR γ dans le striatum, suite à la supplémentation en huile de poisson, pourrait contribuer en partie aux effets bénéfiques de l'EPA et DHA sur les performances de mémoire de travail de nos animaux. Il reste cependant à élucider quels sont les gènes cibles impliqués dans la plasticité synaptique et régulés par ces récepteurs dans le striatum.

IV. Perspectives

IV.1. Chez l'animal

De nombreux travaux, en particulier ceux réalisés dans l'Unité de Nutrition et Neurosciences, ont mis en évidence la diminution d'expression des récepteurs nucléaires au cours du vieillissement et ses conséquences sur l'expression de gènes cibles déterminants les propriétés de plasticité cérébrale. Ces observations concernent plusieurs types de récepteurs, et donc plusieurs voies de signalisation : la voie des rétinoïdes, des hormones thyroïdiennes, des glucocorticoïdes ou encore des acides gras. Ces données suggèrent qu'au long de la vie, la biodisponibilité en ligands modulateurs nucléaires décroît et ce pour des raisons qui peuvent intrinsèquement être liées aux phénomènes de vieillissement mais également pour des raisons liées à des facteurs environnementaux : apport nutritionnel ou qualité de vie. L'étude menée dans ce travail de thèse contribue à étayer ces observations et également à mieux comprendre les conditions de la réversibilité, ou de la prévention, de ces processus et donc de la récupération des propriétés neurobiologiques qui garantissent des performances mnésiques optimales.

Pour aller plus loin dans cette direction et faire suite au travail accompli, il faudrait chez l'animal, mettre en place des modèles permettant d'intégrer ces différents signaux.

Ainsi, il nous semble désormais particulièrement important, dans une optique de prévention nutritionnelle, de pouvoir aborder ensemble l'efficacité d'apports en vitamine A et en EPA/DHA. En effet, si l'on considère (i) les effets bénéfiques des AGPI-LC n-3, sur certains processus neurobiologiques et la mémoire, (ii) les effets promnésiants de la vitamine A, et (iii) l'interaction des voies de signalisation des rétinoïdes et des acides gras ; le maintien d'un niveau optimal d'apports alimentaire en AGPI-LC n-3 et en vitamine A, au cours du vieillissement, pourrait être un facteur clé pour prévenir ou retarder le déclin mnésique lié à l'âge.

Pour mieux comprendre les effets synergiques entre ces deux types de nutriments il serait également opportun d'aborder *in vitro*, sur des cultures de neurones, l'action combinée de ces nutriments sur l'expression de leurs différents récepteurs nucléaires et les conséquences sur la différenciation neuronale.

IV.2. Chez l'Homme

La finalité de ce travail de thèse est de pouvoir éprouver chez l'Homme les hypothèses que nous avons testées dans les études expérimentales menées chez l'animal.

Actuellement une étude biomédicale est sur le point de se terminer, en collaboration avec l'équipe « Epidémiologie de la nutrition et des comportements alimentaires » dirigée par P. Barberger-Gateau (U 593 INSERM Bordeaux), dans le cadre du projet COGINUT (Cognition, anti-Oxydants, acides Gras : approche Interdisciplinaire du rôle de la NUTrition dans le vieillissement cérébral). L'objectif général de ce projet est d'étudier, chez les personnes âgées issues de la cohorte des 3 Cités (3C) (Alperovitch et al., 2002), l'impact du statut nutritionnel en AGPI, en rétinoïdes et en anti-oxydants sur le vieillissement cérébral (démence, déclin cognitif, troubles de l'humeur).

Le sous-projet nous concernant, intitulé « Acides gras, rétinoïdes et fonctions cognitives chez la personne âgé », prévoit d'étudier les relations possibles entre la composition en acides gras des membranes érythrocytaires, le profil d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des acides gras dans les cellules mononucléées du

sang et les performances cognitives de sujets âgés. 80 sujets volontaires, âgés de 68 ans et plus, ont donc été recrutés sur la base d'une enquête nutritionnelle comme étant de faibles (40 sujets) ou de forts (40 sujets) consommateurs d'AGPI n-3. Brièvement, cette enquête alimentaire prend en compte la fréquence de consommation de poisson, de produits végétaux riches en AGPI n-3 et dérivés, et l'absence de consommation de DHA sous forme de compléments alimentaires.

Des dosages biologiques classiques ont permis d'évaluer le statut en vitamine A des sujets par mesure du rétinol sérique et de la Retinol Binding Protein (RBP). La composition en acides gras des membranes érythrocytaires devrait permettre de vérifier le statut nutritionnel en AGPI n-3 des sujets. De notre côté, nous avons mesuré les profils d'expression des ARNm de toutes les isoformes des récepteurs des rétinoïdes et des acides gras présents dans les cellules mononucées ($RAR\alpha$ et γ ; $RXR\alpha$ et β ; $PPAR\ \gamma$). Enfin, le statut cognitif de chaque sujet a été évalué par des tests, dans le cadre du protocole 3C. Aujourd'hui, l'ensemble de ces mesures a été effectué (en aveugle) par les différentes équipes, et des analyses statistiques doivent être réalisées afin d'étudier les relations qui existent entre elles.

L'étude devrait donc nous permettre en premier lieu de vérifier le lien entre niveau de consommation et profils d'expression des récepteurs nucléaires, puis de faire le lien entre profils des récepteurs nucléaires et cognition, afin de vérifier, chez l'Homme âgé, la chaîne de causalité testée chez l'animal, selon laquelle le niveau de consommation en AGPI n-3 pourrait avoir une influence sur la cognition *via* des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires.

Conclusion

CONCLUSION

Dans un contexte général, ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche en nutrition humaine qui a pour but de mieux comprendre les relations entre l'alimentation et la santé. L'approche dans ce domaine a considérablement évolué au cours des dernières années. Pendant longtemps, les recherches étaient essentiellement consacrées à l'étude des effets délétères, déclenchant ou aggravants, que peuvent générer certains constituants du régime. Aujourd'hui, un changement profond apparaît dans la façon d'aborder les relations entre l'alimentation et la santé. Une plus grande place est accordée à la recherche des effets d'une consommation raisonnable de certains nutriments dans le maintien, sinon l'amélioration, d'un bon état de santé. Nos orientations de recherche s'inscrivent dans cette nouvelle perspective.

Nos résultats contribuent à la démonstration d'un effet bénéfique des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3 sur la plasticité cérébrale et la mémoire spatiale de travail, au cours du vieillissement. En effet, la supplémentation en EPA/DHA administrée à partir de la mi-vie maintient en partie les fonctions cérébrales et cognitives des rats âgés. De plus, nos travaux suggèrent l'implication des RXR et des protéines de transport cytosoliques des acides gras dans l'effet neuroprotecteur des AGPI-LC n-3, qui semblent participer à la régulation de l'expression de gènes cibles impliqués notamment dans la plasticité synaptique et la neurogenèse hippocampique.

Il est maintenant bien admis que les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription maîtres qui, par le biais d'une combinatoire précise, orchestrent la maintenance des propriétés neurobiologiques qui sous-tendent les processus mnésiques. De plus, il est bien établi que les mêmes récepteurs nucléaires sont aussi les senseurs du contenu en vitamines ou en lipides de l'alimentation et contrôlent la réponse métabolique au régime. De nombreuses données ont rapporté que le vieillissement, associé chez certains sujets à un déséquilibre nutritionnel, induit des modifications des profils d'expression de ces récepteurs dans différents tissus, et que, dans le cerveau, de tels événements conduisent à des changements neurobiologiques, spécialement des altérations de la plasticité synaptique.

Ces modifications neurobiologiques sont ainsi responsables, au moins en partie, du déclin de mémoire lié à l'âge. Les modulations des profils d'expression des récepteurs nucléaires, observées au cours du vieillissement, ont été attribuées au déclin inexorable de la biodisponibilité en AR et en hormone thyroïdienne, tous les deux ligands des récepteurs nucléaires. Or, l'activité des désaturases décline également avec l'âge, conduisant ainsi à une moindre production d'AGPI n-3 à longue chaîne. On peut supposer que ce phénomène est un élément clé dans la mise en place des altérations neurobiologiques, surtout chez les sujets consommant insuffisamment d'AGPI n-3, et que la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires en particulier les RXR γ , que l'on peut supposer en réponse à l'insuffisance d'AGPI-LC de la série n-3 chez le sujet âgé, apporte sa contribution à l'apparition du déclin mnésique lié à l'âge.

Il nous semble aujourd'hui crucial de poursuivre les recherches afin de répondre à la question de la possible contribution nutritionnelle à la prévention du déclin mnésique lié à l'âge. Une étude récente a montré les effets promnésiants d'une supplémentation en vitamine A (Mingaud et al., 2008) et nos travaux avec d'autres déjà publiés font état d'un effet positif des AGPI n-3 sur les performances mnésiques, il sera donc capital d'aborder cette question d'une manière globale, en intégrant dans notre réflexion l'ensemble de ces nutriments modulateurs nucléaires.

Dans la littérature, un ensemble de données cohérentes plaide en faveur d'une hypothèse selon laquelle des dérégulations, même faibles, du taux d'expression des récepteurs nucléaires pourraient être à l'origine de nombreuses maladies du vieillissement tel que le cancer, l'obésité ou encore les maladies neurodégénératives. Il est aujourd'hui admis que ces récepteurs pourraient être des marqueurs moléculaires de certaines pathologies et qu'ils pourraient représenter des cibles moléculaires pour des nutriments ou des médicaments innovants.

