



**HAL**  
open science

## Effet d'un régime maternel enrichi en alkylglycérols sur le développement des petits chez un modèle rat.

Rozenn Le Foll

► **To cite this version:**

Rozenn Le Foll. Effet d'un régime maternel enrichi en alkylglycérols sur le développement des petits chez un modèle rat.. Alimentation et Nutrition. 2020. hal-02911666

**HAL Id: hal-02911666**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02911666>**

Submitted on 4 Aug 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

# MASTER NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS

Rapport de stage M2

**LE FOLL Rozenn**

*Effet d'un régime maternel enrichi en alkylglycérols  
sur le développement des petits chez un modèle rat.*

**2019-2020**

Responsable de Stage : Frédérique PEDRONO

Laboratoire STLO UMR INRAE 1253 - Agrocampus Ouest Rennes,

au sein de l'équipe « Bioactivité & Nutrition »



## REMERCIEMENT

*Je tiens tout d'abord à remercier M. LE LOIR Yves, directeur de l'UMR STLO, de m'avoir accueillie durant 6 mois de stage au sein de son laboratoire.*

*Je remercie également M. DUPONT Didier, responsable de l'équipe Bioactivité & Nutrition, de m'avoir intégrée dans son équipe durant ce stage.*

*Je remercie plus particulièrement Mme PEDRONO Frédérique, maître de conférences en biochimie et mon maître de stage, de m'avoir confié ce projet. Je la remercie pour son investissement, ses conseils et sa disponibilité tout au long de ce stage.*

*Je remercie Mme BOULIER-MONTHEAN Nathalie, Technicienne, de m'avoir accompagnée au sein de ce projet.*

*Je tiens également à remercier M. OSSEMOND Jordane, Ingénieur d'étude, pour ces conseils et sa disponibilité durant mon stage.*

*Pour finir, je tiens à témoigner ma reconnaissance envers tous les membres du laboratoire STLO pour l'accueil et l'intégration qu'ils m'ont réservée tout au long de mon stage.*

## TABLE DES MATIÈRES

<b>I- INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1. Fonctions connues des étherlipides sur l'organisme .....	1
2. Métabolisme des étherlipides .....	2
a. Anabolisme .....	2
b. Catabolisme .....	3
c. Cas particulier dans les glandes mammaires .....	4
3. Mécanisme d'absorption et de digestion des étherlipides .....	4
4. Sources étherlipidiques : cas particulier du lait maternel .....	5
5. Les objectifs du stage .....	5
<b>II- MATÉRIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>6</b>
1. Animaux et conditions d'élevage .....	6
2. Régime et supplémentation alimentaire .....	6
3. Extraction des lipides .....	7
4. Analyse du profil des acides gras et des diméthylacétals .....	7
5. Analyse du profil des alkylglycérols .....	8
6. Expressions géniques des enzymes d'intérêts .....	9
a. Extraction des ARN totaux .....	9
b. Rétrotranscription de l'ARN en ADNc .....	9
c. Quantification par PCR .....	9
7. Dosage lipidique .....	10
8. Analyses statistiques .....	10

<b>III- RÉSULTATS .....</b>	<b>10</b>
1. Prise de poids et consommation alimentaire des animaux .....	10
2. Profil des acides gras chez les rates allaitantes .....	12
3. Profil des diméthylacétals chez les rates allaitantes .....	13
4. Profil des alkylglycérols .....	14
a. Mise au point de l'extraction .....	14
b. Analyse chez les rates allaitantes .....	15
5. Expressions géniques .....	16
a. Gènes impliqués dans le métabolisme acide gras chez les rates allaitantes .....	16
b. Conception des amorces .....	16
<b>IV- DISCUSSION .....</b>	<b>18</b>
<b>V- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>22</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

Figure 1 : Formule chimique du diacylphospholipide par comparaison aux étherlipides.

Figure 2 : Synthèse des étherlipides.

Figure 3 : Dégradation des étherlipides.

Figure 4 : Principale voie de sécrétion des lipides synthétisés par la cellule épithéliale mammaire.

Figure 5 : Design expérimental de l'expérience *in vivo*.

Figure 6 : Réaction de saponification et de méthylation des triglycérides en esters méthyliques d'acide gras.

Figure 7 : Principe de quantification des acides gras.

Figure 8 : Réaction d'hydrolyse acide des plasmalogènes et de dérivation en diméthylacétals.

Figure 9 : Réaction d'acétylyse et d'hydrogénolyse d'un étherlipide neutre.

Figure 10 : Dérivation des alkylglycérols.

Figure 11 : Effets du régime alimentaire standard et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administrés pendant 3 semaines, sur la consommation de croquettes des rates durant la période de lactation.

Figure 12 : Effets du régime alimentaire standard et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administrés pendant 3 semaines, sur la masse corporelle des rates et de leurs petits durant la période de lactation.

Figure 13 : Effets du régime alimentaire standard et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administré pendant 3 semaines, sur la masse de divers organes des rates allaitantes et de leurs petits.

Figure 14 : Teneur en acides gras dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Figure 15 : Composition en aldéhydes gras des lipides totaux du foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Figure 16 : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'issue d'une acétylyse.

Figure 17 : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'issue d'une hydrogénolyse.

Figure 18 : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'issue d'une acétylation.

Figure 19 : Chromatogramme de l'alkylglycérol diacétylé issu de 1-O-alkylglycérol purifié de l'huile de foie de requin.

Figure 20 : Expressions géniques des désaturases dans le foie, estimées par qPCR chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Figure 21 : Chromosome 1 du génome du *Rattus norvegicus*.

Figure 22 : Alignement de séquence nucléotidique des gènes *scd1* et *scd2* chez *Rattus norvegicus*.

Figure 23 : Exemple de couples d'amorces sélectionnées dans la région 3' non codante du gène *scd1*.

Figure 24 : Alignement de séquence nucléotidique des gènes *scd1* et *scd2* chez *Rattus norvegicus* avec le couple d'amorces spécifiques choisi dans la région 3' non codante.

Figure 25 : Modèle graphique de qPCR avec le réactif SYBER Green.

## TABLEAUX

Tableau 1 : Amorces qPCR.

Tableau 2 : Procédure du protocole de qPCR (annexe).

Tableau 3 : Composition en acides gras des lipides totaux du foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Tableau 4 : Teneur en diméthylacétals (DMA) dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Tableau 5 : Exemple de ratio des acides gras produit sur précurseur, estimant les expressions des élongases (*Elovl2*, *Elovl5* et *Elovl6*) dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AG** : acide gras

**AGMI** : acide gras monoinsaturé

**AGPI** : acide gras polyinsaturé

**AGS** : acide gras saturé

**Alkyl-Gro** : alkylglycérols

**ARA** : acide arachidonique

**CCM** : chromatographie sur couche mince

**Ct** : cycle seuil (Cycle threshold)

**DHAP** : dihydroxyacétone phosphate

**DHA** : acide docosahexaénoïque

**DMA** : diméthylacétals

**EMAG** : ester méthylique d'acides gras

**FADS** : fatty acid desaturase

**FAR** : fatty acyl-CoA reductase

**GC** : chromatographie en phase gazeuse

**GC-FID** : chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

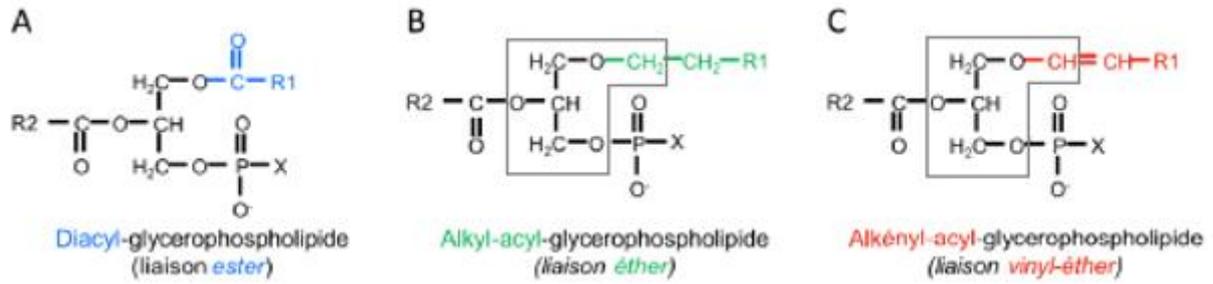
**GC-MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**J** : Jours

**PAF** : Platelet-Activating Factor

**qPCR** : quantitative polymerisation chain reaction

**SEM** : erreur standard à la moyenne



**Figure 1** : Formule chimique du diacylphospholipide (A), par comparaison aux étherlipides (B et C), dont le cas particulier des plasmalogènes (C). Encadré gris : structure de l'alkylglycérol. R : chaîne carbonée avec plus ou moins d'insaturations. X : groupement polaire, éthanolamine, choline, inositol ou sérine.

## I - INTRODUCTION

Le début de la vie est une période de développement intense chez le nouveau-né. Durant cette période, la croissance rapide du nourrisson nécessite des apports énergétiques très élevés (environ 100 kcal/kg/J). Ainsi, le lait maternel est l'aliment le mieux adapté pour couvrir les besoins nutritionnels du nourrisson afin de lui assurer un développement optimal (ANSES, 2013). Le lait humain est composé principalement de glucides (en moyennes 75g/L), lipides (en moyennes 35g/L) et protéines (en moyennes 8g/L). Sa composition est complexe, varie au cours de la période de lactation et est aujourd'hui encore à l'étude. Parmi les nutriments minoritaires, on retrouve les étherlipides (Hallgren et al, 1974). Ces molécules sont ubiquitaires chez l'Homme et les mammifères, cependant elles sont peu connues, principalement pour des raisons analytiques. Pourtant, malgré leur concentration infinitésimale les étherlipides auraient des effets très importants dans l'organisme (Dean et al, 2018). Chez le nourrisson par exemple, ils participent à la mise en place de la couverture immunitaire lors de l'allaitement maternel (Oh et al, 1994). Cet apport nutritionnel favorise ainsi les bébés allaités, par comparaison à ceux nourris au lait infantile qui lui, est dépourvu d'étherlipides.

À l'origine, les étherlipides ont été découverts en grande quantité dans l'huile de poisson marin (Snyder, 1999). Ils sont caractérisés par la liaison éther entre un alcool gras et le squelette glycérol des lipides. Les alkylglycérols (Alkyl-Gro) correspondent eux à la structure minimale de base de cette famille étherlipidique. Dans cette étude, nous allons principalement nous concentrer sur ceux dont la liaison éther est positionnée en *sn*-1, par opposition à une liaison ester classiquement trouvée dans les lipides, et notamment les phospholipides [Figure 1 A et B] (Dean et al, 2018). Parmi les étherlipides les plus connus, nous étudierons également les plasmalogènes qui se différencient par la présence d'un aldéhyde gras en *sn*-1 [Figure 1 C].

### 1. Fonctions connues des étherlipides sur l'organisme

L'huile de foie de requin riche en Alkyl-Gro était utilisée comme remède ancestral chez les pêcheurs de la côte ouest de la Norvège et de la Suède, pour le traitement des cancers et autres infections, en raison de la rareté des tumeurs chez les requins et de leur capacité à résister aux infections. Ainsi, compte tenu de l'important potentiel des étherlipides pour la santé, des recherches ont été menées au cours de ces dernières décennies démontrant des effets bénéfiques selon les molécules d'étherlipides étudiées. En effet, les étherlipides possèdent des propriétés biologiques multifonctionnelles (Deniau et al, 2010). Les différentes études sur les étherlipides concernent les Alkyl-Gro purs ou parfois l'huile de requin (Alkyl-Gro diacylés) car il est dur et cher d'obtenir des molécules pures pour les expériences. La première utilisation clinique des Alkyl-Gro visait à traiter les leucémies et, plus tard, à prévenir les effets secondaires engendrés par l'irradiation dans le traitement de certains cancers (Brohult et al, 1954). Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués, d'autres travaux ont mis en évidence qu'un traitement par voie orale d'Alkyl-Gro diminue la croissance, la vascularisation et la dissémination de tumeurs sur un modèle murin de carcinome du poumon de Lewis (Pédrono et al, 2004). Ces activités anti-tumorales seraient en partie liées à l'effet anti-angiogénique, par l'inhibition de la voie d'activation du bFGF (important stimulateur de l'angiogénèse) (Pédrono et al, 2007).



De plus, les Alkyl-Gro stimulent l'hématopoïèse (Linman et al, 1958) et ont également une action immunostimulante. En effet, une étude clinique a été réalisée sur 13 hommes en bonne santé qui ont reçu pendant 4 semaines un traitement à base d'huile de foie de requin (15g/J) (Lewkowicz et al, 2005). À l'issue de ce traitement, il a été observé une amélioration du profil des cytokines (IFN-gamma de type I, TNF-alpha et interleukine-2) et du statut antioxydant du sérum des volontaires comparativement au groupe Contrôle.

Enfin, les Alkyl-Gro ont un impact sur les fonctions reproductives. L'administration d'huile de foie de requin riche en Alkyl-Gro par voie orale (40 g/jour pendant 28 jours) a entraîné une amélioration de la mobilité et de la vitesse des spermatozoïdes chez le porc (Mitre et al, 2004). Ce traitement a également montré un meilleur taux de fertilisation dans les élevages (Cheminade et al, 2002).

Une des hypothèses pouvant expliquer ces multiples activités biologiques des Alkyl-Gro serait leur capacité à être incorporé dans les phospholipides de la membrane cellulaire où ils engendreraient des modifications des propriétés physiques telle que la fluidité de la membrane (Dean et al 2018). Une autre explication plus métabolique serait la modification des voies de signalisation cellulaire par la formation de seconds messagers et médiateurs lipidiques dérivés des étherlipides incorporés (Marigny et al, 2002 et Pédrone et al, 2007).

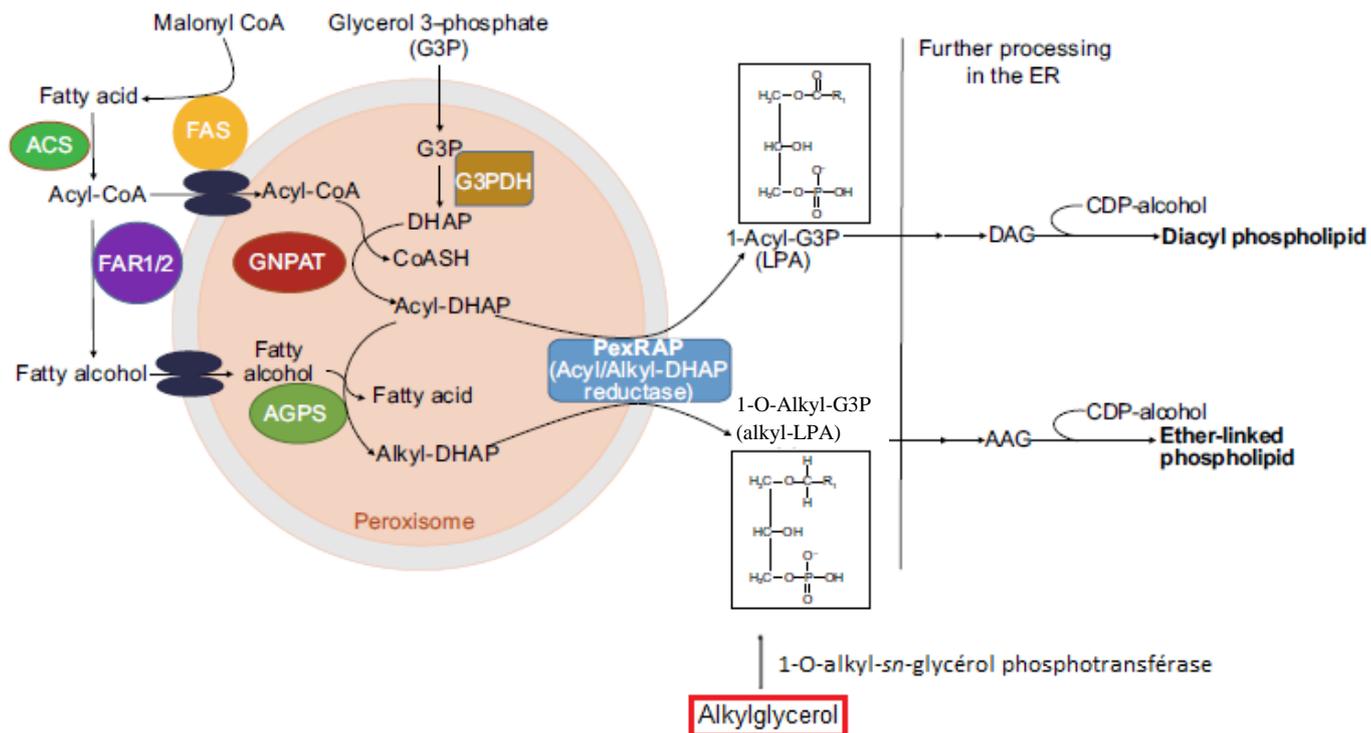
Concernant la flore intestinale, les Alkyl-Gro sont décrits comme protecteurs contre la toxine Shiga produite par E. coli (Bergan et al, 2014). Cependant, aucune étude sur la flore intestinale n'a pour lors été renseignée, ni même sur les activités digestives. Par ailleurs, il a été démontré que les substances immunostimulantes, riches en alkylglycérols, augmentaient la prolifération des bactéries lactiques (*Lactobacille acidophilus*) (Brohult et al, 1960). Ainsi, il est suggéré que les Alkyl-Gro ont un effet bénéfique sur l'intestin en favorisant la croissance des bactéries lactiques, qui elles-mêmes amélioreraient la digestion et stimuleraient la réponse humorale (Chorostowska-Wynimko et al, 2001).