C'est pourquoi, nos travaux s'inscrivent dans la perspective de l'élaboration de recommandations nutritionnelles chez l'Homme, favorisant un vieillissement dans de bonnes conditions de santé tant physiques que cognitives.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abrous, D.N., Koehl, M., Le Moal, M. 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85(2), 523-69.
- Ahmad, A., Moriguchi, T., Salem, N. 2002. Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr Neurol* 26(3), 210-8.
- Ahuja, H.S., Szanto, A., Nagy, L., Davies, P.J. 2003. The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *J Biol Regul Homeost Agents* 17(1), 29-45.
- Aid, S., Vancassel, S., Poumes-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P., Lavialle, M. 2003. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 44(8), 1545-51.
- Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P., Alessandri, J.M., Guesnet, P. 2006. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog Lipid Res* 45(3), 203-36.
- Aimone, J.B., Wiles, J., Gage, F.H. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9(6), 723-7.
- Alberghina, M., Lupo, G., Anfuso, C.D., Infarinato, S. 1994. Differential transport of docosahexaenoate and palmitate through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat. *Neurosci Lett* 171(1-2), 133-6.
- Alessandri, J.M., Extier, A., Astorg, P., Lavialle, M., Simon, N., Guesnet, P. 2009. Métabolisme des acides gras oméga-3: différences entre hommes et femmes. *Nutrition Clinique et métabolisme* 23(2), 55-6.
- Alessandri, J.M., Guesnet, P. 2005. Multiple facets of membrane lipids and the diversity of their action mode with special emphasis on the central nervous system. *Reprod Nutr Dev* 45(5), 529-33.
- Alessandri, J.M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aid, S., Poumes-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., Lavialle, M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 44(6), 509-38.
- Altman, J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-8.

- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S., Del Grande, P. 2000. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286(1), 21-4.
- Arterburn, L.M., Hall, E.B., Oken, H. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl), 1467S-76S.
- Asson-Batres, M.A., Zeng, M.S., Savchenko, V., Aderoju, A., McKanna, J. 2003. Vitamin A deficiency leads to increased cell proliferation in olfactory epithelium of mature rats. *J Neurobiol* 54(4), 539-54.
- Astorg, P., Arnault, N., Czernichow, S., Noisette, N., Galan, P., Hercberg, S. 2004. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39(6), 527-35.
- Azais-Braesco, V., Moriniere, C., Guesne, B., Partier, A., Bellenand, P., Baguelin, D., Grolier, P., Alix, E. 1995. Vitamin A status in the institutionalized elderly. Critical analysis of four evaluation criteria: dietary vitamin A intake, serum retinol, relative dose-response test (RDR) and impression cytology with transfer (ICT). *Int J Vitam Nutr Res* 65(3), 151-61.

B

- Bai, L., Hof, P.R., Standaert, D.G., Xing, Y., Nelson, S.E., Young, A.B., Magnusson, K.R. 2004. Changes in the expression of the NR2B subunit during aging in macaque monkeys. *Neurobiol Aging* 25(2), 201-8.
- Balu, D.T., Lucki, I. 2009. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33(3), 232-52.
- Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Pérès, K., Dartigues, J.-F., Renaud, S. 2002. Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 325, 932-3.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.F., Alperovitch, A. 2007. Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69(20), 1921-30.
- Barcelo-Coblijn, G., Hogyes, E., Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Nyakas, C., Penke, Z., Farkas, T. 2003a. Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20), 11321-6.
- Barcelo-Coblijn, G., Kitajka, K., Puskas, L.G., Hogyes, E., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Farkas, T. 2003b. Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochim Biophys Acta* 1632(1-3), 72-9.

- Barcelo-Coblijn, G., Murphy, E.J. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 48(6), 355-74.
- Barrett, R.M., Wood, M.A. 2008. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 15(7), 460-7.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Bays, H.E., Tighe, A.P., Sadovsky, R., Davidson, M.H. 2008. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(3), 391-409.
- Bazan, N.G. 2006. The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6), 901-13.
- Beltz, B.S., Tlusty, M.F., Benton, J.L., Sandemana, D.C. 2007. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci Lett* 415, 154-8.
- Benani, A., Kremerik-Bouillaud, P., Bianchi, A., Netter, P., Minn, A., Dauca, M. 2003. Evidence for the presence of both peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta in the rat spinal cord. *J Chem Neuroanat* 25(1), 29-38.
- Bernardo, A., Minghetti, L. 2006. PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr Pharm Des* 12(1), 93-109.
- Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., Parent, A. 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17), 11464-9.
- Bernoud, N., Fenart, L., Benistant, C., Pageaux, J.F., Dehouck, M.P., Moliere, P., Lagarde, M., Cecchelli, R., Lecerf, J. 1998. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res* 39(9), 1816-24.
- Bershad, S.V. 2001. The modern age of acne therapy: a review of current treatment options. *Mt Sinai J Med* 68(4-5), 279-86.
- Bézard, J., Blond, J.P., Bernard, A., Clouet, P. 1994. The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod Nutr Dev* 34(6), 539-68.
- Bizon, J.L., Gallagher, M. 2003. Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18(1), 215-9.
- Bizon, J.L., Lee, H.J., Gallagher, M. 2004. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell* 3(4), 227-34.

- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-9.
- Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.C., Marini, A.M., Heurteaux, C. 2009. Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology* 34(12), 2548-59.
- Bondareff, W., Geinisman, Y. 1976. Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat* 145(1), 129-36.
- Bonilla, S., Redonnet, A., Noel-Suberville, C., Pallet, V., Garcin, H., Higuieret, P. 2000. High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br J Nutr* 83(6), 665-71.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P., Abrous, D.N. 2008. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 3(10), e3487.
- Bordoni, A., Di Nunzio, M., Danesi, F., Biagi, P.L. 2006. Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors. *Genes Nutr* 1(2), 95-106.
- Borel, P., Mekki, N., Boirie, Y., Partier, A., Alexandre-Gouabau, M.C., Grolier, P., Beaufrere, B., Portugal, H., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53(2), B133-40.
- Boucheron, C., Alfos, S., Enderlin, V., Husson, M., Pallet, V., Jaffard, R., Higuieret, P. 2006. Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging* 27(9), 1326-34.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D. 2000. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 5(2), 289-98.
- Bourre, J.M. 2004. The role of nutritional factors on the structure and function of the brain: an update on dietary requirements. *Rev Neurol (Paris)* 160(8-9), 767-92.
- Bourre, J.M., Bonneil, M., Chaudiere, J., Clement, M., Dumont, O., Durand, G., Lafont, H., Nalbone, G., Pascal, G., Piciotti, M. 1992a. Structural and functional importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 318, 211-29.
- Bourre, J.M., Dumont, O.S., Piciotti, M.J., Pascal, G.A., Durand, G.A. 1992b. Dietary alpha-linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. *Biochim Biophys Acta* 1124(2), 119-22.

- Bourre, J.M., Durand, G., Pascal, G., Youyou, A. 1989a. Brain cell and tissue recovery in rats made deficient in n-3 fatty acids by alteration of dietary fat. *J Nutr* 119(1), 15-22.
- Bourre, J.M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G. 1989b. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* 119(12), 1880-92.
- Bourre, J.M., Piciotti, M. 1992. Delta-6 desaturation of alpha-linolenic acid in brain and liver during development and aging in the mouse. *Neurosci Lett* 141(1), 65-8.
- Bourre, J.M., Piciotti, M. 1997. Alterations in eighteen-carbon saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid peroxisomal oxidation in mouse brain during development and aging. *Biochem Mol Biol Int* 41(3), 461-8.
- Bousiges, O., Vasconcelos, A.P., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.P., Cassel, J.C., Boutillier, A.L. 2010. Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*.
- Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F., Cicchetti, F. 2009. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137(1), 354-66.
- Braissant, O., Wahli, W. 1998. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-a, -b, and -g during Rat Embryonic Development. *Endocrinology* 139, 2748-57.
- Buaud, B., Esterle, L., Vaysse, C., Alfos, S., Combe, N., Higuieret, P., Pallet, V. 2010. A high-fat diet induces lower expression of retinoid receptors and their target genes GAP-43/neuromodulin and RC3/neurogranin in the rat brain. *Br J Nutr*, 1-10.
- Buclin, T., Biollaz, J. 2005. Regards récents sur la barrière hémato-encéphalique. *Rev Med Suisse* (3014), 959-63.
- Burdge, G. 2004. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(2), 137-44.
- Burdge, G.C., Calder, P.C. 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 45(5), 581-97.
- Burke, S.N., Barnes, C.A. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7(1), 30-40.

- Burke, S.N., Barnes, C.A. 2010. Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* 33(3), 153-61.
- Burr, G.O., Burr, M.M. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* 82, 345-67.
- Burr, G.O., Burr, M.M. 1930. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* 86, 587-621.

C

- Calder, P.C. 2002. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 61(3), 345-58.
- Calderon, F., Kim, H.Y. 2004. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 90(4), 979-88.
- Calderon, F., Kim, H.Y. 2007. Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(5-6), 227-32.
- Cameron, H.A., McKay, R.D. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435(4), 406-17.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56(2), 337-44.
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.S., Jun, S.B., Lovinger, D., Kim, H.Y. 2009. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 111(2), 510-21.
- Cao, D., Xue, R., Xu, J., Liu, Z. 2005. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J Nutr Biochem* 16(9), 538-46.
- Carrié, I., Clement, M., de Javel, D., Frances, H., Bourre, J.M. 2000a. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* 41(3), 473-80.
- Carrié, I., Clement, M., de Javel, D., Frances, H., Bourre, J.M. 2000b. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* 41(3), 465-72.
- Carver, J.D., Benford, V.J., Han, B., Cantor, A.B. 2001. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Research Bulletin* 56(2), 79-85.

- Casoli, T., Di Stefano, G., Gracciotti, N., Fattoretti, P., Solazzi, M., Bertoni-Freddari, C. 2001. Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 122(15), 1723-38.
- Cellerino, A. 1996. Expression of messenger RNA coding for the nerve growth factor receptor *trkA* in the hippocampus of the adult rat. *Neuroscience* 70(3), 613-16.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10(9), 940-54.
- Chambon, P. 2005. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 19(6), 1418-28.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548), 1866-70.
- Chen, C.T., Ma, D.W., Kim, J.H., Mount, H.T., Bazinet, R.P. 2008. The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *J Lipid Res* 49(1), 147-52.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., Evans, R.M. 1998. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21(6), 1353-61.
- 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(52), 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(1), 471-7.
- Christiansen, E.N., Lund, J.S., Rortveit, T., Rustan, A.C. 1991. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1082(1), 57-62.
- Chu, P.W., Cheung, W.M., Kwong, Y.L. 2003. Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells. *Neuroreport* 14(15), 1935-9.
- Chung, W.L., Chen, J.J., Su, H.M. 2008. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr* 138(6), 1165-71.
- Cimini, A., Bernardo, A., Cifone, M.G., Di Marzio, L., Di Loreto, S. 2003. TNFalpha downregulates PPARdelta expression in oligodendrocyte progenitor cells: implications for demyelinating diseases. *Glia* 41(1), 3-14.
- Clandinin, M.T. 1999. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. *Lipids* 34(2), 131-7.

- Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W. 1980. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4(2), 121-9.
- Clarke, S.D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 131(4), 1129-32.
- Clouet, P., Niot, I., Bezard, J. 1989. Pathway of alpha-linolenic acid through the mitochondrial outer membrane in the rat liver and influence on the rate of oxidation. Comparison with linoleic and oleic acids. *Biochem J* 263(3), 867-73.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., Fadda, F. 2002. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115(2), 475-82.
- Cohen, S., Greenberg, M.E. 2008. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 183-209.
- Coleman, M. 2005. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6(11), 889-98.
- Collins, M.D., Mao, G.E. 1999. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 399-430.
- Combe, N., Boué, C. 2001. Apports alimentaires en acides linoléique et alpha-linolénique d'une population d'Aquitaine. *OCL* 8(2), 118-21.
- Comstock, G.W., Menkes, M.S., Schober, S.E., Vuilleumier, J.P., Helsing, K.J. 1988. Serum levels of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in older adults. *Am J Epidemiol* 127(1), 114-23.
- Conner, J.M., Lauterborn, J.C., Yan, Q., Gall, C.M., Varon, S. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17(7), 2295-313.
- Conner, J.M., Muir, D., Varon, S., Hagg, T., Manthorpe, M. 1992. The localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in the adult rat basal forebrain and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 319(3), 454-62.
- Connor, M.J., Sidell, N. 1997. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol* 30(3), 239-52.
- Corcoran, J., Maden, M. 1999. Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci* 2(4), 307-8.
- Cosma, M.P. 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10(2), 227-36.

- Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W.E., McCaffery, P. 2004. 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14), 5111-6.
- Crawford, M.A., Bazinet, R.P., Sinclair, A.J. 2009. Fat intake and CNS functioning: ageing and disease. *Ann Nutr Metab* 55(1-3), 202-28.
- Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R., Clark, J.B. 1998. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70(4), 1366-75.
- Cunnane, S.C. 2004. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(3), 237-41.
- Cunnane, S.C., Francescutti, V., Brenna, J.T., Crawford, M.A. 2000. Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. *Lipids* 35(1), 105-11.
- Cunnane, S.C., Plourde, M., Pifferi, F., Begin, M., Feart, C., Barberger-Gateau, P. 2009. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res* 48(5), 239-56.
- Cunnane, S.C., Williams, S.C., Bell, J.D., Brookes, S., Craig, K., Iles, R.A., Crawford, M.A. 1994. Utilization of uniformly labeled ¹³C-polyunsaturated fatty acids in the synthesis of long-chain fatty acids and cholesterol accumulating in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 62(6), 2429-36.

D

- Dawson, H.D., Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Rosales, F.J., Dietz, J., Shimada, T., Li, N., Ross, A.C. 2000. Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutr* 130(5), 1280-6.
- Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., Cameron, H.A. 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460(4), 563-72.
- de la Torre, J.C., Mussivand, T. 1993. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? *Neurol Res* 15, 146-53.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., Dejean, A. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 343(6254), 177-80.
- de Urquiza, A.M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R.H., Griffiths, W., Sjovall, J., Perlmann, T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290(5499), 2140-4.

- DeGeorge, J.J., Noronha, J.G., Bell, J., Robinson, P., Rapoport, S.I. 1989. Intravenous injection of [1-14C]arachidonate to examine regional brain lipid metabolism in unanesthetized rats. *J Neurosci Res* 24(3), 413-23.
- Dehmer, T., Lindenau, J., Haid, S., Dichgans, J., Schulz, J.B. 2000. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem* 74(5), 2213-6.
- Delton-Vandenbroucke, I., Grammas, P., Anderson, R.E. 1997. Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells. *J Lipid Res* 38(1), 147-59.
- DeMar, J.C., Jr., Ma, K., Bell, J.M., Igarashi, M., Greenstein, D., Rapoport, S.I. 2006. One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 47(1), 172-80.
- DeMar, J.C., Jr., Ma, K., Bell, J.M., Rapoport, S.I. 2004. Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* 91(5), 1125-37.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11(5), 339-50.
- Desvergne, B., Wahli, W. 1999. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 20(5), 649-88.
- Dev, S., Adler, A.J., Edwards, R.B. 1993. Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Res* 632(1-2), 325-8.
- Diau, G.Y., Hsieh, A.T., Sarkadi-Nagy, E.A., Wijendran, V., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T. 2005. The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *BMC Med* 23, 3-11.
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., Hof, P.R. 2007. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* 6(3), 275-84.
- Dobrossy, M.D., Drapeau, E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. 2003. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 8(12), 974-82.
- Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., Chambon, P. 1990. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110(4), 1133-51.
- Dranovsky, A., Hen, R. 2006. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59(12), 1136-43.

- Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24), 14385-90.
- Drapeau, E., Montaron, M.F., Aguerre, S., Abrous, D.N. 2007. Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci* 27(22), 6037-44.
- Drapeau, E., Nora Abrous, D. 2008. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7(4), 569-89.
- Drevon, C.A., Blomhoff, R., Rasmussen, M., Kindberg, G.M., Berg, T., Norum, K.R. 1985. Retinol esterification in cultured rat liver cells. *Biochem J* 230(3), 617-23.
- Driscoll, I., Howard, S.R., Stone, J.C., Monfils, M.H., Tomanek, B., Brooks, W.M., Sutherland, R.J. 2006. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139(4), 1173-85.
- Dubus, P., Faucheux, B., Boissiere, F., Groppi, A., Vital, C., Vital, A., Agid, Y., Hirsch, E.C., Merlio, J.P. 2000. Expression of Trk isoforms in brain regions and in the striatum of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 165(2), 285-94.
- Duester, G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134(6), 921-31.
- Duffau, H. 2006. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. *J Clin Neurosci* 13(9), 885-97.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3(4), e1959.
- Duprez, E., Lillehaug, J.R., Gaub, M.P., Lanotte, M. 1996. Differential changes of retinoid-X-receptor (RXR alpha) and its RAR alpha and PML-RAR alpha partners induced by retinoic acid and cAMP distinguish maturation sensitive and resistant t(15;17) promyelocytic leukemia NB4 cells. *Oncogene* 12(11), 2443-50.
- Dyall, S.C., Michael-Titus, A.T. 2008. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med* 10(4), 219-35.
- Dyall, S.C., Michael, G.J., Michael-Titus, A.T. 2010. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res*.
- Dyall, S.C., Michael, G.J., Whelpton, R., Scott, A.G., Michael-Titus, A.T. 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 28, 424-39.

E

- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., Foufelle, F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86(11), 839-48.
- Edmond, J. 2001. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci* 16(2-3), 181-93; discussion 215-21.
- Egea, P.F., Mitschler, A., Moras, D. 2002. Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol Endocrinol* 16(5), 987-97.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azais-Braesco, V., Jaffard, R., Higuieret, P. 1997a. Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* 412, 629-32.
- Enderlin, V., Higuieret, D., Alfos, S., Husson, M., Jaffard, R., Higuieret, P., Pallet, V. 2000. Vitamin A deficiency decreases the expression of RARb and RXRb/g in adult mouse brain: effect of RA administration. *Nutritional Neuroscience* 3, 173-81.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P. 1997b. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229, 125-9.
- Epp, J.R., Haack, A.K., Galea, L.A. 2009. Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*.
- Erickson, C.A., Barnes, C.A. 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38, 61-9.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11), 1313-7.
- Escher, P., Wahli, W. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 448(2), 121-38.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., Jaffard, R. 2003. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145(1-2), 37-49.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., Higuieret, P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21(16), 6423-9.
- Evans, R.M. 2005. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* 19(6), 1429-38.