Par ailleurs, si l'on s'intéresse aux dérivés générés par les Alkyl-Gro, comme les plasmalogènes, ce sont des phospholipides porteurs d'acide arachidonique (ARA) et surtout d'acide docosahexaénoïque (DHA) (Farooqui et al, 2000). Ils représentent une grande part des structures membranaires des tissus neuronaux (Braverman et al, 2012) et participent à l'amélioration des fonctions visuelles (Saab et al, 2014). De plus, il a été démontré à la suite d'une administration orale de plasmalogènes chez des souris adultes, une amélioration des fonctions cognitives (Houssain et al, 2018). Si cette perspective est très prometteuse, l'administration par voie orale demeure compliquée en raison des sources d'approvisionnement en plasmalogènes. C'est pourquoi le sujet de ce rapport concerne le précurseur métabolique des étherlipides, qui peut être purifié à partir de l'huile de foie de requin, davantage accessible.

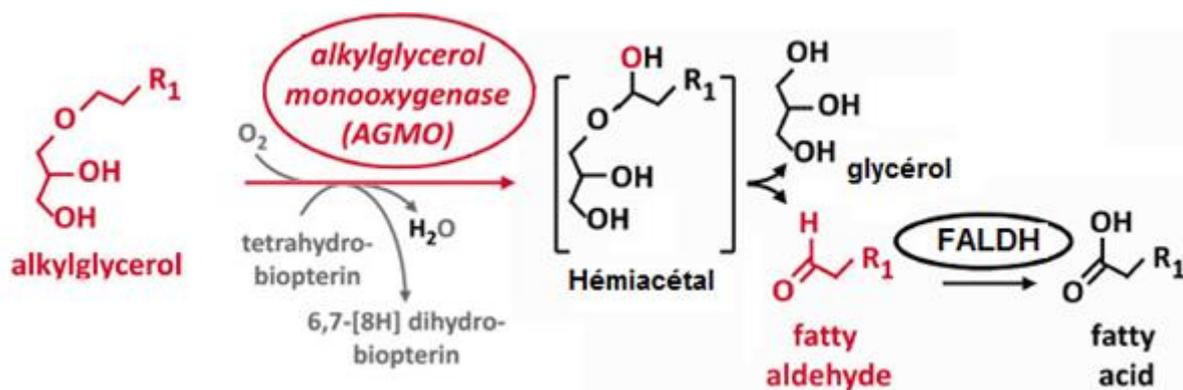
## **2. Métabolisme des étherlipides**

### **a. Anabolisme**

Les étherlipides sont synthétisés en deux grandes étapes. La première phase de synthèse se déroule dans le peroxyosome (Dean et al, 2018) [Figure 2]. Elle permet la synthèse d'1-O-alkyl-DHAP (dihydroxyacétone-phosphate) à partir d'acyl-CoA et de substrat DHAP issu de la glycolyse.



**Figure 2 : Synthèse des étherlipides.** dihydroxyacétone phosphate (DHAP), glycerol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), fatty acid synthase (FAS), acyl-CoA synthetase (ACS), glyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT), fatty acyl-CoA reductase (FAR1 or FAR2), alkylglycerone phosphate synthase (AGPS)), lysophosphatidic acid (LPA), diacylglycerol (DAG), alkyl-acylglycerol (AAG), cytidine diphosphate (CDP), réticulum endoplasmique (ER) ©Dean et al, 2018.



**Figure 3 : Dégradation des étherlipides.** FALDH : fatty aldehyde déshydrogénase. R1 : chaîne carbonée avec plus ou moins d'insaturations. ©Watschinger et al, 2013.

Cette première phase se déroule en deux réactions et fait intervenir à la fois des acides gras sous forme activée d'acyl-CoA et des alcools gras. Pour cela, le DHAP est estérifié en 1-acyl-DHAP par la DHAP-acyltransférase (GNPAT). Par la suite, la chaîne acyle du 1-acyl-DHAP est remplacée par une chaîne alkyle (ce qui conduit à la formation de la liaison éther en position *sn*-1) par l'alkyl DHAP-synthase (AGPS) pour générer le 1-O-alkyl-DHAP. L'enzyme FAR représente ici une enzyme clef de ce métabolisme puisqu'elle permet de générer le fragment alkyle en réduisant un acyl-CoA en alcool gras, celui-ci étant le substrat pour la formation de la liaison éther de 1-O-alkyl-DHAP.

La seconde phase de synthèse a lieu dans le cytosol et le réticulum endoplasmique [Figure 2]. L'1-O-alkyl-DHAP est ensuite réduit par l'alkyl-DHAP réductase en 1-O-alkyl-*sn*-glycérophosphate, phospholipide qui est ensuite décliné en étherphospholipides plus complexes. C'est à partir de cette étape que peut s'intégrer l'alkylglycérol d'origine alimentaire. En effet, l'1-O-alkyl-*sn*-glycérol phosphotransférase phosphoryle en *sn*-3 du glycérol formant ainsi l'acide 1-O-alkyl-*sn*-glycéro-3-phosphate autrement appelé acide 1-O-alkyl-lysophosphatidique (alkyl-LPA) [Figure 2]. Les étapes enzymatiques qui suivent dans le réticulum endoplasmique aboutissent à la synthèse de phospholipides matures (phosphatidyl-choline, et -éthanolamine pour les majoritaires) via la conversion de l'alkyl-LPA en alkyl-acylglycérol et l'ajout d'un groupe de cytidine diphosphate-alcool (comme CDP-choline ou CDP-éthanolamine) en position *sn*-3.

Dans le cas particulier des plasmalogènes, la dernière étape est catalysée par la plamanyléthanolamine désaturase qui introduit une double liaison en  $\Delta 1'$  de l'alcool gras situé en *sn*-1 du glycérol (Saab et al, 2014). Les plasmalogènes sont les principaux constituants de la fraction glycérophosphoéthanolamine du cœur humain, du cerveau, des spermatozoïdes de mammifères, ainsi que des cellules inflammatoires. Ils représentent aussi les étherlipides les plus connus aujourd'hui. Pour cette raison, leur analyse sera intégrée à ce projet.

De plus, un mécanisme de rétro-régulation est mis en place à la suite de la synthèse des étherlipides via la rétroaction négative de FAR, enzyme indispensable pour fournir les alcools gras utilisés dans la formation de l'alkyl-DHAP. En effet, les niveaux cellulaires de plasmalogènes conditionnent la régulation de synthèse d'alcools gras, de fortes concentrations augmentant la dégradation de la protéine FAR, inhibant ainsi son activité (Honsho et al, 2010).

## **b. Catabolisme**

La dégradation des étherlipides est complexe et nécessite l'action de diverses enzymes (Watschinger and al, 2013). Les voies de remaniement vont dans un premier temps permettre de simplifier la structure jusqu'à obtenir l'alkylglycérol via l'action successive de phospholipases. Ensuite, l'alkyl-glycérol monooxygénase (AGMO) dépendante de la tétrahydrobioptérine, catalyse la dernière étape par clivage de la liaison éther en *sn*-1. Cela permet la libération du glycérol et de la chaîne alkyle sous forme d'aldéhyde gras [Figure 3]. Puis, les aldéhydes gras produits peuvent être oxydés en acides gras par l'aldéhyde gras déshydrogénase (FALDH) tandis que le glycérol, les groupements polaires et les acides gras réintègrent d'autres synthèses (Rizzo et al, 2000).



### c. Cas particulier dans les glandes mammaires

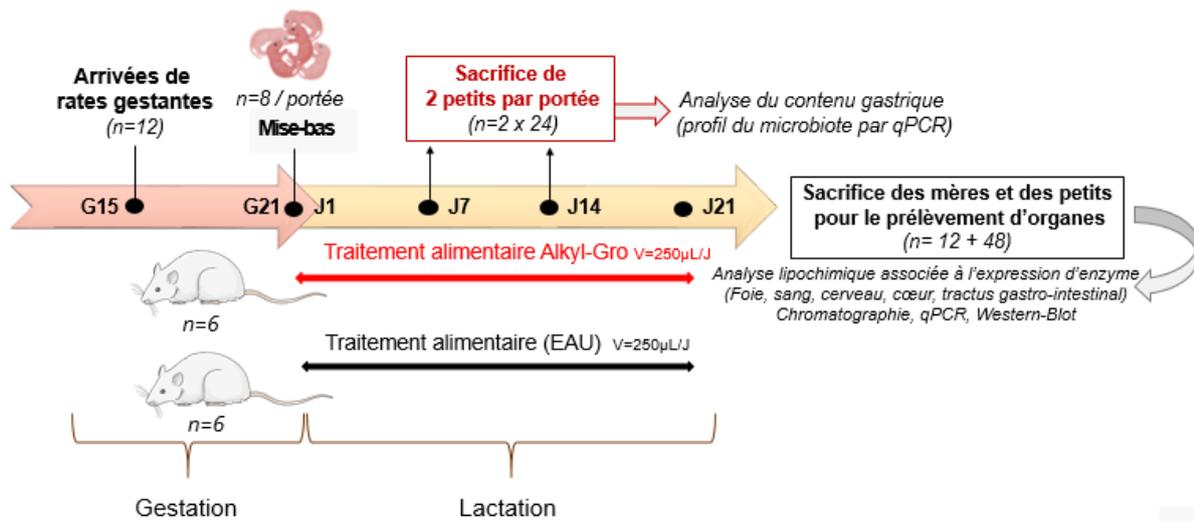
Les étherlipides sont synthétisés de manière ubiquitaire, mais la quantité ainsi que la nature biochimique des espèces produites sera fonction du tissu d'origine et des besoins physiologiques. Dans le cas particulier de la glande mammaire, les voies métaboliques ainsi que la structure précise des molécules étherlipidiques synthétisées restent incertaines. En revanche, leur présence dans le lait suivrait la voie classique de sécrétion des lipides (Heid et al, 2005).

Les lipides de réserve (triglycérides) s'agrègent en petites gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Celles-ci fusionnent entre elles puis se déplacent sous la forme d'une gouttelette plus volumineuse vers la partie apicale de la cellule [Figure 4A]. Lors de leur passage dans la lumière des alvéoles, les gouttelettes lipidiques s'entourent d'une structure membranaire provenant de la membrane cellulaire : les globules lipidiques ainsi formés dits globules gras sont libérés dans la lumière des alvéoles (acinus). Ce processus de sécrétion est appelé apocrine. Les globules gras sont constitués d'un cœur de triglycérides entourés par une membrane singulière, la MFGM (Milk Fat Globule Membrane) constituée de trois niveaux de structure [Figure 4B]. Une première couche interne issue du réticulum endoplasmique et composée de lipides polaires et de protéines entoure le corps gras du globule. Elle est entourée d'une seconde bicouche membranaire originaire de la membrane plasmique et constituée de phospholipides et sphingolipides, de cholestérols et de divers types de protéines membranaires (Heid et al, 2005). Ainsi, ces globules gras présents dans la lumière des alvéoles contiennent des étherlipides qui pourront être transmis au nourrisson lors de l'allaitement.

### 3. Mécanisme d'absorption et de digestion des étherlipides

Les études d'absorption et de digestion des étherlipides issus de l'alimentation sont anciennes et peu nombreuses. Les quelques travaux réalisés sur modèle rongeur démontrent qu'après une ingestion orale d'étherlipides (sous forme 1-O-alkyl-*sn*-glycérols), environ 95 % des étherlipides sont absorbés dans l'intestin, et 5 % sont excrétés dans les selles (Bergstrom et Blomstrand, 1956). Dans le tractus gastro-intestinal, au niveau de la muqueuse intestinale, une grande partie des étherlipides ingérés serait clivée au niveau de la liaison *sn*-1, donnant lieu à des acides gras (Blomstrand, 1959). Le reste des étherlipides non clivés rejoint le système lymphatique afin d'être transporté vers différents organes et tissus tels que le foie. Dans le foie, les alkylglycérols jouent le rôle de précurseur direct dans la voie de biosynthèse des étherphospholipides (dont plasmalogènes) (Weber, 1985). Cependant, peu de choses sont connues concernant le transport et la conversion des étherlipides exogènes dans les différents tissus autres que l'intestin.

Concernant le cas de l'Homme, des résultats similaires ont été obtenus sur l'absorption des étherlipides exogènes (Blomstrand & Ahrens, 1959). Il a également été démontré que les étherlipides exogènes sont bien absorbés par des rates allaitantes et transférés à leurs petits (Oh & Jadhav, 1994). En revanche, le cas des nourrissons humains n'est pas renseigné dans la littérature, mais des données toxicologiques issues d'une étude subchronique démontre l'innocuité des étherlipides (Anadón et al, 2010).



**Figure 5 :** Design expérimental de l'expérience *in vivo*. n : nombre, g: gestation, j: jours.

#### **4. Sources étherlipidiques : cas particulier du lait maternel**

Comme il a été mentionné précédemment, l'huile de foie de requin est l'une des principales sources d'étherlipides, mais le lait maternel en contient également de façon non-négligeable (Hallgren et al, 1974). Pourtant, de nombreuses études se sont portées sur les effets des étherlipides présents dans l'huile de foie de requin sur l'organisme, mais très peu se sont intéressées à l'analyse du lait. Ainsi, les effets des étherlipides présents dans le lait et transmis à la progéniture via l'allaitement ont été très peu étudiés au cours de ces dernières années.

Une étude a été réalisée sur les truies supplémentées en huile de foie de requin, au cours de la période de gestation et de lactation (Mitre et al, 2005). Elle a permis de démontrer un effet positif sur le statut immunitaire des petits associés à une modification à la fois du contenu lipidique et des propriétés immunitaires du lait maternel (augmentation du taux d'érythrocytes, d'hémoglobine, d'immunoglobuline G, de leucocytes) mais sans que l'analyse biochimique n'ait déterminé plus spécifiquement les espèces moléculaires étherlipidiques.

Récemment, Yu et al (2019) ont pu observer sur un modèle souris que les étherlipides sont des nutriments lipidiques spécifiques du lait maternel essentiels au développement du tissu adipeux chez les nourrissons. En effet, les Alkyl-Gro via l'action des macrophages, maintiennent le tissu adipeux beige (BeAT) chez le nourrisson et empêchent la transformation de BeAT en tissu adipeux blanc, site de stockage des lipides.

De plus, il a été observé que la composition du lait est clairement influencée par le régime alimentaire de la mère. Cela suggère que des modifications de la composition du lait pourraient jouer un rôle dans la croissance de la progéniture et la programmation métabolique (Martin-Agnoux et al, 2015).

Ainsi, la supplémentation en Alkyl-Gro chez la mère pourrait être intéressante pour optimiser le régime alimentaire pendant la période de lactation et améliorer l'état de santé des petits. En effet, la supplémentation en Alkyl-Gro d'une mère allaitante, pourrait-elle influencer le développement des petits ? Nous faisons l'hypothèse d'un enrichissement du lait maternel en étherlipides chez les mères à la suite de l'administration d'Alkyl-Gro, accompagné d'un enrichissement tissulaire. De plus, cette supplémentation pourrait avoir un impact chez les petits allaités qui se traduirait par une augmentation de la teneur en étherlipides circulant dans le sang, favorisant la distribution tissulaire et l'imprégnation des tissus. Ainsi, un enrichissement cérébral en étherlipides est envisagé chez les petits allaités, notamment sous forme de plasmalogènes.

#### **5. Les objectifs du stage**

Ce projet est préliminaire à l'étude de micronutriments lipidiques d'origine laitière sur la santé, permettant la mise au point d'un modèle animal et d'outils expérimentaux. Il va permettre de développer l'approche lait maternel et fonctions digestives avec l'analyse de médiateurs lipidiques particuliers et étherlipidiques peu connus.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'impact d'un enrichissement du lait maternel en Alkyl-Gro, administré chez des rates au cours de la période de lactation, sur le développement de la progéniture. Ainsi, 12 rates vont être traitées par voie orale avec ou non de l'huile d'Alkyl-Gro, pendant la période de lactation. Des analyses lipochimiques du lait maternel et des tissus des mères et des petits permettra de déterminer l'enrichissement en étherlipides et d'appréhender les métabolismes impactés. La figure 5 résume le plan expérimental de l'étude.