F

- Favrelière, S., Barrier, L., Durand, G., Chalon, S., Tallineau, C. 1998. Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmalethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum. *Lipids* 33(4), 401-7.
- Favrelière, S., Perault, M.C., Huguet, F., De Javel, D., Bertrand, N., Piriou, A., Durand, G. 2003. DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 24(2), 233-43.
- Favrelière, S., Stadelmann-Ingrand, S., Huguet, F., De Javel, D., Piriou, A., Tallineau, C., Durand, G. 2000. Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Aging* 21, 653-60.
- Feat, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P., Pallet, V. 2005a. Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hyp-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26(5), 729-38.
- Féart, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., Higuieret, P. 2005b. Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Endocrinology* 152, 449-58.
- Fedorov, N.B., Pasinelli, P., Oestreicher, A.B., DeGraan, P.N., Reymann, K.G. 1995. Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Eur J Neurosci* 7(4), 819-22.
- Fedorova, I., Salem, N., Jr. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(4-5), 271-89.
- Feng, L., Hatten, M.E., Heintz, N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12(4), 895-908.
- Ferguson, S.A., Berry, K.J. 2007. Oral Accutane (13-cis-retinoic acid) has no effects on spatial learning and memory in male and female Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol Teratol* 29(2), 219-27.
- Forette, F., Rigaud, A., Le Divenah, A., Seux-Le-Viel, M. 1996. Qu'est-ce que le vieillissement? *Cah Nutr Diet* 31(2), 81-7.
- Foster, T.C., Norris, C.M. 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7(6), 602-12.
- Frielingsdorf, H., Simpson, D.R., Thal, L.J., Pizzo, D.P. 2007. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 26(1), 47-55.

G

- Gamoh, S., Hashimoto, M., Hossain, S., Masumura, S. 2001. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(4), 266-70.
- Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S. 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93(1), 237-41.
- Gao, F., Kiesewetter, D., Chang, L., Rapoport, S.I., Igarashi, M. Quantifying conversion of linoleic to arachidonic and other n-6 polyunsaturated fatty acids in unanesthetized rats. *J Lipid Res* 51(10), 2940-6.
- Gavrilov, L.A., Gavrilova, N.S. 2001. The reliability theory of aging and longevity. *J Theor Biol* 213(4), 527-45.
- Gazzaley, A., Kay, S., Benson, D.L. 2002. Dendritic spine plasticity in hippocampus. *Neuroscience* 111(4), 853-62.
- Geinisman, Y., Bondareff, W., Dodge, J.T. 1977. Partial deafferentation of neurons in the dentate gyrus of the senescent rat. *Brain Res* 134(3), 541-5.
- Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, L., Morrell, F. 1986. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9), 3027-31.
- Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I.S., Rossi, M. 1992. Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. *Hippocampus* 2(4), 437-44.
- Gerendasy, D.D., Herron, S.R., Watson, J.B., Sutcliffe, J.G. 1994. Mutational and biophysical studies suggest RC3/neurogranin regulates calmodulin availability. *J Biol Chem* 269, 22420-6.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J., Gronemeyer, H. 2006a. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 712-25.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J., Gronemeyer, H. 2006b. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 760-72.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. 2006c. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 685-704.
- Geuna, S., Borrione, P., Fornaro, M., Giacobini-Robecchi, M.G. 2001. Adult stem cells and neurogenesis: historical roots and state of the art. *Anat Rec* 265(3), 132-41.

- Ginsberg, L., Xeureb, J.H., Gershfeld, N.L. 1998. Membrane instability plasmalogen content and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 70, 2533-8.
- Giusto, N.M., Salvador, G.A., Castagnet, P.I., Pasquaré, S.J., Ilincheta de Boschero, M.G. 2002. Age-Associated Changes in Central Nervous System Glycerolipid Composition and Metabolism. *Neurochemical Research* 27(11), 1513-23.
- Giza, C.C., Prins, M.L. 2006. Is being plastic fantastic? Mechanisms of altered plasticity after developmental traumatic brain injury. *Dev Neurosci* 28(4-5), 364-79.
- Gnegy, M.E. 2000. Ca²⁺/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol* 14(2), 91-129.
- Goncalves, M.B., Boyle, J., Webber, D.J., Hall, S., Minger, S.L., Corcoran, J.P. 2005. Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Dev Biol* 278(1), 60-70.
- Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Rouillet, P., Rampon, C. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*.
- Gottesman, M.E., Quadro, L., Blaner, W.S. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23(5), 409-19.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. 1999a. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2(3), 260-5.
- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., Fuchs, E. 1999b. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9), 5263-7.
- Gould, E., Vail, N., Wagers, M., Gross, C.G. 2001. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19), 10910-7.
- Grandgirard, A., Bourre, J.M., Julliard, F., Homayoun, P., Dumont, O., Piciotti, M., Sebedio, J.L. 1994. Incorporation of trans long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina. *Lipids* 29(4), 251-8.
- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B., Yavin, E. 1999. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 40(5), 960-6.
- Green, P., Yavin, E. 1996. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids* 31(8), 859-65.
- Greenough, W.T., West, R.W., DeVogd, T.J. 1978. Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat. *Science* 202(4372), 1096-8.

- Greiner, R.S., Catalan, J.N., Moriguchi, T., Salem, N., Jr. 2003. Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* 38(4), 431-5.
- Greiner, R.S., Moriguchi, T., Slotnick, B.M., Hutton, A., Salem, N. 2001. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol Behav* 72(3), 379-85.
- Greschik, H., Wurtz, J.M., Sanglier, S., Bourguet, W., van Dorsselaer, A., Moras, D., Renaud, J.P. 2002. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9(2), 303-13.
- Gross, C.G. 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1(1), 67-73.
- Guan, Z., Wang, Y., Cairns, N.J., Lantos, P.L., Dallner, G., Sindelar, P.J. 1999. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(7), 740-7.
- Guesnet, P., Alessandri, J.M., Astorg, P., Pifferi, F., Lavalie, M. 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL* 12(5-6), 333-43.

H

- Hagg, T. 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* 28(11), 589-95.
- Hallfrisch, J., Muller, D.C., Singh, V.N. 1994. Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Am J Clin Nutr* 60(2), 176-82.
- Hamilton, J.A., Brunaldi, K. 2007. A model for Fatty Acid transport into the brain. *J Mol Neurosci* 33(1), 12-7.
- Hanhoff, T., Lucke, C., Spener, F. 2002. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biochem* 239(1-2), 45-54.
- Harburger, L.L., Lambert, T.J., Frick, K.M. 2007. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res* 185(1), 43-8.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J., Shido, O. 2002. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 81(5), 1084-91.
- He, C., Qu, X., Cui, L., Wang, J., Kang, J.X. 2009. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(27), 11370-5.

- He, J., Cheng, Q., Xie, W. 2010. Minireview: Nuclear receptor-controlled steroid hormone synthesis and metabolism. *Mol Endocrinol* 24(1), 11-21.
- Heneka, M.T., Landreth, G.E. 2007. PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1771(8), 1031-45.
- Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennen, L., Malvy, D., Roussel, A.M., Favier, A., Briancon, S. 2004. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 164(21), 2335-42.
- Heude, B., Ducimetiere, P., Berr, C. 2003. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. *Am J Clin Nutr* 77(4), 803-8.
- Hihi, A.K., Michalik, L., Wahli, W. 2002. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 59(5), 790-8.
- Hollander, D., Dadufalza, V. 1990. Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp Gerontol* 25(1), 61-5.
- 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(3), 617-23.
- Horrocks, L.A., Farooqui, A.A. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(4), 361-72.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-42.
- Huang, F.L., Huang, K.P., Boucheron, C. 2007. Long-term enrichment enhances the cognitive behavior of the aging neurogranin null mice without affecting their hippocampal LTP. *Learn Mem* 14(8), 512-9.
- Huang, F.L., Huang, K.P., Wu, J., Boucheron, C. 2006. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci* 26(23), 6230-7.
- Huang, K.P., Huang, F.L., Jager, T., Li, J., Reymann, K.G., Balschun, D. 2004. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci* 24(47), 10660-9.
- Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F. 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72, 247-72.

- Hulshof, K.F., van Erp-Baart, M.A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S.M., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A.H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J.M., Aro, A., Kafatos, A.G., Lanzmann-Petithory, D., van Poppel, G. 1999. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *Eur J Clin Nutr* 53(2), 143-57.
- Huo, T., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J., Failla, M.L. 2007. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55(22), 8950-7.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, P. 2004. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res* 123(1-2), 7-17.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Féart, C., Higuieret, P., Pallet, V. 2003. Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *British Journal of Nutrition* 90, 191-8.
- Husson, M., Enderlin, V., Delacourte, A., Ghenimi, N., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P. 2006. Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis* 23(1), 1-10.

I

- Ikemoto, A., Nitta, A., Furukawa, S., Ohishi, M., Nakamura, A., Fujii, Y., Okuyama, H. 2000. Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 285(2), 99-102.
- Ilincheta de Boschero, M.G., Roque, M.E., Salvador, G.A., Giusto, N.M. 2000. Alternative pathways for phospholipid synthesis in different brain areas during aging. *Experimental Gerontology* 35, 653-68.
- Iniguez, M.A., Morte, B., Rodriguez-Pena, A., Munoz, A., Gerendasy, D., Sutcliffe, J.G., Bernal, J. 1994. Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res Mol Brain Res* 27(2), 205-14.
- Innis, S.M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol* 554, 27-43.
- Innis, S.M. 2007. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 137(4), 855-9.

- Innis, S.M. 2009. Omega-3 Fatty acids and neural development to 2 years of age: do we know enough for dietary recommendations? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48 Suppl 1, S16-24.
- Issemann, I., Green, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-50.