## II - MATÉRIELS & MÉTHODES

### 1. Animaux et conditions d'élevage

Pour ce projet, l'ensemble des procédures exécutées est conforme aux directives de l'Union européenne pour le soin et l'utilisation des animaux (2010/63/CEE ; décret 2013-118 ; autorisation n° 21299-2019062114148913v4).

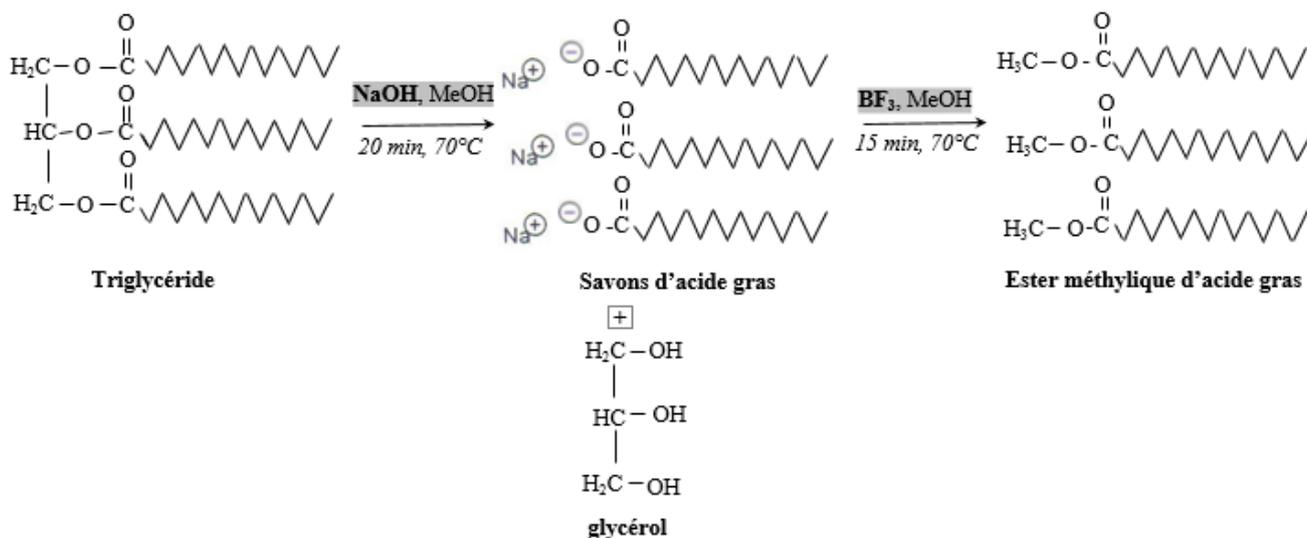
Pour réaliser ce projet, le modèle rat en période de lactation a été choisi en référence à d'autres expériences menées sur le métabolisme des lipides (Oh et al 1994 ; Martin-Agnoux et al, 2015). Ainsi, 12 femelles rats de la lignée Sprague-Dawley (Janvier Labs, Le Genet-Saint-Isle, France) gravides à 15 jours ont été utilisées. Les rates gestantes ont été placées dans des cages individuelles au sein de l'animalerie Arche Biosit (Animalerie Rennaise Centre d'Hébergement et d'Expérimentation, Campus Santé, Université de Rennes 1). Dès le lendemain de la parturition (J1), les portées ont été ajustées à 8 ratons par femelle de façon à harmoniser le nombre de petits par portée avec un sex-ratio aléatoire, les petits excédentaires ont été sacrifiés à la naissance.

À J7 et à J14, deux ratons par portée ont été sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (Euthasol® Vet à 140mg/kg). À J21, l'ensemble des animaux (soit 48 ratons et 12 femelles) a été sacrifié selon la même méthode, suivie d'une exsanguination par ponction intracardiaque et des prélèvements d'organes : le sang (plasma et globule rouge), le cerveau (organe cible), le foie (métabolisme général des lipides), l'estomac et l'intestin (axe cerveau-intestin) et le cœur (organe cible secondaire). Les organes prélevés ont ensuite été congelés et stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse. Compte-tenu du contexte, seuls les échantillons des mères ont été étudiés dans le cadre de ce stage.

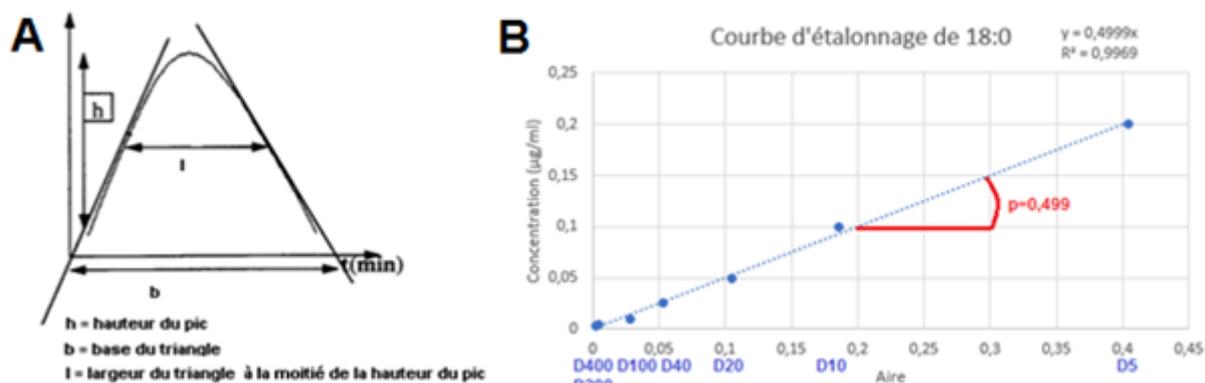
### 2. Régime et supplémentation alimentaire

Les animaux ont été nourris avec des croquettes standards pour rongeurs en période de gestation-lactation et avec accès à l'eau *ad libitum*. Concernant le profil en acides gras (AG), les croquettes étaient composées de 18:2n-6 (56,2%), 18:1n-9 (19,4 %), 16:0 (12,9%), 18:3n-3 (6,1%), 18:0 (2,9%), 18:1n-7 (1,8%) et des traces de 14:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 20:0, 20:1n-9 (<1%).

L'objectif de ce projet est d'enrichir le lait maternel en étherlipides, en administrant par voie orale le précurseur alkylglycérol aux mères. Ainsi, le traitement alimentaire a été enrichi en huile d'Alkyl-Gro, purifiés après saponification de 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérols contenus dans l'huile de foie de requin (Polaris, Quimper). L'huile d'Alkyl-Gro a été administrée chaque jour par gavage via une sonde à la dose de 1,2mg par g de poids corporel, ce qui correspond à environ 250µL par animal et par jour. Les mères ont été traitées par gavage quotidiennement dès le lendemain de la mise bas (J1) jusqu'au sevrage des petits (J21). Six rates allaitantes ont reçu l'huile d'Alkyl-Gro et six autres ont reçu de l'eau de boisson (ce choix est motivé d'un point de vue nutritionnel parce qu'il n'existe pas d'équivalence lipidique des Alkyl-Gro qui n'influerait pas sur le métabolisme des acides gras). Le traitement intragastrique s'est donc déroulé dans les mêmes conditions pour les deux lots de rates. L'apport alimentaire des mères a été surveillé par des pesées de la consommation de croquettes et le poids corporels a été déterminé par des pesées quotidiennement des mères et à J7, J14 et J21 pour les petits.



**Figure 6 : Réaction de saponification et de méthylation des triglycérides en esters méthyliques d'acide gras (EMAG).**



**Figure 7 : Principe de quantification des acides gras. A. Principe de calcul de l'aire d'un acide gras identifié ( $\text{cm}^3$ ). B. Courbe d'étalonnage de l'acide gras 18:0, permettant de définir le facteur de réponses (p), D : dilution à partir de la solution mère à  $1000\mu\text{g/ml}$ .**

### **3. Extraction des lipides**

Les lipides des tissus ont été extraits en utilisant la méthode de Folch (Folch et al, 1957). Pour cela, les tissus ont été broyés (ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke) avec un mélange chloroforme : méthanol (2:1, v/v), ajouté à du KCl (0,8%). La solution a ensuite été acidifiée avec du HCl (3 mol/L). Après avoir ôté la phase aqueuse, le mélange chloroforme : méthanol : KCl (0,8%) (3:48:47, v/v/v) a été ajouté. La solution a été vortexée puis centrifugée (5 min à 2000rpm). Pour finir, la phase aqueuse a été éliminée afin de récupérer la phase chloroformique contenant les lipides après filtration sur papier Watman phase separator IPS.

### **4. Analyse du profil des acides gras et des diméthylacétals**

Une fois extraits, les lipides ont été saponifiés afin de libérer les acides gras (0,5 mol/L NaOH méthanolique, 20 min, 70°C) [Figure 6]. Ils ont ensuite été dérivés en esters méthyliques d'acides gras (EMAG) (BF3 méthanolique 14%, 15 min, 70°C) puis les EMAG ont été extraits avec du pentane et repris avec de l'hexane pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

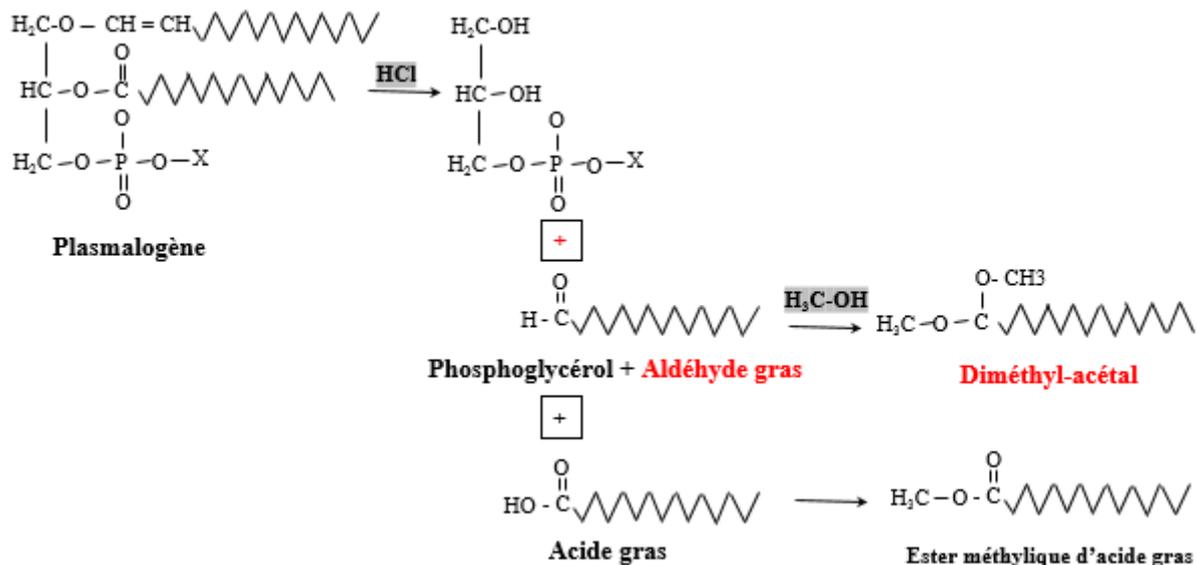
La GC-MS (Shimadzu QP 2010-SE) est composée d'un chromatographe (GC-2010 Plus) équipé d'une colonne BPX70 (120m×0,25mm; 0,25µm d'épaisseur, Agilent Technologies) et couplé à un spectromètre de masse (SE Single Quadrupole). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à une vitesse constante de 27,5cm/s. La température de l'injecteur était de 250°C. Le volume d'injection ainsi que le split ont été ajustés pour une meilleure résolution des pics. Le programme de température de la colonne a commencé par une période isotherme de 2 minutes à 50°C, puis s'est poursuivie par une première rampe de 22 minutes à raison de 20°C/min jusqu'à 175°C, et enfin une deuxième rampe de 37,25 minutes à 2°C/min jusqu'à 240°C.

Le spectromètre de masse fonctionnait sous ionisation électronique à 0,2kV et à une température de source de 200°C. Les analyses ont été effectuées en mode balayage sur la plage masse/charge (m/z) de 30 à 450 unités de masse atomique. Ainsi, les EMAG ont été séparés selon la longueur de chaîne, le nombre de doubles liaisons, la position de ces doubles liaisons sur la chaîne carbonée pour discriminer les isomères ainsi que la configuration de ces insaturations (*cis-trans*).

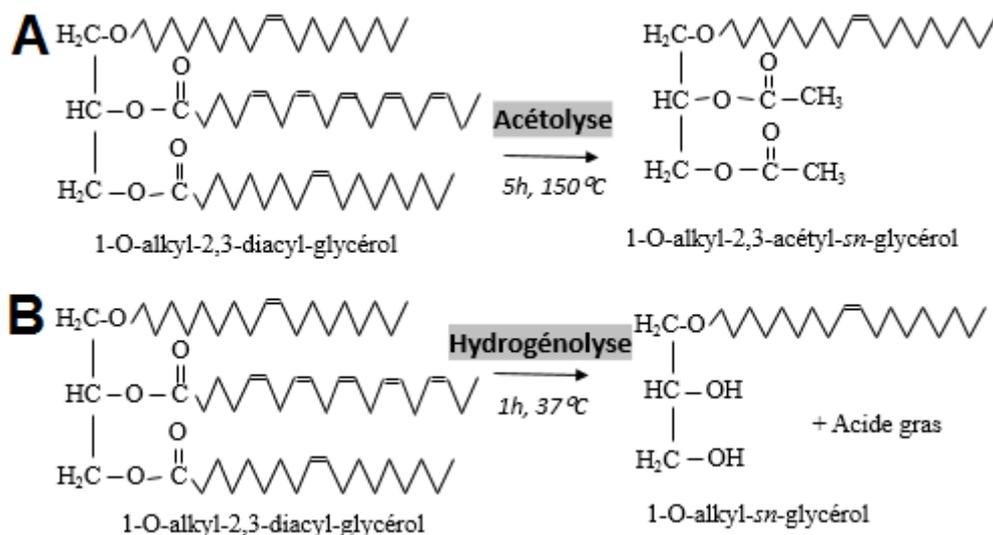
Le logiciel *GCMS solution* (Shimadzu) a été utilisé pour l'acquisition de données. Les composants ont été identifiés en fonction de leurs temps de rétention et de leurs ions de quantification en utilisant la bibliothèque spectrale de masse du National Institute of Standards and Technology (NIST) (version 2.01). Puis, les aires de chaque pic d'intérêt identifié ont été déterminées afin de calculer les concentrations des AG [Figure 7A]. Celles-ci ont été quantifiées en référence à l'ester méthylique hexanoïque (17:0) utilisé comme standard interne. Une courbe de calibration a également été réalisée en utilisant des EMAG standards couvrant toute la plage de concentrations et d'élution de nos pics d'intérêt. Cela permet d'obtenir le facteur de réponses (pentes) pour chaque AG [Figure 7B]. Ainsi, la quantification des AG (en µg) a été réalisée selon le calcul suivant :

$$[\text{AG}] = (\text{Aire AG} / \text{Aire AG 17:0}) * \text{facteur de réponses} * [\text{AG17:0}]$$

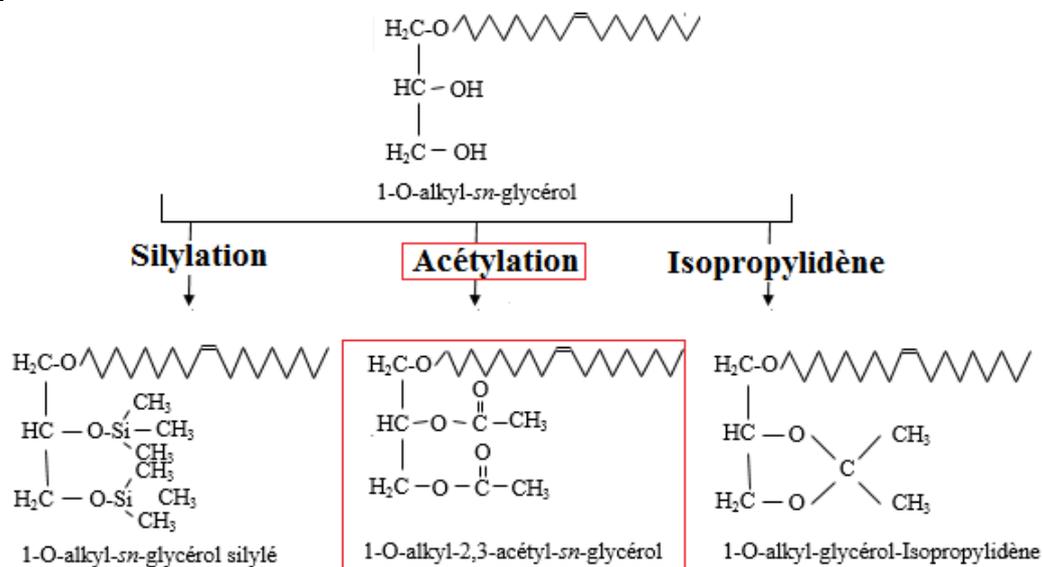
Enfin, les résultats ont été exprimés en pourcentage massique des AG totaux identifiés.