J

- Jacobs, S., Lie, D.C., DeCicco, K.L., Shi, Y., DeLuca, L.M., Gage, F.H., Evans, R.M. 2006. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10), 3902-7.
- Jansen-Durr, P., Osiewacz, H.D. 2002. Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing. *EMBO Rep* 3(12), 1127-32.
- Jarvis, C.I., Goncalves, M.B., Clarke, E., Dogruel, M., Kalindjian, S.B., Thomas, S.A., Maden, M., Corcoran, J.P. 2010. Retinoic acid receptor-alpha signalling antagonizes both intracellular and extracellular amyloid-beta production and prevents neuronal cell death caused by amyloid-beta. *Eur J Neurosci* 32(8), 1246-55.
- Jensen, C.L., Heird, W.C. 2002. Lipids with an emphasis on long-chain polyunsaturated fatty acids. *Clin Perinatol* 29(2), 261-81, vi.
- Jiang, L.H., Shi, Y., Wang, L.S., Yang, Z.R. 2009. The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem* 20(9), 735-41.
- Jicha, G.A., Markesbery, W.R. 2010. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 5, 45-61.
- Johnson, E.J., Krasinski, S.D., Russell, R.M. 1992. Sex differences in postabsorptive plasma vitamin A transport. *Am J Clin Nutr* 56(5), 911-6.
- Jones, C.R., Arai, T., Rapoport, S.I. 1997. Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse. *Neurochem Res* 22(6), 663-70.
- Jump, D.B. 2004. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41(1), 41-78.

K

- Kaduce, T.L., Chen, Y., Hell, J.W., Spector, A.A. 2008. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 105, 1525-35.

- Kalmijn, S., Feskens, E.J., Launer, L.J., Kromhout, D. 1997a. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol* 145(1), 33-41.
- Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., Breteler, M.M. 1997b. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42(5), 776-82.
- Kalmijn, S., van Boxtel, M.P., Ocke, M., Verschuren, W.M., Kromhout, D., Launer, L.J. 2004. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62(2), 275-80.
- Kane, M.A., Chen, N., Sparks, S., Napoli, J.L. 2005. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J* 388(Pt 1), 363-9.
- Kato, S., Mano, H., Kumazawa, T., Yoshizawa, Y., Kojima, R., Masushige, S. 1992. Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J* 286 (Pt 3), 755-60.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I.K., Inaguma, Y., Kato, K. 2002. Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *Faseb J* 16(10), 1328-30.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., Sun, H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315(5813), 820-5.
- Kawakita, E., Hashimoto, M., Shido, O. 2006. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* 139(3), 991-7.
- Kawashima, A., Harada, T., Kami, H., Yano, T., Imada, K., Mizuguchi, K. 2010. Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J Nutr Biochem* 21(4), 268-77.
- Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A.D., O'Mara, S.M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K.A., Nicolaou, A., Lynch, M.A. 2010. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol Aging*.
- Kempermann, G., Gage, F.H. 2000. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231, 220-35; discussion 35-41, 302-6.
- Kempermann, G., Gast, D., Gage, F.H. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52(2), 135-43.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130(2), 391-9.

- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624), 493-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18(9), 3206-12.
- Khan, S.A., Vanden Heuvel, J.P. 2003. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *J Nutr Biochem* 14(10), 554-67.
- Khorasanizadeh, S., Rastinejad, F. 2001. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26(6), 384-90.
- Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.L., Song, H. 2007. Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? *Neurosurg Clin N Am* 18(1), 105-13, x.
- Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Barcelo-Coblijn, G., Yeo, Y.K., Farkas, T. 2002. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5), 2619-24.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9), 4318-23.
- Kodas, E., Galineau, L., Bodard, S., Vancassel, S., Guilloteau, D., Besnard, J.C., Chalon, S. 2004. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J Neurochem* 89(3), 695-702.
- Kodas, E., Vancassel, S., Lejeune, B., Guilloteau, D., Chalon, S. 2002. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J Lipid Res* 43(8), 1209-19.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., Flier, J.S. 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310(5748), 679-83.
- Kota, B.P., Huang, T.H., Roufogalis, B.D. 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51(2), 85-94.
- Kremarik-Bouillaud, P., Schohn, H., Dauca, M. 2000. Regional distribution of PPARbeta in the cerebellum of the rat. *J Chem Neuroanat* 19(4), 225-32.
- Krezel, W., Kastner, P., Chambon, P. 1999. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89(4), 1291-300.
- Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzyk, M., Gobaille, S., Muramatsu, S., Krezel, W. 2010. Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron* 66(6), 908-20.

- Kumar, V.B., Vyas, K., Buddhiraju, M., Alshaher, M., Flood, J.F., Morley, J.E. 1999. Changes in membrane fatty acids and delta-9 desaturase in senescence accelerated (SAMP8) mouse hippocampus with aging. *Life Sci* 65(16), 1657-62.
- Kuriki, K., Nagaya, T., Tokudome, Y., Imaeda, N., Fujiwara, N., Sato, J., Goto, C., Ikeda, M., Maki, S., Tajima, K., Tokudome, S. 2003. Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intakes: a cross-sectional study. *J Nutr* 133(11), 3643-50.
- Kurlandsky, S.B., Gamble, M.V., Ramakrishnan, R., Blaner, W.S. 1995. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 270(30), 17850-7.

L

- Labelle, C., Leclerc, N. 2000. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 123(1), 1-11.
- Landau, S.M., Lal, R., O'Neil, J.P., Baker, S., Jagust, W.J. 2009. Striatal dopamine and working memory. *Cereb Cortex* 19(2), 445-54.
- Landfield, P.W. 1988. Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol Aging* 9(5-6), 571-9.
- Lane, M.A., Bailey, S.J. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75(4), 275-93.
- Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 79, 935-45.
- 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(1-2), 1-94.
- Lavialle, M., Denis, I., Guesnet, P., Vancassel, S. 2010. Involvement of omega-3 fatty acids in emotional responses and hyperactive symptoms. *J Nutr Biochem* 21(10), 899-905.
- Laye, S. 2010. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6), 295-303.
- Le Doze, F., Debruyne, D., Albessard, F., Barre, L., Defer, G.L. 2000. Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. *Drug Metab Dispos* 28(2), 205-8.

- Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y.F., Billman, G.E. 2003. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 107(21), 2646-52.
- Lee, A. 2001. Membrane structure. *Curr Biol* 11(20), R811-4.
- Lee, C.H., Olson, P., Evans, R.M. 2003. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology* 144(6), 2201-7.
- Lee, E., Son, H. 2009. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42(5), 239-44.
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82(6), 1367-75.
- Lee, M.L., Kuo, F.C., Whitmore, G.A., Sklar, J. 2000. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18), 9834-9.
- Legrand, P. 2004. Comment augmenter l'apport nutritionnel en acides gras n-3? *OCL* 11(1), 50-4.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20), 11032-7.
- Lemarchal, P. 1989. La régulation hormonale et nutritionnelle des désaturases. *Cah Nutr Diet* 2, 99-106.
- Lemotte, P.K., Keidel, S., Apfel, C.M. 1996. Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 236(1), 328-33.
- Lengqvist, J., Mata De Urquiza, A., Bergman, A.C., Willson, T.M., Sjoval, J., Perlmann, T., Griffiths, W.J. 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 3(7), 692-703.
- Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Kastner, P., Dierich, A., Chambon, P. 1991. Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *Embo J* 10(1), 59-69.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T.J. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16(3), 216-24.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., Shors, T.J. 2004. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 24(34), 7477-81.

- Levant, B., Ozias, M.K., Carlson, S.E. 2007. Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J Nutr* 137(1), 130-4.
- Levental, I., Grzybek, M., Simons, K. 2010. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* 49(30), 6305-16.
- Levin, A.A., Sturzenbecker, L.J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., et al. 1992. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355(6358), 359-61.
- Lim, S.-Y., Suzuki, H. 2000. Intakes of Dietary Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Egg Phosphatidylcholine Improve Maze-Learning Ability in Young and Old Mice. *J Nutr* 130, 1629-32.
- Lim, S.Y., Hoshiba, J., Salem, N., Jr. 2005. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *J Neurochem* 95(3), 848-57.
- Linnarsson, S., Willson, C.A., Ernfors, P. 2000. Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice. *Brain Res Mol Brain Res* 75(1), 61-9.
- Liperoti, R., Landi, F., Fusco, O., Bernabei, R., Onder, G. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence. *Curr Pharm Des* 15(36), 4165-72.
- Liu, S., Wang, J., Zhu, D., Fu, Y., Lukowiak, K., Lu, Y.M. 2003. Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23(3), 732-6.
- Lledo, P.M., Alonso, M., Grubb, M.S. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7(3), 179-93.
- Lonard, D.M., O'Malley B, W. 2007. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27(5), 691-700.
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6(8), 603-14.
- Luzzati, F., De Marchis, S., Fasolo, A., Peretto, P. 2006. Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26(2), 609-21.

M

- Ma, D., Zhang, M., Mori, Y., Yao, C., Larsen, C.P., Yamashima, T., Zhou, L. 2010. Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia. *Hippocampus* 20(7), 811-9.