**Figure 8 :** Réaction d'hydrolyse acide des plasmalogènes et de dérivation en diméthylacétals. X : groupement polaire (éthanolamine, choline, inositol ou sérine), HCl : acide chlorhydrique, H<sub>3</sub>COH : Méthanol utilisé lors de la dérivation des acides gras en esters méthyliques d'acides gras. © inspiré de Oberg et al, 2012.



**Figure 9 :** Réaction d'acétolyse (A) et d'hydrogénolyse (B) d'un étherlipide neutre.



**Figure 10 :** Dérivation des alkylglycérols.

Les échantillons qui contiennent des plasmalogènes (globule rouge, cerveau et cœur, pour les plus riches) ont été analysés simultanément avec le profil d'acides gras. En effet, lors de la saponification-méthylation, les aldéhydes gras en *sn*-1 des plasmalogènes ont été dérivés en diméthylacétals (DMA) [Figure 8]. Le chromatogramme superpose ainsi les DMA avec les EMAG.

Les DMA ont été identifiés selon le même principe que les EMAG. Les concentrations en aldéhydes gras ont été calculées par étalonnage externe à l'aide des courbes de calibration de standards DMA (16:0, 18:0 et 18:1n-9) et en référence au standard interne des EMAG. Les espèces moléculaires de DMA (disponibles commercialement) sont en effet limitées et correspondent aux espèces rencontrées dans nos échantillons. Pour cette raison, nous avons utilisé l'ester méthylique heptanoïque (17:0) en étalon interne, avec une calibration externe avec les DMA. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique des DMA totaux identifiés.

## **5. Analyse du profil des alkylglycérols**

Cette méthode fait l'objet d'une mise au point et sera donc discutée dans les résultats. En effet, l'analyse des étherlipides était inexistante à mon arrivée en stage. Plusieurs essais ont ainsi été réalisés avant le choix de la méthode finale appliquée aux échantillons tissulaires.

La première méthode testée a consisté à réaliser une acétolyse, les étherlipides ont été traités avec un mélange anhydride acétique : acide acétique (3:2, v/v, 150°C pendant 5h) [Figure 9A]. Puis, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée en utilisant un mélange d'éluants constitué de chloroforme : méthanol (96:4, v/v). L'échantillon a migré sur une phase stationnaire composée de silice puis après migration, les molécules séparées ont été marquées au sulfate de cuivre (110°C pendant 10min). Il a été permis d'identifier les composés grâce au ratio frontal d'un étalon déposé en parallèle. Les différences de migration des espèces chimiques présentes dans l'échantillon sont liées à leur polarité avec le même système d'éluion (phase mobile) et la phase stationnaire. Plus un composé est lui-même polaire, plus il aura d'affinité pour la phase stationnaire et, par conséquent, plus il sera retenu sur la plaque.

La deuxième méthode a consisté à traiter les étherlipides avec du réactif de Vitride® (hydrure de sodium et aluminium, 37°C pendant 1h) de sorte à obtenir le squelette alkylglycérol sans AG ni autres molécules [Figure 9B]. La réaction a été stoppée avec l'ajout d'acide acétique (4%), puis l'1-O-alkylglycérol a été extrait avec du diéthyléther. Par la suite, l'échantillon a été purifié en réalisant une CCM en utilisant le même mélange d'éluants que précédemment. Puis, les molécules séparées ont été marquées à la primuline. La révélation sous UV a permis de prélever seulement la bande de silice contenant l'1-O-alkylglycérol, identifié grâce au ratio frontal d'un étalon déposé en parallèle. Pour terminer, les alkylglycérols purifiés ont été dérivés afin de devenir volatiles à haute température, permettant ainsi de les séparer par GC et identifier par espèce moléculaire. Plusieurs méthodes de dérivation existent : silylation, acétylation, isopropylidène [Figure 10]. L'acétylation sur les diols vicinaux des alkylglycérols a été privilégiée. Ainsi, les fonctions alcools ont été acétylées avec un mélange anhydride acétique : pyridine (5:1, v/v) selon deux barèmes de temps et de température : soit toute une nuit à température ambiante, soit à 100°C pendant 3h. Puis, les alkylglycérols diacétylés ont été extraits avec de l'hexane.

**Tableau 1 : Amorces qPCR.** Les amorces et la sonde ont été conçues pour la quantification des niveaux d'ARNm des gènes déterminés par PCR en temps réel.

	Gènes (Rôle)	Amorce Sens	Amorce Anti-sens	Sonde 5'-FAM/TAMRA-3'
Taqman® Métabolisme des AG	<i>Scd1</i> (désaturase AG) <i>Fads1</i> (désaturase AG) <i>Fads2</i> (désaturase AG) <i>Fads3</i> (désaturase AG) 18S (ARN ribosomique)	caaagagacgggaggaacgc agctttgaaccaccaagaataag tccacaaggaccccgacata tgctgtgggctgccagt cgcggtctattttgtggt	aaagtttagaccagcagta cagcaggatgtgcagcagatag ttgtaggcagatattcagcttct caccctgacagcaacgaaga agtcggcatcgtttatggtc	Ctggcctcctgctcatgtgcttca ttccgggagctgcgggcc ttggagagtggcagcccctcgagta ccccctctatggtgccactgggacac
SYBRGreen® Métabolisme des AG	<i>Elovl2</i> (élongase AG) <i>Elovl5</i> (élongase AG) <i>Elovl6</i> (élongase AG) <i>Scd2</i> (désaturase AG) FAS (synthèse AG de <i>novo</i> ) ACC (synthèse AG de <i>novo</i> ) 18S (ARN ribosomique)	gacactggttatcctgttctt taccaccatgccactatgct agcaaagcaccgaaactagg tgcacccccagacactttaa gatgtggaaccataactgga attgtgctcaaactgcaggt	Gctgcatggagtggcctt gacgtgatgaagctgtga gtacaggagcacagtgatggtg ggatgcatggaaacgata ctttctatcggcagtggtc gccaatccactegaagacca	
SYBRGreen® Métabolisme des étherlipides et des alcools gras	FAR1 (réductase) FAR 2 (réductase) AlkylDHAP-Synthase AGMO (dégradation)			

*Scd*: stearyl-CoA desaturase; *Fads*: fatty acid desaturase; *Elovl*: elongation of very-long-chain-fatty acids; *FAS*: fatty acid synthase; *ACC*: Acetyl-CoA carboxylase; *FAR*: fatty acyl-CoA reductase; *AGMO*: alkylglycérol monooxygenase. AG: acide gras.

Le profil des alkylglycérols diacétylés a été déterminé par GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID, Agilent GC 7890). Le chromatographe est équipé d'une colonne CPSil5CB (25m×0,25mm; 1,2 µm d'épaisseur, Agilent Technologies) spécifique pour l'analyse d'Alkyl-Gro. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (pression fixée à 120 kPa à une vitesse constante de 24 cm/s). Le programme de température de la colonne a commencé de 180 °C jusqu'à 250°C à raison de 2°C/min, puis a été maintenu à 250°C pendant 10 min. La température de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme était de 285°C.

Le logiciel *Agilent ChemStation* a été utilisé pour l'acquisition de données. L'identification des alkylglycérols était basée sur le temps de rétention à l'aide d'étalons externes synthétisés par Paul Mosset (Institut des Sciences Chimiques de Rennes). Elle a été vérifiée par une analyse ponctuelle sur le GC-MS de Shimadzu. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique des alkylglycérols totaux identifiés. Les concentrations ont été déterminées par étalonnage externe à l'aide des alcools chimylique (16:0-Alkyl-Gro), batylique (18:0-Alkyl-Gro) et sélachylique (18:1n-9-Alkyl-Gro).

## **6. Expressions géniques des enzymes d'intérêt**

Les enzymes impliquées dans le métabolisme des étherlipides, des alcools gras et des acides gras ont été étudiées au niveau de leur expression génique. Par ailleurs, une mise au point concernant la conception des amorces spécifiques des gènes d'intérêt a fait l'objet de ce rapport et sera donc discutée dans les résultats. En effet, le choix d'amorces lors d'une réaction de PCR quantitative (qPCR) est primordial pour quantifier l'expression des gènes.

### **a. Extraction des ARN totaux**

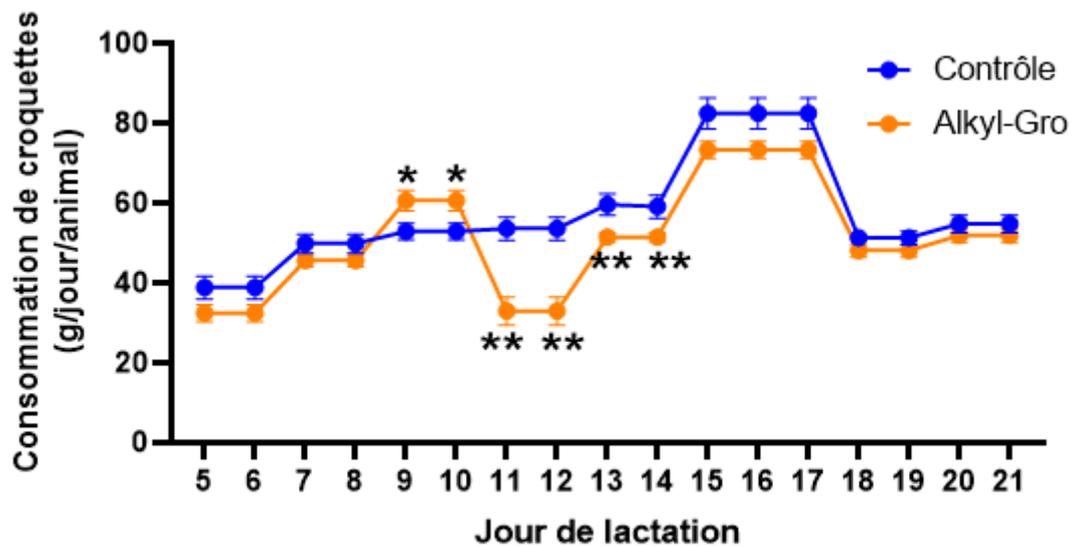
Dans un premier temps, les tissus prélevés ont été broyés dans 1 ml de réactif TRIzol™ (Invitrogen) avec des billes (0,5-0,75 mm) à l'aide d'un homogénéisateur tissulaire (5500 rpm, cycle de 15 secondes x3, Precellys® Evolution, Bertin Instruments). L'ARN total a été traité avec de la DNase I (Invitrogen) pour dégrader l'ADN génomique résiduel, puis purifié à l'aide du Purelink™ RNA Mini Kit (Invitrogen). La quantité et la qualité des échantillons d'ARN extrait ont été vérifiées par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm (NanoDrop, ThermoFisher).

### **b. Rétrotranscription de l'ARN en ADNc**

Par la suite, l'ARN total a été transcrit de manière inverse en utilisant le kit RT d'ADNc (SuperScript IV First-Strand Synthesis System, Invitrogen).

### **c. Quantification par PCR**

Les ADNc synthétisés ont été soumis à une réaction de PCR quantitative (qPCR), réalisée en utilisant des amorces spécifiques d'Eurogentec [Tableau 1] suivant 2 techniques : Taqman® (Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP, Eurogentec) et SYBRGreen® (qPCR SuperMix universel, Invitrogen). Ces techniques permettent de suivre en continu l'amplification de la molécule d'ADNc grâce à la détection et la quantification à partir : d'une sonde fluorogénique marquée par un colorant FAM™ spécifique du gène cible (Taqman®), ou de la fluorescence émise par le SYBRGreen® qui s'intercale dans l'ADN néoformé au cours de la PCR.



**Figure 11** : Effets du régime alimentaire standard (Contrôle) et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administrés pendant 3 semaines, sur la consommation de croquettes des rates durant la période de lactation. Les valeurs de consommation de croquettes sont exprimées en g/jour/animal et sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

La démarche concernant la conception des amorces spécifiques des gènes d'intérêt sera détaillée dans la partie résultat. Elle consiste à utiliser la plateforme en ligne « Primer Blast » qui propose le choix de diverses amorces selon la région d'amplification sélectionnée en utilisant le système « primer » et permet de vérifier simultanément la probabilité que les amorces se lient à des régions non-spécifiques du génome via l'algorithme BLAST. Pour chaque essai d'amplification, l'ADNc dilué a été ajouté au mix préparé. Les méthodes d'analyse utilisées sont résumées dans le tableau 2 (voir annexe).

Le logiciel *CFX Manager*<sup>TM</sup> (Bio-Rad) a permis d'acquérir les données. La quantité d'ADNc a été calculée à partir des seuils de cycle ( $\Delta Ct$ ) et normalisée avec le gène de ménage 18S ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{18S}$ ) à l'aide du kit de Contrôle d'ARN 18S Yakima-Yellow® Eclipse Dark Quencher® (Eurogentec). L'efficacité de l'amplification a été vérifiée en utilisant une courbe standard (gamme d'étalonnage) et en réalisant un triplicat des qPCR par animal. Les résultats sont présentés en unité arbitraire à partir de la méthode comparative  $2^{-\Delta Ct}$ .

## **7. Dosage lipidique**

Les triacylglycérols (TAG) et le cholestérol total ont été quantifiés en duplicat à partir de plasma et de foie à l'aide d'un kit Biomérieux (Craponne, France). Les foies ont été homogénéisés au préalable dans une solution saline tamponnée au phosphate, et la concentration en protéines a été déterminée par le test de Bradford (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) pour normaliser les résultats.

## **8. Analyses statistiques**

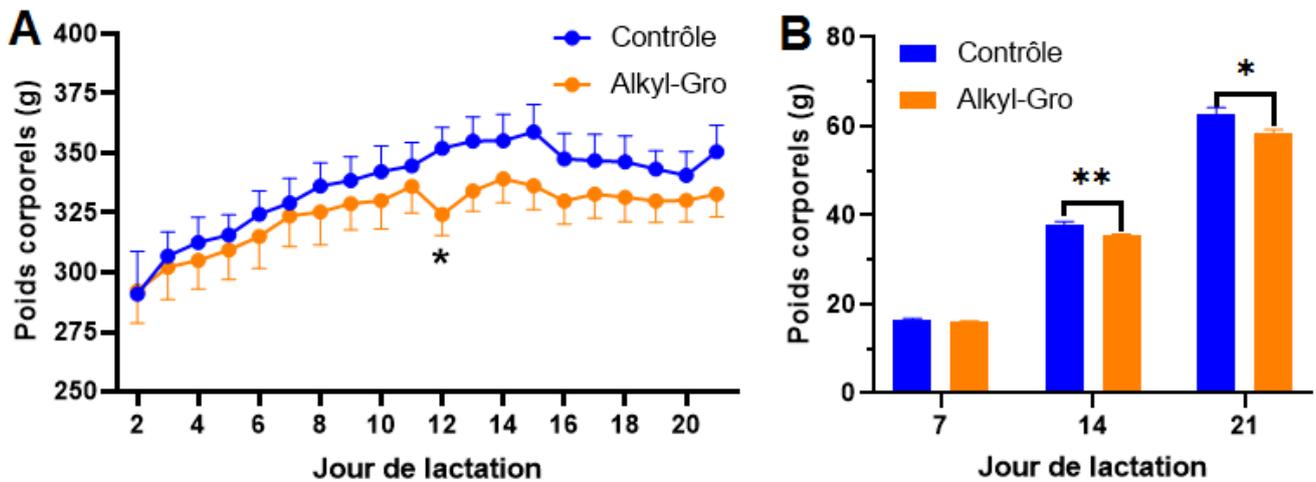
Les résultats présentés correspondent à des moyennes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM) obtenues à partir des 6 animaux par groupe. L'ensemble des résultats obtenus a été analysé à l'aide du logiciel de statistique R. Dans le cas d'une homogénéité de distribution et de variance des échantillons, le test *t* de Student a été appliqué pour déterminer la signification statistique entre les groupes, lorsque cela était indiqué. Le seuil de significativité a été fixé à *p*-value < 0,05 (marquée par un astérisque) et < 0,01 (marquée par deux astérisques). Concernant l'analyse de la composition en acides gras et en aldéhydes gras, le test non-paramétrique de kruskal-wallis a été réalisé suivi de comparaison planifiée par un test post-*hoc* de Dunn. Les graphiques ont été réalisés avec GraphPad Prism 5 (logiciel GraphPad, San Diego, États-Unis).

# **III - RESULTATS**

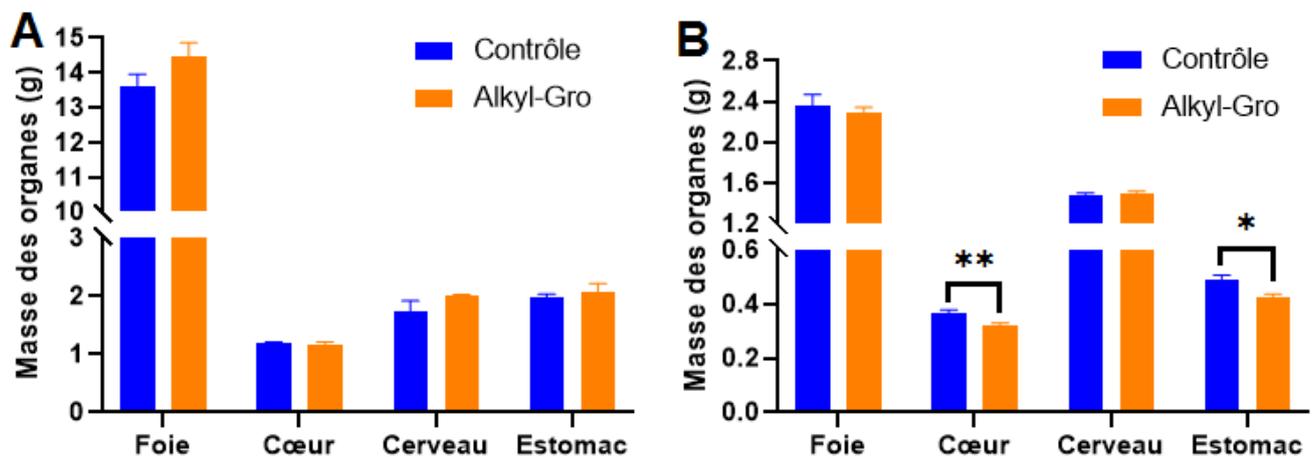
## **1. Prise de poids et consommation alimentaire des animaux**

Les rates en lactation ont reçu pendant 3 semaines un régime alimentaire standard et certaines ont reçu une supplémentation en alkylglycérols. L'effet du traitement alimentaire sur la consommation de croquettes des mères et sur la prise de poids des animaux (mères et petits) a été déterminé pour chaque groupe (Contrôle vs Alkyl-Gro) [Figure 11 et 12].

Globalement, la supplémentation en Alkyl-Gro diminue significativement la consommation alimentaire des rates en période de lactation [ANOVA, effet régime :  $F(1,109.4)=7.131$ ,  $p=0.0235$ ]. En effet, les rates traitées avec des Alkyl-Gro ont une consommation plus faible de 10.6% en moyenne à celles des rates Contrôles sur toute la durée de la lactation (en moyenne  $56.9g \pm 2.1$  pour les Contrôles et  $50.9g \pm 0.7$  pour les Alkyl-Gro) [Figure 11].



**Figure 12 :** Effets du régime alimentaire standard (Contrôle) et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administrés pendant 3 semaines, sur la masse corporelle des rates (A) et de leurs petits (B) durant la période de lactation. Les valeurs de poids corporels sont exprimées en gramme et sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. J : Jour. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 13 :** Effets du régime alimentaire standard et du régime supplémenté en Alkyl-Gro administré pendant 3 semaines, sur la masse de divers organes des rates allaitantes (A) et de leurs petits (B). Les valeurs de consommation de croquettes sont exprimées en gramme et sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Cependant, de grandes disparités de consommation sont visibles selon la période considérée. En effet, on constate pendant les 15 premiers jours une consommation graduelle de croquettes, alors que la dernière semaine montre une forte hausse suivie d'une forte baisse. Concernant spécifiquement les rates du groupe Alkyl-Gro, on observe une chute de consommation de 38.6% les 11èmes et 12èmes jours.

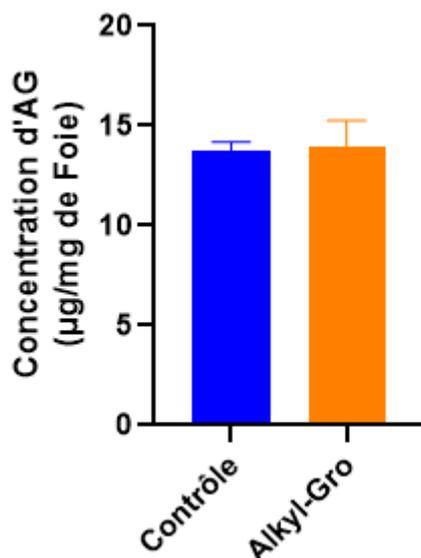
Par ailleurs, l'allure des courbes de consommation alimentaire reflète celle des prises de poids chez les animaux. En effet, la prise de poids des rates traitées avec des Alkyl-Gro est inférieure de 31.8% en moyenne à celles des rates Contrôle, mais l'effet n'est pas significatif sur toute la durée de la lactation (en moyenne  $59.7g \pm 12.6$  pour les Contrôles et  $40.7g \pm 7.7$  pour les Alkyl-Gro) [Figure 12A]. Cependant, l'évolution des courbes fait apparaître deux périodes. On observe une prise de poids graduelle durant les 15 premiers jours, suivie d'un décrochement de courbe pour la 3ème semaine. En particulier au 12ème jour, une différence significative de poids est observée entre les 2 groupes. En effet, les rates qui ont reçu un régime supplémenté en Alkyl-Gro ont un poids significativement plus faible de 7.9% par rapport aux rates du groupe Contrôle ( $324.2g \pm 8.7$  et  $352g \pm 8.6$  respectivement,  $p= 0.046$ ). Cette diminution est principalement liée à deux rates qui possèdent toutes deux un poids 9.4% et 8.8% plus faible que les autres rates du groupe Alkyl-Gro (303g et 305g vs 334.3g). Cela correspond à la chute brutale de consommation alimentaire énoncée précédemment.

Concernant la prise de poids des petits [Figure 12B], on constate qu'après 7 jours d'allaitement, les poids des petits des mères supplémentées en Alkyl-Gro ne sont pas statistiquement différents de ceux des petits des mères du groupe Contrôle ( $16.1g \pm 0.18$  et  $16.6g \pm 0.27$ , respectivement). En revanche, au 14ème jour d'allaitement, les petits du groupe Alkyl-Gro pèsent 6.6% de moins que ceux du groupe Contrôle ( $35.4g \pm 0.36$  et  $37.9g \pm 0.71$  respectivement,  $p=0.002$ ). Au 21ème jour d'allaitement cette différence de poids entre les deux groupes atteint 7% (Alkyl-Gro vs Contrôle,  $58.3g \pm 0.97$  et  $62.7g \pm 1.46$ ,  $p=0.015$ ). La prise de poids des petits est donc significativement affectée par le régime maternel [ANOVA, effet régime :  $F(1,235.8)=6.41$ ,  $p=0.015$ ].

Ainsi, il semble que la diminution de la prise de poids soit consécutive à la prise alimentaire des animaux. Afin d'évaluer si cette différence de poids entre les deux groupes est liée à la croissance d'un organe en particulier, les masses de différents organes ont été déterminées pour chaque groupe afin d'analyser l'effet de la supplémentation en Alkyl-Gro.

Dans l'ensemble, la masse des différents organes prélevés chez les rates n'est pas statistiquement différente entre les deux groupes, même si les foies et cerveaux tendent à être plus lourds dans le groupe Alkyl-Gro [Figure 13A].

En revanche, concernant les petits allaités, les résultats observés diffèrent [Figure 13B]. La masse des foies et cerveaux ne varient pas selon les régimes maternels, contrairement à celle du cœur et de l'estomac. En effet, la masse du cœur chez les petits des mères supplémentées en Alkyl-Gro est significativement inférieure de 13.5% par rapport au Contrôle (Contrôle vs Alkyl-Gro,  $0.37g \pm 0.01$  vs  $0.32g \pm 0.01$ ,  $p= 0.008$ ). De même, la masse de l'estomac des petits du groupe Alkyl-Gro est également plus faible de 12.5% que dans le groupe Contrôle (Contrôle vs Alkyl-Gro,  $0.48g \pm 0.01$  vs  $0.42g \pm 0.01$ ,  $p= 0.012$ ).



**Figure 14 :** Teneur en acides gras dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro). Les résultats sont exprimés en µg par mg d'organe et sont présentés en moyenne ± SEM.

**Tableau 3 :** Composition en AG des lipides totaux du foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Foie	Contrôle	Alkyl-Gro	Contrôle	Alkyl-Gro
12:0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	18:2n-6	7,2 ± 0,2
14:0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	18:3 n-6	0,3 ± 0,0
16:0	29,1 ± 0,6	28,5 ± 0,4	20:2 n-6	0,5 ± 0,0
18:0	17,4 ± 0,2	18,1 ± 0,4	20:3 n-6	1,0 ± 0,0 *
20:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	20:4 n-6	21,2 ± 0,6 *
22:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	22:4 n-6	0,5 ± 0,0
24:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	22:5 n-6	1,3 ± 0,1 **
<b>Σ saturates</b>	<b>47,2 ± 0,5</b>	<b>47,3 ± 0,3</b>	<b>Σ n-6</b>	<b>31,9 ± 0,6</b>
16:1 n-7	1,1 ± 0,1 *	0,8 ± 0,1	18:3 n-3	0,2 ± 0,0
18:1 n-7	1,8 ± 0,0	1,7 ± 0,1	20:3 n-3	0,1 ± 0,0
20:1 n-7	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	20:5 n-3	0,5 ± 0,0 **
<b>Σ n-7</b>	<b>3,0 ± 0,1</b>	<b>2,6 ± 0,2</b>	22:5 n-3	1,1 ± 0,1
16:1 n-9	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	22:6 n-3	7,1 ± 0,3
18:1 n-9	7,7 ± 0,5	7,2 ± 0,4	<b>Σ n-3</b>	<b>9,0 ± 0,3</b>
20:1 n-9	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<i>trans</i> 18:1	0,1 ± 0,0
20:3n-9	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	5,11,14-20:3	0,3 ± 0,0 **
<b>Σ n-9</b>	<b>8,3 ± 0,5</b>	<b>7,7 ± 0,5</b>	<b>autres</b>	<b>0,4 ± 0,0</b>

Les lipides ont été extraits par la méthode Folch et saponifiés. Les AG ont été méthylés en EMAG et analysés par GC-MS. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique des AG totaux et présentés en moyenne ± SEM. L'effet du régime maternel est analysé par le test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

*Du fait de l'interruption des expériences, tout ce qui était initialement prévu dans le cadre de ce stage n'a pas pu être réalisé. Ainsi, beaucoup de résultats sont manquants et ne pourront être présentés, comme c'est le cas pour l'analyse du profil des Alkyl-Gro, des gènes impliqués dans le métabolisme des alcool gras et de certains acides gras, l'expression protéique et le dosage lipidique. Toutefois, les résultats présentés sont partiels et concernent les analyses du foie chez les rates allaitantes.*

## **2. Profil des acide gras chez les rates allaitantes**

Le foie est un des principaux organes du métabolisme des AG. La teneur moyenne totale en AG hépatiques est de 13.9 µg/mg de tissus chez le groupe Alkyl-Gro et de 13.7 µg/mg de tissus chez le groupe Contrôle. La teneur n'est pas significativement différente selon le régime alimentaire des rates en période de lactation [Figure 14]. Seuls des changements modérés ont été observés dans la composition des acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) [Tableau 3].

Dans la famille des AGS, l'acide palmitique (16:0) est l'AG le plus abondant, atteignant près de 30% des AG totaux identifiés. Son taux ne diffère pas significativement quel que soit le régime alimentaire des rates. Globalement, les proportions d'AGS ne sont pas modifiées par le régime maternel.

Parmi les AGMI, dans la famille n-7, le taux de l'AG 16:1n-7 est significativement plus faible chez les rates nourries avec le régime supplémenté en Alkyl-Gro par rapport au groupe Contrôle (0.8% contre 1.1% p=0.04). En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour les AG de la famille n-9 entre les deux groupes.

Concernant la famille des AGPI n-6, elle est caractérisée quantitativement par le précurseur linoléique 18:2n-6 et le dérivé arachidonique (ARA) 20:4n-6. La supplémentation en Alkyl-Gro s'est traduite par une proportion plus élevée de 20:4n-6 (23.1% pour le groupe Alkyl-Gro contre 21.2% pour le groupe Contrôle, p=0.04). Le taux du précurseur 18:2n-6 n'est pas affecté tandis que celui de 22:5n-6, dérivé de l'ARA, est lui significativement plus faible chez les rates du groupe Alkyl-Gro par rapport au groupe Contrôle (p=0.003). Le régime enrichi en alkylglycérols tendrait à favoriser l'accumulation d'ARA en évitant le métabolisme en dérivés plus longs et plus insaturés.

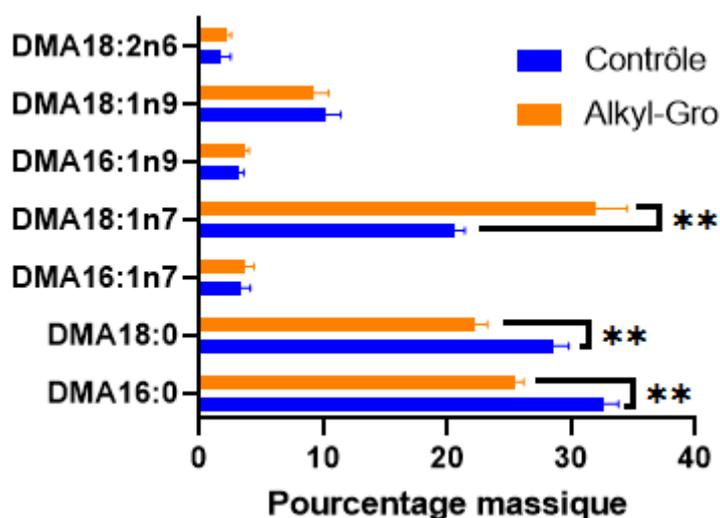
Dans l'ensemble, les profils AGPI n-3 sont similaires dans les deux groupes. Des différences mineures mais significatives sont cependant observées pour l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3). La teneur en DHA (22:6n-3) tend, elle, à légèrement augmenter avec le régime enrichi en Alkyl-Gro : la différence de proportions observée s'expliquerait par des teneurs en précurseurs plus faibles (1.9% pour le groupe Contrôle contre 1.4% pour le groupe Alkyl-Gro). À l'inverse des AG de la famille n-6, le régime enrichi en alkylglycérols tendrait à favoriser le métabolisme des AG n-3 jusqu'au DHA.

Nous avons ensuite poursuivi par l'analyse du profil en AG du cerveau des mères après 3 semaines de lactation. Nous souhaitons en effet savoir si le régime maternel peut influencer la teneur en étherphospholipides et notamment en plasmalogènes, et par conséquent celle des AG constitutifs de ces lipides complexes. Cependant, suite à l'interruption des expériences, cette partie n'a pas pu être développée. Pour autant, il est envisagé d'observer une modulation dans la composition en AG à l'issue de la supplémentation en Alkyl-Gro, et notamment par un potentiel enrichissement du taux de DHA.

**Tableau 4 :** Teneur en diméthylacétals (DMA) dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro).

Tissus	DMA	Contrôle	Alkyl-Gro
Foie	% de MD	0,83 ± 0,05	0,83 ± 0,02
	µg/mg	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Les lipides ont été extraits par la méthode Folch et saponifiés. Les aldéhydes gras dérivés des plasmalogènes ont été méthylés en DMA et analysés par GC-MS. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique des dérivés méthylés totaux (MD = DMA + EMAG) et en µg/mg de tissus et sont présentés en moyenne ± SEM.