- Macala, L.J., Yu, R.K., Ando, S. 1983. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J Lipid Res* 24, 1243-50.
- Maden, M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3(11), 843-53.
- Magnusson, K.R. 1998. Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech Ageing Dev* 104(3), 227-48.
- Magnusson, K.R., Scruggs, B., Aniya, J., Wright, K.C., Ontl, T., Xing, Y., Bai, L. 2003. Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav Neurosci* 117(3), 485-95.
- Magnusson, K.R., Scruggs, B., Zhao, X., Hammersmark, R. 2007. Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci* 8, 43.
- Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M.L., Pinault, M., Lavillonniere, F., Body, G., Le Floch, O., Chajes, V. 2002. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int J Cancer* 98(1), 78-83.
- Malvy, D.J., Preziosi, P., Galan, P., Roussel, A.M., Favier, A., Briancon, S., Hercberg, S. 1999. La consommation de lipides en France: contribution à l'équilibre nutritionnel (données préliminaires de l'étude Su.Vi.Max). *OCL* 6(1), 21-5.
- Mangelsdorf, D.J. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52(2 Pt 2), S32-44.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., Evans, R.M. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345(6272), 224-9.
- Marszalek, J.R., Lodish, H.F. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 633-57.
- Martin, A. 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. 3e éd. ed, Éd. Tec & doc ed. Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation, Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Paris.
- Martin, D.S., Spencer, P., Horrobin, D.F., Lynch, M.A. 2002. Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67(2-3), 121-30.
- Martinez, M. 1992. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120(4 Pt 2), S129-38.
- Martinez, M. 1994. Polyunsaturated fatty acids in the developing human brain, red cells and plasma: influence of nutrition and peroxisomal disease. *World Rev Nutr Diet* 75, 70-8.

- Martinez, M., Mougan, I. 1998. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J Neurochem* 71(6), 2528-33.
- Martinez, S.E., Vaglenova, J., Sabria, J., Martinez, M.C., Farres, J., Pares, X. 2001. Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268(19), 5045-56.
- McCaffery, P., Drager, U.C. 1994. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16), 7772-6.
- McCaffery, P., Drager, U.C. 2000. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11(3), 233-49.
- McCaffery, P.J., Adams, J., Maden, M., Rosa-Molinar, E. 2003. Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* 18(3), 457-72.
- McDonald, H.Y., Wojtowicz, J.M. 2005. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385(1), 70-5.
- McGahon, B.M., Martin, D.S.D., Horrobin, D.F., Lynch, M.A. 1999. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with w-3 fatty acids. *Neuroscience* 94(1), 305-14.
- McNamara, R.K., Able, J., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P. 2009. Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. *Psychoneuroendocrinology* 34(4), 532-9.
- McNamara, R.K., Carlson, S.E. 2006. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 329-49.
- Meiri, K.F., Willard, M., Johnson, M.I. 1988. Distribution and phosphorylation of the growth-associated protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* 8(7), 2571-81.
- Menesi, D., Kitajka, K., Molnar, E., Kis, Z., Belleger, J., Narce, M., Kang, J.X., Puskas, L.G., Das, U.N. 2009. Gene and protein expression profiling of the fat-1 mouse brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80(1), 33-42.
- Merrill, D.A., Karim, R., Darraq, M., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H. 2003. Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J Comp Neurol* 459(2), 201-7.
- Metsis, M. 2001. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 58(8), 1014-20.

- Mey, J., McCaffery, P. 2004. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* 10(5), 409-21.
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., Marighetto, A. 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28(1), 279-91.
- Mino, M., Tamai, H., Tanabe, T., Morinobu, T., Ohsawa, N., Takamatsu, J., Miyata, S., Hirahara, F. 1993. Nutritional status of antioxidant vitamins (A, E, and beta-carotene) in elderly Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 39 Suppl, S67-74.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F., Evans, R.M. 2001. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20), 11714-9.
- Mobarhan, S., Seitz, H.K., Russell, R.M., Mehta, R., Hupert, J., Friedman, H., Layden, T.J., Meydani, M., Langenberg, P. 1991. Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats. *J Nutr* 121(4), 510-7.
- Mochizuki, K., Suruga, K., Kitagawa, M., Takase, S., Goda, T. 2001. Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine. *Arch Biochem Biophys* 389(1), 41-8.
- Mohapel, P., Mundt-Petersen, K., Brundin, P., Frielingsdorf, H. 2006. Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 142(3), 609-13.
- Moore, S.A. 1994. Local synthesis and targeting of essential fatty acids at the cellular interface between blood and brain: a role for cerebral endothelium and astrocytes in the accretion of CNS docosahexaenoic acid. *World Rev Nutr Diet* 75, 128-33.
- Moore, S.A. 2001. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci* 16(2-3), 195-200.
- Moore, S.A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G.R., Spector, A.A. 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem* 56(2), 518-24.
- Moore, S.A., Yoder, E., Spector, A.A. 1990. Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *J Neurochem* 55(2), 391-402.
- Moras, D., Gronemeyer, H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10(3), 384-91.

- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., Ceru, M.P. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123(1), 131-45.
- Moriguchi, T., Greiner, R.S., Salem, N., Jr. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75(6), 2563-73.
- Moriguchi, T., Lim, S.Y., Greiner, R., Lefkowitz, W., Loewke, J., Hoshiba, J., Salem, N., Jr. 2004. Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats. *J Lipid Res* 45(8), 1437-45.
- Moriguchi, T., Loewke, J., Garrison, M., Catalan, J.N., Salem, N., Jr. 2001. Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum. *J Lipid Res* 42(3), 419-27.
- Moriguchi, T., Salem, N., Jr. 2003. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem* 87(2), 297-309.
- Morinobu, T., Murata, T., Takaya, R., Tamai, H. 2002. Nutritional status of beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol in obese children. *Int J Vitam Nutr Res* 72(3), 119-23.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Aggarwal, N., Schneider, J., Wilson, R.S. 2003. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60(2), 194-200.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., Schneider, J. 2003. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60(7), 940-6.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Tangney, C.C., Bienias, J.L., Wilson, R.S. 2005. Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arch Neurol* 62(12), 1849-53.
- Moser, M.B. 1999. Making more synapses: a way to store information? *Cell Mol Life Sci* 55(4), 593-600.
- Murray, E.A., Baxter, M.G., Gaffan, D. 1998. Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behav Neurosci* 112(6), 1291-303.
- Muskiet, F.A., Fokkema, M.R., Schaafsma, A., Boersma, E.R., Crawford, M.A. 2004. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *J Nutr* 134(1), 183-6.

N

- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., Chambon, P. 1992. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* 70(6), 1007-19.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of D6, D5, and D9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 24, 345-76.
- Namestkova, K., Simonova, Z., Sykova, E. 2005. Decreased proliferation in the adult rat hippocampus after exposure to the Morris water maze and its reversal by fluoxetine. *Behav Brain Res* 163(1), 26-32.
- Nariai, T., Greig, N.H., DeGeorge, J.J., Genka, S., Rapoport, S.I. 1993. Intravenously injected radiolabelled fatty acids image brain tumour phospholipids in vivo: differential uptakes of palmitate, arachidonate and docosahexaenoate. *Clin Exp Metastasis* 11(2), 141-9.
- Nasrollahzadeh, J., Siassi, F., Doosti, M., Eshraghian, M.R., Shokri, F., Modarressi, M.H., Mohammadi-Asl, J., Abdi, K., Nikmanesh, A., Karimian, S.M. 2008. The influence of feeding linoleic, gamma-linolenic and docosahexaenoic acid rich oils on rat brain tumor fatty acids composition and fatty acid binding protein 7 mRNA expression. *Lipids Health Dis* 7, 45.
- Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstad, L., Luck, S. 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11), 4021-5.
- Newman, J., Grace, A.A. 1999. Binding across time: the selective gating of frontal and hippocampal systems modulating working memory and attentional states. *Conscious Cogn* 8(2), 196-212.
- Niederreither, K., Dolle, P. 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9(7), 541-53.
- Niemoller, T.D., Bazan, N.G. 2010. Docosahexaenoic acid neurolipidomics. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 91, 85-9.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P.S. 1999. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39(4), 569-78.
- Novac, N., Heinzl, T. 2004. Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3(4), 335-46.

O

- O'Malley, B. 1990. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 4(3), 363-9.
- Olefsky, J.M. 2001. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276(40), 36863-4.
- Olson, C.R., Mello, C.V. 2010. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res* 54(4), 489-95.
- Ondkova, S., Bakos, J., Macejova, D., Jezova, D., Brtko, J. 2010. Changes in retinoic acid receptor status, 5'-deiodinase activity and neuroendocrine response to voluntary wheel running. *Gen Comp Endocrinol* 165(2), 304-8.
- Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., Brown, M.S. 2001. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11), 6027-32.
- Ouellet, M., Emond, V., Chen, C.T., Julien, C., Bourasset, F., Oddo, S., LaFerla, F., Bazinet, R.P., Calon, F. 2009. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int* 55(7), 476-82.
- Overstreet-Wadiche, L.S., Westbrook, G.L. 2006. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16(3), 208-15.
- Owada, Y. 2008. Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J Exp Med* 214(3), 213-20.

P

- Pak, J.H., Huang, F.L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K.G., Chiang, C., Westphal, H., Huang, K.P. 2000. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21), 11232-7.
- Pallet, V., Azais-Braesco, V., Enderlin, V., Grolier, P., Noel-Suberville, C., Garcin, H., Higuieret, P. 1997. Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. *Mech Ageing Dev* 99(2), 123-36.
- Pares, X., Farres, J., Kedishvili, N., Duester, G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65(24), 3936-49.