**Figure 15 :** Composition en aldéhydes gras des lipides totaux du foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkylglycérols (Alkyl-Gro). Les lipides ont été extraits par la méthode Folch et saponifiés. Les aldéhydes gras ont été méthylés en DMA et analysés par GC-MS. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique des DMA totaux et sont présentés en moyenne ± SEM. L'effet du régime maternel est analysé par le test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

### **3. Profil des diméthylacétals chez les rates allaitantes**

Les acides gras figurent parmi les principaux composants des lipides, mais les aldéhydes gras dérivés des plasmalogènes représentent une classe majeure d'identification de ces étherphospholipides particuliers. Les aldéhydes gras ont été mesurés sous la forme de diméthylacétals (DMA) par GC. Ils ont été analysés afin d'évaluer l'impact d'un apport en Alkyl-Gro sur la proportion de plasmalogènes dans les organes chez les rates en période de lactation. Les résultats présentés font référence à une quantification basée sur l'étalon interne 17:0 mais sans la réalisation de la calibration externe prévue avec les standards de DMA, ceux-ci n'ayant pas été livrés avant le confinement.

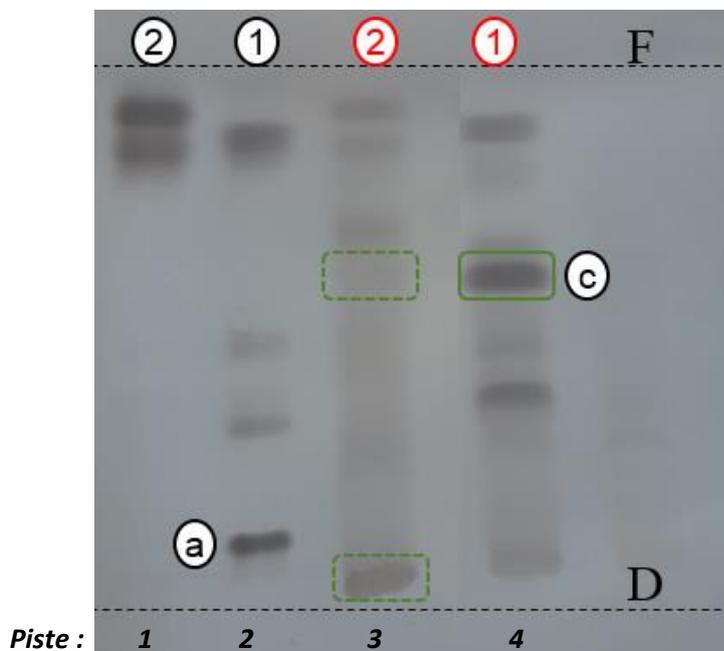
Bien que le foie ne soit pas l'organe privilégié pour l'étude des étherlipides, l'analyse concomitante avec les AG étant privilégiée, les profils chromatographiques nous conduisent à rechercher un effet des régimes maternels sur les plasmalogènes. Ainsi, dans le foie, la teneur moyenne totale en DMA hépatique des rates n'est pas significativement différente selon le régime alimentaire. Elle représente pour les deux groupes 0.8% des dérivés méthylés totaux identifiés (MD = DMA + EMAG) [tableau 4]. En revanche, des changements ont été observés dans la composition moléculaire des DMA selon la nature de la chaîne alkényle [Figure 15].

D'après l'analyse des DMA, 7 espèces moléculaires d'aldéhyde gras différentes ont été identifiées dans le foie. Les DMA en C16 et en C18 sont les principales structures détectées, composées de chaînes saturée, monoinsaturée (n-7 ou n-9) ou polyinsaturée (n-6).

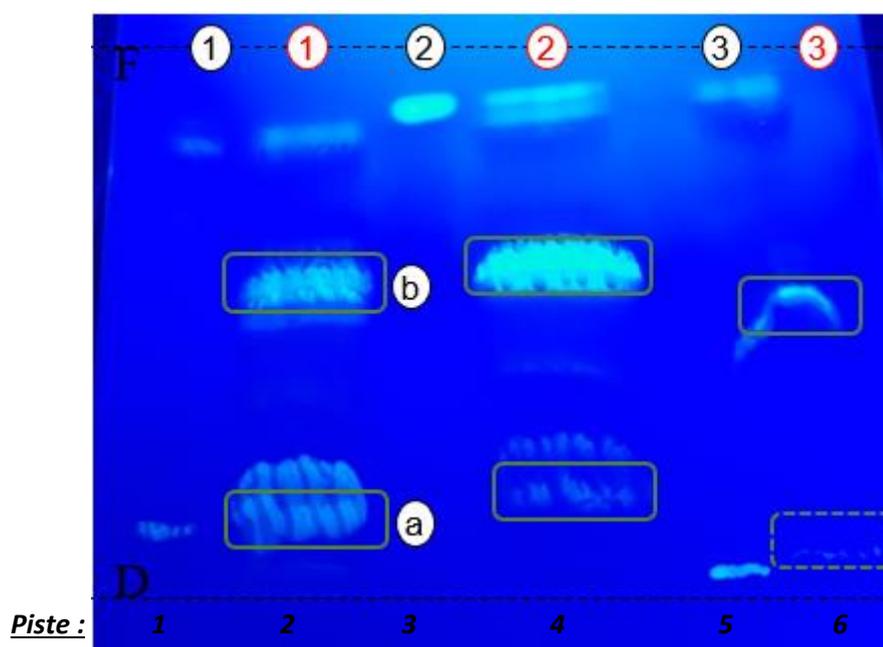
Dans la famille des aldéhydes gras à chaîne saturée, le DMA 16:0 est le plus abondant des aldéhydes gras totaux identifiés, atteignant près de 32.6% pour les Contrôles et 25.5% pour les Alkyl-Gro. Le taux de DMA 18:0 est de 28.5% pour les contrôles et de 22.3% pour les Alkyl-Gro. Ainsi, on peut constater que les rates supplémentées en Alkyl-Gro présentent un taux significativement inférieur de 21.8% pour le DMA 16:0 et de 21.8% pour le DMA 18:0 par rapport au groupe Contrôle ( $p=0.004$  et  $p=0.01$ ). Les proportions d'aldéhydes gras saturés sont significativement affectées par le régime maternel [ANOVA, effet régime,  $F(1,529.7)=29.4$ ,  $p<0.001$ ].

Parmi les aldéhydes gras à chaînes monoinsaturées, dans la famille n-7, la supplémentation en Alkyl-Gro s'est traduite par une proportion plus élevée de DMA 18:1n-7 de 35.9% par rapport au groupe Contrôle (20.5% contre 32.0%, respectivement,  $p < 0.01$ ). En revanche, le taux de DMA16:1n-7 ne diffère pas quel que soit le régime alimentaire. De plus, aucune différence significative n'a été observée pour les aldéhydes gras de la famille n-9 entre les deux groupes. Concernant, les chaînes polyinsaturées, dans la famille n-6, le 18:2n-6 est le seul aldéhyde gras polyinsaturé identifié. Sa teneur ne diffère pas significativement quel que soit le régime alimentaire.

Nous avons poursuivi par l'analyse du cerveau, notre organe cible connu pour sa richesse en plasmalogènes. Cependant, cette partie n'a pas pu être développée en raison de l'interruption des expériences. Une hypothèse possible est de retrouver une modulation dans la composition moléculaire en DMA comme c'est le cas dans le foie, mais aussi dans les teneurs plus importantes de DMA chez les rates supplémentées en Alkyl-Gro.



**Figure 16** : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'aide d'un système de solvants constitué de chloroforme : méthanol (96:4,v/v) à l'issue d'une acétylyse. Les échantillons acétylysés ont été révélés au sulfate de cuivre. F : ligne de front du solvant, D : ligne de dépôt. (1) 1-O-alkyl-*sn*-glycérols, (2) 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérols. Noir : étalon, Rouge : échantillons ayant subi la réaction. (a) Alkylglycérol, (c) Alkylglycérol diacétylé.



**Figure 17** : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'aide d'un système de solvants constitué de chloroforme : méthanol (96:4,v/v) à l'issue d'une hydrogénolyse. Les échantillons hydrogénolysés ont été révélés à la primuline sous UV. F : ligne de front du solvant, D : ligne de dépôt. (1) 1-O-alkyl-*sn*-glycérols, (2) 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérols et (3) PAF. Noir : étalon, Rouge : échantillons ayant subi la réaction. (a) Alkylglycérol, (b) Acide gras libre.

## **4. Profil des alkylglycérols**

### **a. Mise au point de l'extraction**

Afin d'identifier précisément les alkylglycérols présents dans les différents tissus prélevés des animaux, une mise au point concernant son extraction a été nécessaire. Cette mise au point s'est appuyée sur les études de Kumar et al (1983) et de Pinault et al (2018).

Tout d'abord, les essais ont été réalisés sur les échantillons de standards de lipides neutres et de phospholipides : 1-O-alkyl-*sn*-glycérols purifiés d'huile de foie de requin, 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérols d'huile de foie de requin et PAF (Platelet-Activating Factor, 1-O palmityl-2-acétoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) dont le précurseur est le 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine.

#### **Méthode 1 : Acétolyse**

Dans un premier temps, les étherlipides ont subi une acétolyse. Cette réaction permet de couper l'acide gras lié en *sn*-2 et le phosphate en *sn*-3 des phospholipides, mais également d'acétyler le squelette alkylglycérol. On obtient ainsi un alkylglycérol diacétylé. L'analyse porte sur l'huile de foie de requin constituée de 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérol [Figure 16, pistes 1 et 3], avec des alkylglycérols purifiés de cette huile en contrôle (pistes 2 et 4). Tout d'abord l'analyse CCM nous montre que l'huile de foie de requin contient deux bandes correspondant à des triacylglycérols et des alkyl-diacylglycérols (piste 1). De manière surprenante, on constate que l'huile purifiée d'alkylglycérols n'est pas constituée que d'alkylglycérols, puisqu'on détecte plusieurs bandes (piste2). Nombre de ces bandes demeurent non-identifiées.

Lorsqu'on réalise une acétolyse (pistes 3 et 4), on modifie les profils des échantillons (des pistes 1 et 2). Le contrôle alkylglycérol semble diacétylé (piste 4, bande c), bien que de nouvelles bandes soient apparues et restent non identifiées. Il semble en revanche que la réaction soit totale puisque la bande d'alkylglycérol n'est plus présente (bande a). Cependant, lorsque les alkyl-diacylglycérols d'huile de requin sont acétolysés (piste 3), on n'observe pas de bande correspondant aux alkylglycérols diacétylés, mais une faible bande pouvant correspondre aux alkylglycérols (bande a) apparaît, ce qui sous-entend que la réaction chimique aurait partiellement libéré les acides gras mais sans aboutir à la dérivation de l'alkylglycérol.

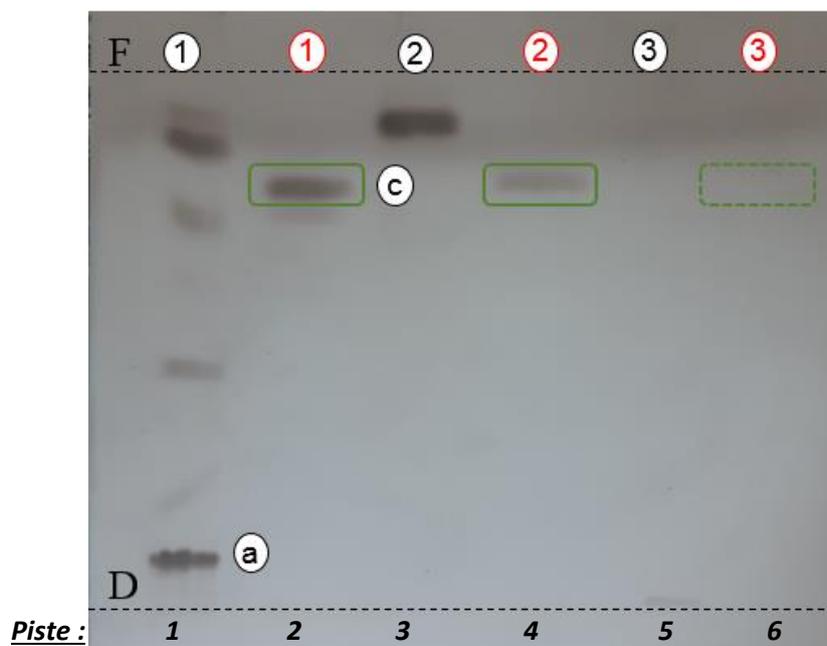
Ainsi, cette méthode ne permet pas d'acétolysier les étherlipides pour obtenir des alkylglycérols diacétylés dans le but de les analyser en GG-FID. Il a donc fallu élaborer une autre méthode.

#### **Méthode 2 : Hydrogénolyse et acétylation**

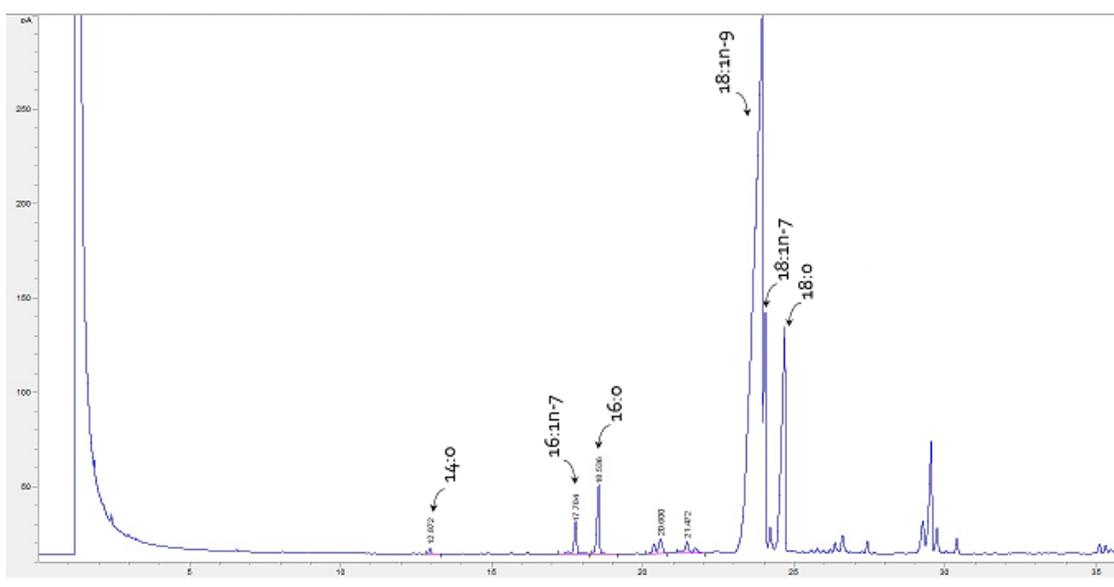
Afin de cliver les liaisons ester *sn*-2 et *sn*-3 des étherlipides, une hydrogénolyse a été effectuée avec du réactif de Vitride®. Il s'agit d'un puissant agent réducteur permettant de réduire les liaisons esters, mais de garder la liaison éther en *sn*-1 intacte. Cette réaction permet d'aboutir au squelette alkylglycérol sans AG ni autre structure.

L'analyse porte sur l'huile de foie de requin constituée de 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérol [Figure 17, pistes 3 et 4], avec des alkylglycérols purifiés de cette huile (piste 1 et 2) et le PAF en contrôle (pistes 3,4).

Lorsque l'huile de requin subit la réaction d'hydrogénolyse, cela engendre la libération du squelette glycérol (piste 4, bande a) et des acides gras (bande b). Les bandes près du front de migration montrent en revanche que la réaction n'est pas totale.



**Figure 18** : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres et de phospholipides à l'aide d'un système de solvants constitué de chloroforme : méthanol (96:4,v/v) à l'issue d'une acétylation. Les échantillons acétylés ont été révélés au sulfate de cuivre. F : ligne de front du solvant, D : ligne de dépôt. (1) 1-O-alkyl-*sn*-glycérols, (2) 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycérols et (3) PAF. Noir : étalon, Rouge : échantillons ayant subi la réaction. (a) Alkylglycérol, (b) Acide gras libre. (c) Alkylglycérol diacétylé.



**Figure 19** : Chromatogramme de l'alkylglycérol diacétylé issu de 1-O-alkyl-*sn*-glycérols purifiés de l'huile de foie de requin. Les Alkyl-Gro ont été hydrogénolysés puis acétylés pour être analysés par GC-FID.

De plus, la réaction d'hydrogénolyse a été testée sur un étherphospholipide (PAF) puisque les étherlipides rencontrés dans les cellules seront davantage sous forme phospholipidique et qu'il faut vérifier que la réaction coupe bien le phosphate en *sn*-3. Suite à la réaction cela engendre la libération d'alkylglycérol [piste 6, bande a, Figure 17] mais la réaction semble non totale. Ainsi, on en conclut que la réaction d'hydrogénolyse sur des étherlipides et des étherphospholipides permet bien de cliver les liaisons *sn*-2 et *sn*-3 afin d'obtenir l'1-O-alkylglycérol, bien que nos conditions expérimentales soient à optimiser pour les étherlipides complexes.

Pour terminer, l'1-O-alkylglycérol [bande a de la piste 4, Figure 17] a été prélevé des bandes de silice pour être dérivé par acétylation. Les résultats présentés en Figure 18 montrent une seule bande révélée après un bain au sulfate de cuivre, dont la migration correspond à celle d'un alkylglycérol diacétylé (bande c). Ainsi, les alkylglycérols ont bien été dérivés en alkylglycérols diacétylés. Par contre le test de l'acétylation sur l'étherphospholipide (PAF) n'est quantitativement pas optimum d'après les résultats [piste 6, bande c, Figure 18].

Pour finir, les alkylglycérols diacétylés issus de l'huile de requin ainsi que ceux de l'huile purifiée ont enfin été extraits puis analysés par GC-FID [Figure 19]. Nous nous intéressons au profil de l'huile purifiée car elle contient essentiellement l'1-O-alkylglycérol de l'huile de foie de requin dont était constitué le régime des rates dans notre étude. Il est donc important d'étudier sa composition afin de connaître quel composé sera transmis au cours de l'alimentation.

D'après l'analyse, différentes espèces moléculaires d'alcools gras ont été identifiées dans l'huile purifiée [Figure 19]. Les alkyl-Gro en C16 et en C18 sont les principales structures détectées, composées de chaînes alkyles saturée ou monoinsaturée (n-7 ou n-9). Toutefois, à l'heure actuelle certains pics sont non identifiés, en attente d'une analyse GC-MS.

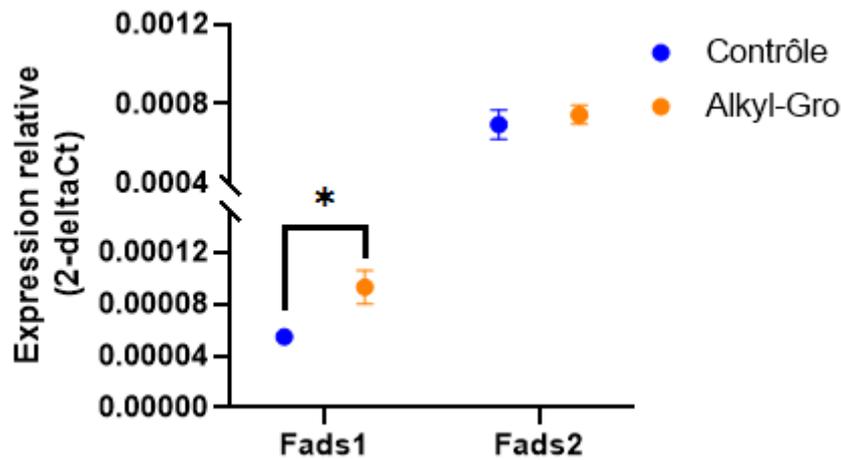
Dans la famille des alcools gras à chaîne saturée, l'alcool batylique (18:0-Alkyl-Gro) est le plus abondant des alcools gras totaux identifiés atteignant 17.3 %. Le taux de l'alcool chimylique (16:0-Alkyl-Gro) est de 5.2 %.

La famille des alcool gras à chaîne insaturée est caractérisée quantitativement par l'alcool sélachylique (18:1n-9-Alkyl-Gro) dont la proportion est de 69,7 %. Concernant la famille des n-7, le taux de 16 :1n-7 est de 1.6% et celui du 18 :1n-7 atteint 6.2% des alcools gras totaux identifiés. Ce profil correspond à celui classiquement trouvé dans une huile de requin.

## **b. Analyse chez les rates allaitantes**

Afin d'identifier précisément les sous-types d'alkylglycérols présents dans les tissus des rates allaitantes à l'issue de la supplémentation alimentaire, il était prévu d'analyser le profil des alkyl-Gro.

Bien que l'analyse n'ait pu être réalisée, on s'attendait à retrouver, notamment dans le foie, les mêmes composés d'alkyl-Gro observés dans l'huile purifiée [Figure 19]. Ainsi, on suppose que les rates supplémentées en alkyl-Gro vont présenter des changements prononcés dans la composition des fractions alkyles dans les tissus. On s'attend à un enrichissement des proportions d'alkyl-Gro dans le groupe Alkyl-Gro par comparaison au groupe contrôle, et plus particulièrement en chaîne alkyle 18:1, puisque l'alcool sélachylique a été retrouvé majoritaire dans l'huile purifiée dont est issu le régime des rates du groupe Alkyl-Gro.



**Figure 20 :** Expressions géniques des désaturases dans le foie, estimées par qPCR chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkyglycérols (Alkyl-Gro). L'expression relative de *Fads1* et *Fads2* a été déterminée dans le foie par qPCR (Taqman®) et est exprimée en  $2^{-\Delta Ct}$ . Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.

**Tableau 5 :** Exemple de ratio des acides gras produit sur précurseur, estimant les expressions des élongases (*Elovl2*, *Elovl5* et *Elovl6*) dans le foie chez les rates en période de lactation nourries avec un régime standard (Contrôle) ou supplémenté en alkyglycérols (Alkyl-Gro).

Foie	Contrôle		Alkyl-Gro		
<b><i>Elovl2</i></b> 22:5n-3/20:5n-3	2,1	$\pm$ 0,1	ns	2,1	$\pm$ 0,6
<b><i>Elovl5</i></b> 18:3n-6/20:3n-6	3,9	$\pm$ 0,4	ns	3,2	$\pm$ 0,2
<b><i>Elovl6</i></b> 18:0/16:0	0,6	$\pm$ 0,2	ns	0,6	$\pm$ 0,0

Les résultats sont exprimés en ratio des AG produit sur précurseur et sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.



**Figure 21 :** Chromosome 1 (264,159,877-264,172,981) du génome de *Rattus norvegicus*. Réalisé à partir de Ensembl®.

## 5. Expressions géniques

### a. Gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras chez les rates allaitantes

Les résultats sur les profils des AG n-6 et n-3 soulignent une tendance à moduler dans le taux d'AGPI dans le foie en lien avec la supplémentation en Alkyl-Gro. Pour comprendre cette observation, nous avons approfondi l'analyse du profil des désaturases et des élongases impliquées dans le métabolisme des acides gras hépatiques.

Tout d'abord, l'expression des  $\Delta 5$ - et  $\Delta 6$ -désaturations a été évaluée par la quantification de l'ARNm de *Fads1* et *Fads2* respectivement [Figure 20]. Les résultats montrent une expression hépatique plus élevée de 72% du gène *Fads1* chez les rates nourries avec le régime supplémenté en Alkyl-Gro par rapport au Contrôle ( $9.3.10^{-5}$  vs  $5.4.10^{-5}$  respectivement,  $p=0.017$ ). En revanche, la supplémentation en Alkyl-Gro n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression de *Fads2*. Ainsi, une étude sur l'expression protéique de FADS1 sera nécessaire afin de confirmer l'effet observé dans le foie.

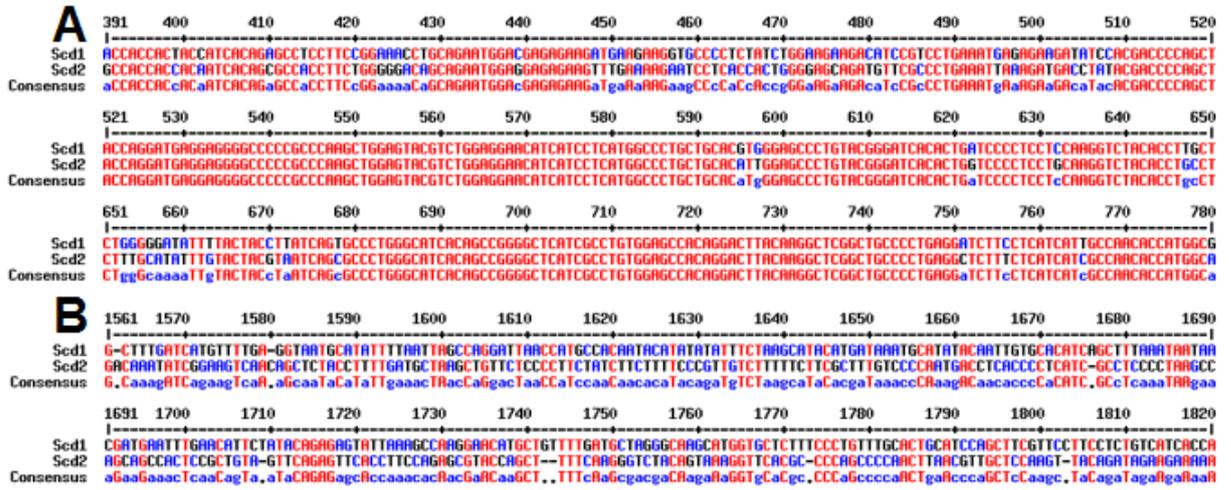
Puis, l'expression des élongases a été évaluée par la quantification de l'ARNm de *Elovl2*, *Elovl5* et *Elovl6*. Les résultats hépatiques n'ont pas pu être développés, mais on peut s'attendre *a priori* à ce que ces expressions d'élongases ne varient pas quel que soit le régime alimentaire des rates étant donné que le ratio des AG produit/précurseur n'est pas significatif [Tableau 5]. Par exemple dans le cas d'*Elovl6*, codant pour l'élongase responsable de l'élongation du 16:0 en 18:0, on voit que les ratios dans le foie sont de 0.6 pour les rates Contrôles et de 0.6 pour les rates Alkyl-Gro ( $p=0.19$ ). D'un autre côté, les profils d'AG favoriseraient l'allongement des  $\omega 3$  jusqu'au DHA et des  $\omega 6$  jusqu'à l'acide arachidonique. On peut donc s'attendre à l'implication des élongases mais de manière très ciblée. Comme précédemment, les effets observés par qPCR seront confirmés par Western-Blot.

### b. Conception des amorces

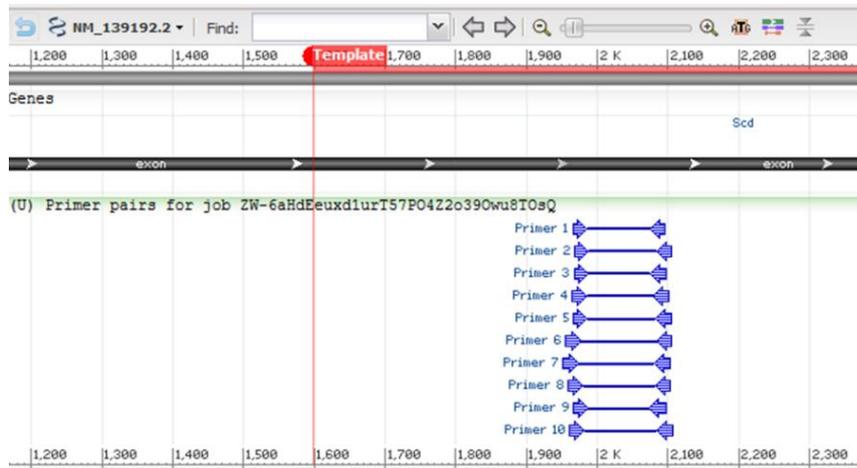
Au cours de ce projet, l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et des alcool gras a nécessité la conception d'amorces et de sondes spécifiques au gène d'intérêt pour la réalisation de qPCR. Pour cela, il est important de sélectionner une région d'amplification appropriée qui garantit l'amplification de l'ADNc cible sans coamplification de la séquence génomique et d'autres gènes de séquence homologue.

Nous nous intéressons au cas du gène *scd1*, gène codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides gras. La  $\Delta 9$ -désaturase introduit en effet une double liaison de configuration *cis* dans la chaîne carbonée d'un acide gras. Selon les organes, deux gènes codent pour cette enzyme chez le rat : *scd1* et *scd2*. Le laboratoire dispose déjà d'amorces et sonde Taqman® pour *scd1*, mais souhaite compléter par des outils expérimentaux pour étudier l'expression des deux isoformes protéiques.

Dans un premier temps, il est important d'étudier la localisation et la configuration du gène. On peut constater que les gènes *scd1* et *scd2* sont tous deux présents sur le chromosome 1 chez *Rattus norvegicus* et qu'ils sont dirigés de manière opposée [Figure 21]. Le gène *scd1* est constitué de 6 exons. Pour connaître la séquence du fragment que l'on veut amplifier, la séquence nucléotidique de *scd1* a été comparée à celle du gène *scd2* en réalisant un alignement des séquences des gènes homologues. On constate que les deux gènes présentent une forte similarité dans leurs séquences [Figure 22A]. Ainsi, il n'est donc pas possible de réaliser une qPCR en Taqman® avec une sonde unique spécifique du gène *scd1* et une autre spécifique de *scd2*.



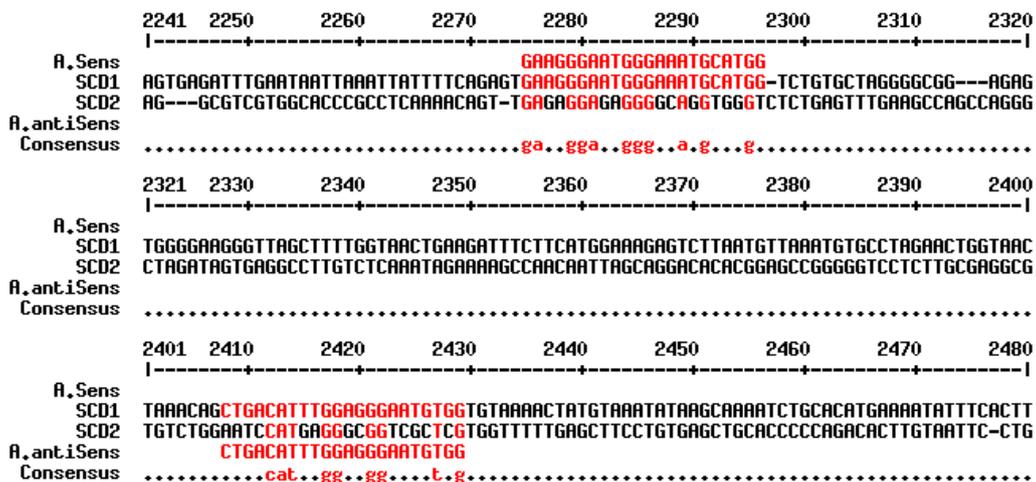
**Figure 22 :** Alignement de séquence nucléotidique des gènes *scd1* et *scd2* chez *Rattus norvegicus*. A. Région codante. B. Région 3' non codante. Réalisé à partir de Multalin®. Rouge = fort consensus, Bleu = faible consensus. *Scd1* mRNA GenBank: AF509568.1 (NM\_139192.2) ; *scd2* mRNA GenBank: AB032243.1 (NM\_031841.1)



**Primer pair 7**

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAGGGAATGGGAAATGCATGG	Plus	22	1952	1973	59.90	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	CCACATCCCTCCAATGTCAG	Minus	22	2102	2081	59.24	50.00	5.00	1.00
Product length	151								

**Figure 23 :** Exemple de couples d'amorces sélectionnées dans la région 3' non codante du gène *scd1*. Réalisé à partir de Primer Blast®.



**Figure 24 :** Alignement de séquence nucléotidique des gènes *scd1* et *scd2* chez *Rattus norvegicus* avec le couple d'amorces spécifiques choisi dans la région 3' non codante. A : amorce. Réalisé à partir de Multalin®. Rouge = fort consensus. *Scd1* mRNA GenBank: AF509568.1 (NM\_139192.2), *scd2* mRNA GenBank: AB032243.1 (NM\_031841.1)

Cette technique est cependant possible pour *scd1* dans le foie (déjà disponible dans au laboratoire) puisque l'expression de *scd2* hépatique est nulle, mais reste insatisfaisante dès que d'autres organes sont étudiés.

Une analyse qPCR en SyberGreen® sera alors réalisée pour les autres organes. La région codante du gène *scd1* n'est pas assez discriminante pour être choisie comme région d'amplification. On peut constater qu'il n'en est pas de même pour la région 3' non-codante plus spécifique pour chacun des gènes. Cette région peut donc être ciblée pour réaliser l'amplification de l'ADNc [Figure 22B].

Dans un deuxième temps, après avoir sélectionné une région d'amplification appropriée, il faut rechercher dans cette région un couple amorce pour le gène *scd1*, pour commencer. Pour cela, le programme Primer Blast® est utilisé, celui-ci propose différents couples amorces possibles dans la région 3' non-codante du gène *scd1* [Figure 23]. Ces couples d'amorces se différencient selon leur longueur, la température de fusion, le pourcentage de GC et leur complémentarité. Ces paramètres sont à prendre en compte lors de la sélection d'un couple d'amorces afin d'optimiser l'amplification du gène. Il est préférable de choisir un couple d'amorces spécifiques de la cible souhaitée avec un taux de GC le plus proche de 50%, avec un faible score de complémentarité en 3', une température de fusion (T<sub>m</sub>) de l'amorce proche de 60°C. Par exemple, le couple d'amorces n°7 a été choisi car il répond au mieux à l'ensemble des critères de sélection pour une quantification optimale [Figure 23].