- Parisotto, M., Brodeur, H., Bhat, P.V., Mader, S. 2006. [Retinoid metabolism and cancer]. *Med Sci (Paris)* 22(12), 1101-6.
- Park, K.S., Lee, R.D., Kang, S.K., Han, S.Y., Park, K.L., Yang, K.H., Song, Y.S., Park, H.J., Lee, Y.M., Yun, Y.P., Oh, K.W., Kim, D.J., Yun, Y.W., Hwang, S.J., Lee, S.E., Hong, J.T. 2004. Neuronal differentiation of embryonic midbrain cells by upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the JNK-dependent pathway. *Exp Cell Res* 297(2), 424-33.
- Partridge, L., Gems, D. 2002. Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet* 3(3), 165-75.
- Pascual, M., Rocamora, N., Acsady, L., Freund, T.F., Soriano, E. 1998. Expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNAs in hippocampal interneurons: morphological characterization, levels of expression, and colocalization of nerve growth factor and neurotrophin-3. *J Comp Neurol* 395(1), 73-90.
- Pawlosky, R.J., Ward, G., Salem, N., Jr. 1996. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. *Lipids* 31 Suppl, S103-S7.
- Pégorier, J.-P., Le May, C., Girard, J. 2004. Control of Gene Expression by Fatty Acids. 134, 2444S-9S.
- Petkovich, P.M. 2001. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45(5), S136-42.
- Petursdottir, A.L., Farr, S.A., Morley, J.E., Banks, W.A., Skuladottir, G.V. 2007. Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging* 28(8), 1170-8.
- Plourde, M., Cunnane, S.C. 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab* 32(4), 619-34.
- Pu, L., Igbavboa, U., Wood, W.G., Roths, J.B., Kier, A.B., Spener, F., Schroeder, F. 1999. Expression of fatty acid binding proteins is altered in aged mouse brain. *Mol Cell Biochem* 198(1-2), 69-78.
- Puskas, L.G., Kitajka, K., Nyakas, C., Barcelo-Coblijn, G., Farkas, T. 2003. Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4), 1580-5.

Q

- Qiu, G., Liu, S., So, K.F. 2010. Dietary restriction and brain health. *Neurosci Bull* 26(1), 55-65.

R

- Rahman, T., Taha, A.Y., Song, B.J., Orr, S.K., Liu, Z., Chen, C.T., Bazinet, R.P. 2010. The very low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(2-3), 141-5.
- Raisman, G. 1969. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res* 14(1), 25-48.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F., Barnes, C.A. 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26(47), 12237-41.
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Shetty, A.K. 2006. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging Cell* 5(6), 545-58.
- Rao, M.S., Shetty, A.K. 2004. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19(2), 234-46.
- Rapoport, S.I. 2001. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. *J Mol Neurosci* 16(2-3), 243-61.
- Rapoport, S.I., Igarashi, M., Gao, F. 2010. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6), 273-6.
- Rapoport, S.I., Rao, J.S., Igarashi, M. 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(5-6), 251-61.
- Rastinejad, F. 2001. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11(1), 33-8.
- Razanamahefa, L., Lafay, L., Oseredczuk, M., Thiebaut, A., Laloux, L., Gerber, M., Astorg, P., Berta, J.L. 2005. Dietary fat consumption of the French population and quality of the data on the composition of the major food groups. *Bull Cancer* 92(7), 647-57.
- Reichardt, L.F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473), 1545-64.
- Roberts, L.J., 2nd, Fessel, J.P., Davies, S.S. 2005. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathol* 15(2), 143-8.
- Rocamora, N., Pascual, M., Acsady, L., de Lecea, L., Freund, T.F., Soriano, E. 1996. Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J Neurosci* 16(12), 3991-4004.

- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69(3), 143-79.
- Routtenberg, A., Cantalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P., Namgung, U. 2000. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13), 7657-62.
- Roux, P.P., Barker, P.A. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67(3), 203-33.
- Russell, A.P., Hesselink, M.K., Lo, S.K., Schrauwen, P. 2005. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *Faseb J* 19(8), 986-8.
- Russell, R.M. 2000. The aging process as a modifier of metabolism. *Am J Clin Nutr* 72(2 Suppl), 529S-32S.

S

- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., Castren, E. 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25(5), 1089-94.
- Sakai, Y., Crandall, J.E., Brodsky, J., McCaffery, P. 2004. 13-cis Retinoic acid (accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice. *Ann N Y Acad Sci* 1021, 436-40.
- Sakamoto, T., Cansev, M., Wurtman, R.J. 2007. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 1182, 50-9.
- Salari, P., Rezaie, A., Larijani, B., Abdollahi, M. 2008. A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis. *Med Sci Monit* 14(3), RA37-44.
- Salehi, A., Delcroix, J.D., Mobley, W.C. 2003. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 26(2), 73-80.
- Salem, N., Jr., Litman, B., Kim, H.Y., Gawrisch, K. 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36(9), 945-59.
- Sampath, H., Ntambi, J.M. 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev* 62(9), 333-9.
- Sampath, H., Ntambi, J.M. 2005. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 25, 317-40.

- Sani, B.P., Allen, R.D., Moorer, C.M., McGee, B.W. 1987. Interference of retinoic acid binding to its binding protein by omega-6 fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 147(1), 25-30.
- Sastry, P.S. 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24(2), 69-176.
- Saunders, D.E., Hannigan, J.H., Zajac, C.S., Wappler, N.L. 1995. Reversal of alcohol's effects on neurite extension and on neuronal GAP43/B50, N-myc, and c-myc protein levels by retinoic acid. *Brain Res Dev Brain Res* 86(1-2), 16-23.
- Scheibe, R.J., Wagner, J.A. 1992. Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem* 267, 17611-16.
- Schiefermeier, M., Yavin, E. 2002. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. *J Lipid Res* 43(1), 124-31.
- Schinder, A.F., Gage, F.H. 2004. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)* 19, 253-61.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429(6988), 184-7.
- Schmitz, G., Ecker, J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47(2), 147-55.
- Schroeder, F., Petrescu, A.D., Huang, H., Atshaves, B.P., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Hostetler, H.A., Vespa, A., Landrock, D., Landrock, K.K., Payne, H.R., Kier, A.B. 2007. Role of Fatty Acid Binding Proteins and Long Chain Fatty Acids in Modulating Nuclear Receptors and Gene Transcription. *Lipids* 43(1), 1-17.
- Schug, T.T., Berry, D.C., Shaw, N.S., Travis, S.N., Noy, N. 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129(4), 723-33.
- Selkoe, D.J. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594), 789-91.
- Serhan, C.N. 2005. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(2), 115-21.
- Serini, S., Piccioni, E., Calviello, G. 2009. Dietary n-3 PUFA vascular targeting and the prevention of tumor growth and age-related macular degeneration. *Curr Med Chem* 16(34), 4511-26.
- Shaw, N., Elholm, M., Noy, N. 2003. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 278(43), 41589-92.
- Shukitt-Hale, B., Cheng, V., Joseph, J.A. 2009. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci* 12(3), 135-40.

- Shukitt-Hale, B., Mouzakis, G., Joseph, J.A. 1998. Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Exp Gerontol* 33(6), 615-24.
- Simopoulos, A.P. 2001. Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 88, 18-27.
- Simopoulos, A.P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56(8), 365-79.
- Simopoulos, A.P. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60(9), 502-7.
- Simopoulos, A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(6), 674-88.
- Smith, J.W., Evans, A.T., Costall, B., Smythe, J.W. 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev* 26(1), 45-60.
- Smith, S.A., Monteith, G.R., Robinson, J.A., Venkata, N.G., May, F.J., Roberts-Thomson, S.J. 2004. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor beta activator GW0742 in rat cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 77, 240-9.
- Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J., Wojtowicz, J.M. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130(4), 843-52.
- Soderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., Dallner, G. 1991. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26(6), 421-5.
- Soderhjelm, L., Wiese, H., Holman, R. 1970. The role of polyunsaturated acids in human nutrition and metabolism. *Prog Chem fats lipids IX*, 555-85.
- Solfrizzi, V., Colacicco, A.M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., Capurso, A., Panza, F. 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging* 27(11), 1694-704.
- Sonntag, W.E., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Xu, X., Ingram, R.L., Brunso-Bechtold, J.K. 2000. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res Bull* 51(4), 331-8.
- Spector, A.A. 2001. Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci* 16(2-3), 159-65; discussion 215-21.
- Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D., Weintraub, N.L. 2004. Epoxyicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 43(1), 55-90.

- Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486(2-3), 219-31.
- Staels, B. 2001. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids. *J Am Acad Dermatol* 45(5), S158-67.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K., Kempermann, G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46(1), 41-52.
- Stillwell, W., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Siddiqui, R., Wassall, S.R. 2005. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45(5), 559-79.
- Stoelzel, C.R., Stavnezer, A.J., Denenberg, V.H., Ward, M., Markus, E.J. 2002. The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and nonspatial comparable versions of the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 78(2), 217-33.
- Storlien, L.H., Hulbert, A.J., Else, P.L. 1998. Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(6), 559-63.
- Strosznajder, J., Chalimoniuk, M., Strosznajder, R.P., Albanese, V., Alberghina, M. 1996. Arachidonate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat during aging. *Neurosci Lett* 209(3), 145-8.
- Strosznajder, J., Samochocki, M., Duran, M. 1994. Aging diminishes serotonin-stimulated arachidonic acid uptake and cholinergic receptor-activated arachidonic acid release in rat brain cortex membrane. *J Neurochem* 62(3), 1048-54.
- Su, H.M. 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21(5), 364-73.
- Sullivan, E.V., Adalsteinsson, E., Hedehus, M., Ju, C., Moseley, M., Lim, K.O., Pfefferbaum, A. 2001. Equivalent disruption of regional white matter microstructure in ageing healthy men and women. *Neuroreport* 12, 99-104.
- Sundboom, J., Olson, J.A. 1984. Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp Gerontol* 19(4), 257-65.
- Suzuki, H., Manabe, S., Wada, O., Crawford, M.A. 1997. Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. *Int J Vitam Nutr Res* 67(4), 272-8.
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I.P., Davies, P.J., Nagy, L. 2004. Retinoid X receptors: Exploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2, S126-43.

T

- Takahashi, J., Palmer, T.D., Gage, F.H. 1999. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38(1), 65-81.
- Tan, N.S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W., Noy, N. 2002. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 22(14), 5114-27.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401(6748), 63-9.
- Theodosiou, M., Laudet, V., Schubert, M. 2010. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 67(9), 1423-45.
- Thibault, O., Landfield, P.W. 1996. Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272(5264), 1017-20.
- Toescu, E.C., Verkhratsky, A., Landfield, P.W. 2004. Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27(10), 614-20.
- Topic, B., Willuhn, I., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., Huston, J.P., Hasenohrl, R.U. 2007. Impaired maze performance in aged rats is accompanied by increased density of NMDA, 5-HT_{1A}, and alpha-adrenoceptor binding in hippocampus. *Hippocampus* 17(1), 68-77.
- Touzani, K., Marighetto, A., Jaffard, R. 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci* 17(3), 628-40.
- Troen, B.R. 2003. The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 70(1), 3-22.

U

- Ulmann, L., Mimouni, V., Roux, S., Porsolt, R., Poisson, J.-P. 2001. Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 64(3), 189-95.
- Utsunomiya, A., Owada, Y., Yoshimoto, T., Kondo, H. 1997. Localization of mRNA for fatty acid transport protein in developing and mature brain of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 46(1-2), 217-22.

V

- Vallee, M., MacCari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., Mayo, W. 1999. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 11(8), 2906-16.
- van Bilsen, M., van der Vusse, G.J., Gilde, A.J., Lindhout, M., van der Lee, K.A. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol Cell Biochem* 239(1-2), 131-8.
- Van der Borght, K., Wallinga, A.E., Luiten, P.G., Eggen, B.J., Van der Zee, E.A. 2005. Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci* 119(4), 926-32.
- van der Loo, B., Labugger, R., Aebischer, C.P., Bachschmid, M., Spitzer, V., Kilo, J., Altwegg, L., Ullrich, V., Luscher, T.F. 2004. Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 43(1), 26-30.
- van Het Hof, K.H., West, C.E., Weststrate, J.A., Hautvast, J.G. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130(3), 503-6.
- Van Lookeren Campagne, M., Dotti, C.G., Jap Tjoen San, E.R., Verkleij, A.J., Gispen, W.H., Oestreicher, A.B. 1992. B-50/GAP43 localization in polarized hippocampal neurons in vitro: an ultrastructural quantitative study. *Neuroscience* 50(1), 35-52.
- van Neerven, S., Kampmann, E., Mey, J. 2008. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol*.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25(38), 8680-5.
- VanGuilder, H.D., Yan, H., Farley, J.A., Sonntag, W.E., Freeman, W.M. 2010. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem* 113(6), 1577-88.
- Veerkamp, J.H., Zimmerman, A.W. 2001. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol Neurosci* 16(2-3), 133-42; discussion 51-7.
- Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., Bordet, R. 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34(2), 199-211.
- von Bohlen und Halbach, O., Zacher, C., Gass, P., Unsicker, K. 2006. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J Neurosci Res* 83(4), 525-31.

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(30), 19995-20000.

W

Wainwright, P.E., Bulman-Fleming, M.B., Lévesque, S., Mutsaers, L., McCutcheon, D. 1998. A saturated-fat diet during development alters dendritic growth in mouse brain. *Nutritional Neuroscience* 1, 49-58.

Wainwright, P.E., Xing, H.C., Ward, G.R., Huang, Y.S., Bobik, E., Auestad, N., Montalto, M. 1999. Water maze performance is unaffected in artificially reared rats fed diets supplemented with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *J Nutr* 129(5), 1079-89.

Wan, Y.J., Wang, L., Wu, T.C. 1994. The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans- and 9-cis-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 210(1), 56-61.

Wang, T.W., Zhang, H., Parent, J.M. 2005. Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development* 132(12), 2721-32.

Wang, Y., Wang, L., Wu, J., Cai, J. 2006. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148(2), 147-53.

Washizaki, K., Smith, Q.R., Rapoport, S.I., Purdon, A.D. 1994. Brain arachidonic acid incorporation and precursor pool specific activity during intravenous infusion of unesterified [³H]arachidonate in the anesthetized rat. *J Neurochem* 63(2), 727-36.

Watanabe, A., Toyota, T., Owada, Y., Hayashi, T., Iwayama, Y., Matsumata, M., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., Maekawa, M., Ohnishi, T., Arai, R., Sakurai, K., Yamada, K., Kondo, H., Hashimoto, K., Osumi, N., Yoshikawa, T. 2007. Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLoS Biol* 5(11), e297.

Werner, E.A., Deluca, H.F. 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(3), E672-8.

Whalley, L.J., Fox, H.C., Wahle, K.W., Starr, J.M., Deary, I.J. 2004. Cognitive aging, childhood intelligence, and the use of food supplements: possible involvement of n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 80(6), 1650-7.

Wietrzych, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P.F., Chambon, P., Krezel, W. 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12(3), 318-26.

- Williams, B.J., Bimonte-Nelson, H.A., Granholm-Bentley, A.C. 2006. ERK-mediated NGF signaling in the rat septo-hippocampal pathway diminishes with age. *Psychopharmacology (Berl)* 188(4), 605-18.
- Williams, C.M., Burdge, G. 2006. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc* 65(1), 42-50.
- Williard, D.E., Harmon, S.D., Kaduce, T.L., Preuss, M., Moore, S.A., Robbins, M.E., Spector, A.A. 2001. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res* 42(9), 1368-76.
- Williard, D.E., Harmon, S.D., Kaduce, T.L., Spector, A.A. 2002. Comparison of 20-, 22-, and 24-carbon n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid utilization in differentiated rat brain astrocytes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids* 67(2-3), 99-104.
- Wohl, C.A., Weiss, S. 1998. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J Neurobiol* 37(2), 281-90.
- Wolf, G. 2006. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutr Rev* 64(12), 532-8.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F. 2004. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21(10), 1457-67.
- Wu, G., Fang, Y., Lu, Z.H., Ledeen, R.W. 1998. Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells. *J Neurocytol* 27(1), 1-14.
- Wu, H., Ichikawa, S., Tani, C., Zhu, B., Tada, M., Shimoishi, Y., Murata, Y., Nakamura, Y. 2009. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta* 1791(1), 8-16.
- Wu, S.C., Zhang, Y. 2009. Minireview: role of protein methylation and demethylation in nuclear hormone signaling. *Mol Endocrinol* 23(9), 1323-34.

X

- Xiao, Y., Huang, Y., Chen, Z.Y. 2005. Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr* 94(4), 544-50.
- Xing, G., Zhang, L., Zhang, L., Heynen, T., Yoshikawa, T., Smith, M., Weiss, S., Detera-Wadleigh, S. 1995. Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3), 1015-25.

Y

- Yamagata, T., Momoi, T., Kumagai, H., Yanagisawa, M., Momoi, M. 1993. Distribution of retinoic acid receptor β in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed Res* 14, 183-90.
- Yamamoto, S. 1992. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1128(2-3), 117-31.
- Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Ross, A.C. 2000. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *Faseb J* 14(13), 2119-27.
- Yan, Q., Rosenfeld, R.D., Matheson, C.R., Hawkins, N., Lopez, O.T., Bennett, L., Welcher, A.A. 1997. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78(2), 431-48.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., Mostofsky, D.I. 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 23(5), 843-53.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., Mostofsky, D.I. 1996. Essential fatty acids preparation (SR-3) improves Alzheimer's patients quality of life. *Int J Neurosci* 87(3-4), 141-9.

Z

- Zelcer, N., Tontonoz, P. 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 116(3), 607-14.
- Zetterstrom, R.H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., Olson, L. 1999. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11(2), 407-16.
- Zetterstrom, R.H., Simon, A., Giacobini, M.M., Eriksson, U., Olson, L. 1994. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62(3), 899-918.
- Zhang, X.B., Zeng, Y.S., Zhang, W., Chen, Y.Y., Zhang, W., Xiong, Y., Chen, S.J. 2006. Synergistic effect of schwann cells and retinoic acid on differentiation and synaptogenesis of hippocampal neural stem cells in vitro. *Biomed Environ Sci* 19(3), 219-24.
- Zhang, Y., Appelkvist, E.L., Kristensson, K., Dallner, G. 1996. The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiol Aging* 17(6), 869-75.

- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., Gage, F.H. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26(1), 3-11.
- Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson, C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., Janson, A.M. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13), 7925-30.
- Zhao, X., Rosenke, R., Kronemann, D., Brim, B., Das, S.R., Dunah, A.W., Magnusson, K.R. 2009. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience* 162(4), 933-45.
- Zimmer, L., Delion-Vancassel, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J.-C., Chalon, S. 2000. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 41, 32-40.
- Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S., Breton, P., Delamanche, S.G., D., Durand, G., Chalon, S. 2002. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n 3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 75, 662-7.
- Ziouzenkova, O., Plutzky, J. 2008. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 582(1), 32-8.