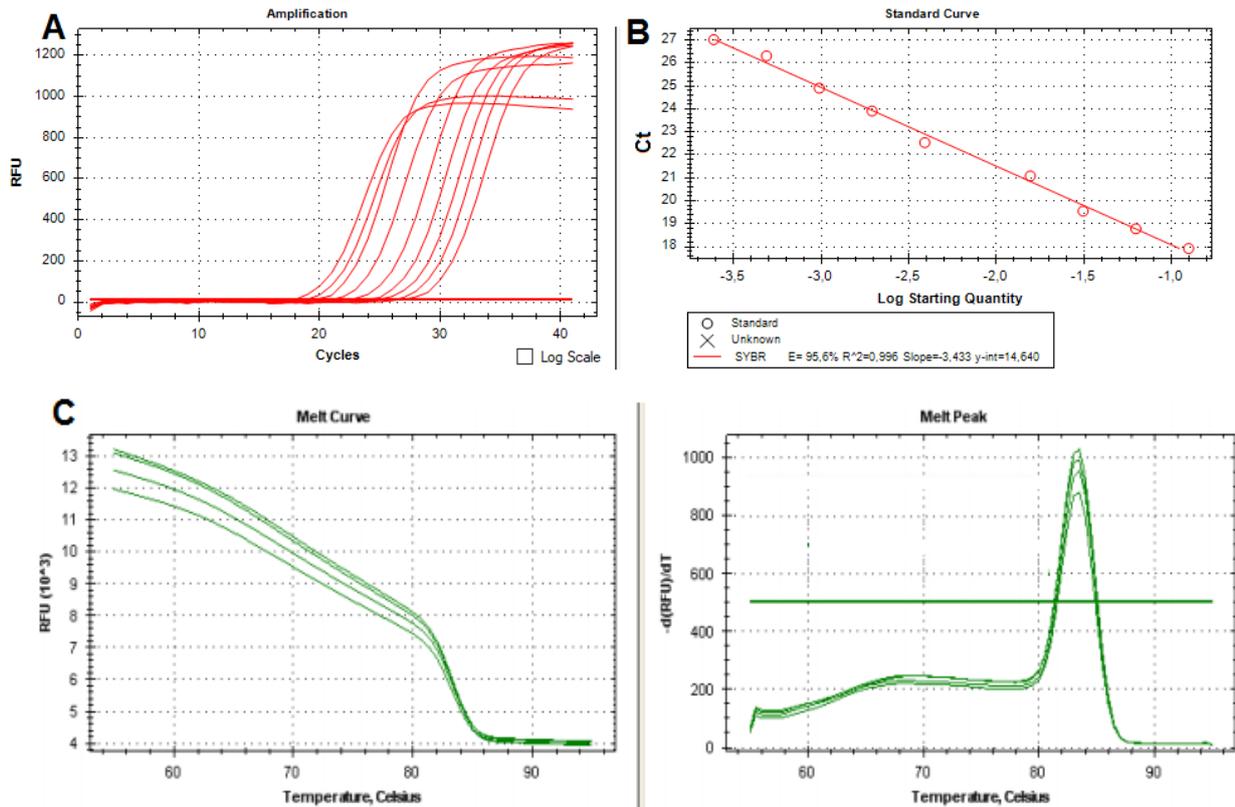
Par la suite, la localisation de la région d'hybridation des amorces est vérifiée en réalisant un alignement de séquences avec le gène *scd1* et *scd2* [Figure 24]. Parmi les possibilités envisagées, on constate que le couple d'amorces sélectionné est suffisamment spécifique de la séquence de *scd1* et permet de discriminer *scd2*.

Pour finir, les amorces seront ensuite testées pour l'analyse de l'expression de *scd1* réalisée en qPCR SyberGreen® selon le protocole mentionné dans la partie matériels et méthodes. Les résultats d'amplification du gène *scd1* permettront de choisir que le meilleur des couples d'amorces choisis [Figure 25A]. Pour cela, la spécificité des amorces conçues est vérifiable à partir de l'efficacité de l'amplification du gène. Cette efficacité (E) est calculée à partir de la pente de la courbe standard :  $E (\%) = (10^{-1/pente} - 1) \times 100$ .

Cette pente est obtenue selon les dilutions en série des échantillons [Figure 25B]. L'objectif est d'obtenir une pente proche de 3.3, ce qui indiquerait une efficacité de 100%, avec une amplification optimale dans nos conditions expérimentales.

De plus, l'analyse des courbes de fusion doit permettre d'évaluer si les amorces choisies ont permis d'amplifier un seul et unique amplicon spécifique de notre gène d'intérêt. En effet, l'apparition d'un seul pic apparu confirme qu'un seul amplicon a été généré [Figure 25C]. Celui-ci est indiqué par le taux de fluorescence en fonction de la température de fusion. Ce pic reflète l'amplification de l'ADN double brin qui se dissocie en ADN simple brin (ce qui entraîne une chute de la fluorescence). Une amplification du gène non-spécifique sera visible par l'apparition d'un deuxième pic dans la courbe de fusion.

Ainsi, l'analyse de chaque gène d'intérêt sera construite selon cette méthode pour appréhender l'effet des alkylglycérols sur les différents métabolismes lipidiques.



**Figure 25 : Modèle graphique de qPCR avec le réactif SYBER Green. A. Courbe d'amplification,** l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles effectués. RFU : unités de fluorescence relatives **B. Courbe standard,** cycle seuil (Ct) en fonction du facteur de dilution exprimé en logarithme. o : échantillon de la gamme d'étalonnage. E : efficacité. **C. Courbe et pic de fusion,** l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction de la température en degré Celsius.

## IV - DISCUSSION

Au cours de la période d'allaitement, la mère transmet via le lait maternel des nutriments essentiels pour le développement de sa progéniture (Innis, 2007). De plus, la composition du lait maternel peut être influencée par le régime alimentaire des mères. Ainsi, des stratégies nutritionnelles impliquant les précurseurs alkylglycérols chez les mères, suggèrent des effets bénéfiques chez leurs petits via l'allaitement (Oh et al, 1994). Ce projet a pour but d'étudier l'impact d'un enrichissement du lait maternel en Alkyl-Gro, administré chez des rates au cours de la période de lactation, sur le développement de la progéniture. Cependant dans un premier temps, il est important d'examiner l'impact d'un régime enrichi en Alkyl-Gro chez les mères.

Dans la première partie de ce travail, d'après nos résultats, la période de lactation a permis d'observer deux évènements qui se superposent dans la prise de poids des mères : un petit effet global sur la prise de poids des animaux en croissance, *a priori* sans lien avec la consommation alimentaire, et un évènement soudain qui se répercute uniquement sur le groupe alkyl-Gro. En effet, les mères sont primo-gestantes et jeunes, c'est pour cette raison qu'elles ont de petits poids initialement et qu'elles prennent du poids ensuite de manière relativement importante (par rapport à des animaux plus âgés où leurs poids corporels restent plus stables), en lien avec une forte consommation alimentaire. Par ailleurs, il semblerait que plusieurs évènements aient eu lieu durant le week-end et aient impacté la prise alimentaire du groupe alkyl-Gro, et par voie de conséquence la prise de poids de certains animaux. Seule l'intervention de personnels techniques extérieurs à l'animalerie présents pour réparer des installations électriques la veille du week-end en question, expliquerait l'effet observé. Les évènements liés à la consommation alimentaire sont gênants dans cette étude, mais l'impact de la supplémentation en alkyl-Gro sur les 3 semaines de traitement reste à explorer. Les résultats de Yu et al, (2019) montrent un effet des alkylglycérols sur le tissu adipeux (TA). Il est donc envisageable que cette supplémentation ait un impact sur la masse de TA, qui n'a pas été mesurée dans le cadre de ce travail.

Concernant le profil d'alkyl-Gro dans notre étude, bien qu'il n'ait pas été démontré un enrichissement de ces composés dans les tissus des rates, cette hypothèse est néanmoins envisagée. En effet, il a déjà été retrouvé des fractions alkyles dans les phosphoglycérides de foie de rats à l'issue d'une supplémentation en alkyl-Gro (Bandi et al 1971). En corrélation avec ces résultats, Blank et ses collaborateurs (1999) ont observé une augmentation de la quantité d'alkyl-acyl-glycérophosphocholine dans le foie, le rein et les tissus pulmonaires chez des rats mâles à l'issue d'une supplémentation en Alkyl-Gro. Ainsi cette étude montre que le rat peut utiliser les Alkyl-Gro issus de son alimentation comme précurseur permettant d'augmenter la synthèse en étherlipides dans les tissus.

De plus, dans notre cas, on fait l'hypothèse que ce régime Alkyl-Gro chez les mères aura également un impact sur la composition du lait maternel. Cependant, est-il possible d'enrichir à ce point un lait maternel jusqu'à modifier les teneurs en étherlipides (mesurées par un profil en alkylglycérols et un profil en DMA dérivés des plasmalogènes) des petits, sur une période de 3 semaines ? L'analyse de nos profils en alkylglycérols extraits des organes permettra de répondre à cette question.



Par la suite dans notre étude, l'apport alimentaire en alkyl-Gro chez les rates s'est traduit par une modulation de la composition moléculaire en plasmalogènes. Nos résultats mesurés dans le foie sont en accord avec une précédente étude (Blank et al, 1999), qui a constaté une augmentation des chaînes alk-1'-ényles en 18:1 des éthers-phosphoglycérines dans le foie, les reins et les tissus pulmonaires à la suite d'une supplémentation en alkyl-Gro chez des rats mâles. Comme c'est le cas dans notre étude, aucun changement dans la teneur en plasmalogènes n'avait été observé dans ces tissus. Les auteurs supposent que la plupart des étherlipides exogènes à longue chaîne s'incorporent dans les tissus, mais que la conversion ultérieure en plasmalogènes ne se produit qu'avec des chaînes carbonées en *sn*-1 saturées ou monoinsaturées (contenant des chaînes alkyles d'une longueur comprise entre C15 et C19). Cela serait lié à la spécificité de certaines enzymes impliquées dans la synthèse de plasmalogènes tel que la plamanyléthanolamine désaturase (enzyme qui permet de convertir les étherlipides en plasmalogènes) (Das et al, 1992). Toutefois, on peut émettre des réserves quant aux conclusions des auteurs, parce que les tissus analysés comportent certes des étherphospholipides tels que les plasmalogènes, mais ce ne sont pas les organes les plus riches en ces molécules. On peut d'une part supposer un effet sur les étherlipides non-plasmalogènes, qui n'ont pas fait l'objet d'analyse dans ces travaux, et d'autre part un impact sur les plasmalogènes, mais dans des tissus cibles tels que le cerveau ou le cœur.

Dans notre étude concernant le foie, nous ne montrons pas de différences quantitatives en DMA selon les régimes, en revanche nous observons une composition différente. Les effets observés portent sur les DMA 16:0, 18:0 et 18:1n-7, mais pas le DMA 18:1n-9 qui est très largement majoritaire dans l'huile administrée aux rates. Cet impact sur la distribution moléculaire des DMA était attendu avec une supplémentation en alkylglycérols, mais pas dans ce sens. On peut donc se demander si la digestion des alkylglycérols est identique quelle que soit la chaîne alkyle, ce qui engendrerait des formes moléculaires privilégiées ensuite dans les espèces disponibles et donc les métabolites formés. La forme alkényle en 18:1n-9 n'est peut-être pas favorable dans la synthèse des plasmalogènes, mais demeure peut-être plus importante dans les espèces étherlipides non-plasmalogènes (chaîne alkyle). La réponse à cette question pourra être apportée par l'analyse des profils en alkylglycérols des tissus hépatiques et complétée par l'analyse des autres organes d'intérêt.

Concernant, le cerveau, organe riche en plasmalogènes, plusieurs auteurs montrent que l'incorporation des Alkyl-Gro à chaîne courte à l'issue d'une supplémentation alimentaire ou d'une incorporation dans les croquettes est très faible dans le cerveau chez des rongeurs (rats et souris en croissance) (Das et al, 1988 ; Brites et al, 2011). Cet effet n'est cependant pas étonnant puisque le métabolisme des phospholipides engage en général des chaînes acyles, alkyles ou alkényles longues ou très longues. Par ailleurs, on sait que les Alkyl-Gro à chaîne courte administré dans la carotide interne par voie intra-artérielle passent à travers la barrière hémato-encéphalique, puisqu'ils sont utilisés comme vecteurs pour augmenter l'administration de divers médicaments chimiothérapeutiques au cerveau (Erdlenbruch et al, 2000). Ainsi, la supplémentation en alkyl-Gro permettrait de renforcer les taux de plasmalogènes dans le cerveau probablement grâce à l'action d'une modulation enzymatique. L'étude de la plamanyléthanolamine désaturase (enzyme spécifique permettant la conversion d'étherlipide en plasmalogène) permettrait d'analyser ce phénomène.

L'ensemble de ces résultats supposent que l'apport alimentaire d'alkyl-Gro permet de renforcer la synthèse d'étherlipides et notamment de plasmalogènes, dans divers organes.



Pour rappel, les plasmalogènes sont des étherphospholipides porteurs d'acide arachidonique (ARA) et surtout de DHA (Farooqui et al, 2000). Ainsi, l'hypothèse d'un enrichissement en DHA suppose peut-être en parallèle un enrichissement en plasmalogènes, dans les organes comme cerveau et cœur. En effet, il a été mis en évidence que le statut en plasmalogènes d'une cellule peut influencer les niveaux de certains AGPI particulièrement en DHA. L'étude de Gaposchkin et al, (1999) a permis de démontrer qu'une carence en plasmalogène contribue à la diminution des taux de DHA dans des lignées cellulaires de type macrophage (qui sont défectueux dans la biosynthèse de plasmalogène). À l'issue d'une supplémentation en étherlipides (1-O-hexadécyl-*sn*-glycérol, analogue alkylglycérols) sur les mêmes lignées cellulaires cultivées pendant 48 h, le taux de plasmalogènes a été restauré ce qui s'est également traduit par une augmentation de DHA. Ainsi favoriser l'accrétion du DHA dans un organe tel que le cerveau sous-entendrait d'augmenter en parallèle les lipides spécifiquement porteurs de ces AG dans les organes en question.

D'un point de vue métabolique, si la supplémentation en alkylglycérols tend à favoriser les teneurs en AGPI à longue chaîne n-3 (DHA) et en ARA dans le foie, il semble intéressant de comprendre l'effet sur les enzymes impliquées. Les analyses hépatiques montrent que l'expression génétique de *Fads1* est régulée positivement chez les rates supplémentées en alkyl-Gro. La  $\Delta 5$ -désaturase codée par *Fads1* est une enzyme qui permet l'introduction d'une double liaison supplémentaire dans les AGPI existants. Elle intervient dans la conversion de l'acide dihomogamma-linolénique (20:3n-6) en ARA (20:4n-6) ou bien celle de l'acide eicosatétraénoïque (20:4n-3) en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) (Park, 2018). Ainsi, la voie des AGPI des n-6 et n-3 semble être favorisée par l'apport d'alkyl-Gro à cette étape ; le régime enrichi en alkyl-Gro tendrait à favoriser la synthèse spécifique d'ARA et de DHA. L'effet n'est observé à ce stade du travail que dans le foie et reste minime, mais la supplémentation lipidique ne concernant pas un acide gras, l'effet sur le métabolisme des acides gras reste remarquable.

Ces tendances observées dans le foie chez les mères supplémentées en Alkyl-Gro, laisse envisager également de retrouver un enrichissement en ARA et en DHA dans le lait maternel. En effet, le lait maternel contient déjà de l'ARA et du DHA permettant de couvrir les besoins nutritionnels des petits. C'est d'ailleurs pour cette raison que les laits infantiles sont enrichis en ARA et DHA en lien avec les recommandations de l'ANSES. En effet, l'ARA contenu dans le lait est le principal précurseur des eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) qui interviennent en particulier dans le développement neurologique et immunologique chez le nourrisson (Hadley and al, 2016). Quant au DHA, il est un constituant structurel majeur des membranes spécifiquement dans le système nerveux central. Il contribue à la transmission synaptique et intervient également dans le développement et le fonctionnement cognitif et rétinien (Lauritzen et al, 2015). Ainsi, compte tenu de l'importance nutritionnelle de ces deux AG dans les laits (maternels et donc infantiles) et d'après les données de notre étude, un enrichissement de ces AG dans le lait maternel permettrait de favoriser le développement des petits.

L'ensemble de ces résultats tend à confirmer l'hypothèse qu'un apport alimentaire d'alkyl-Gro permettrait de renforcer la synthèse d'étherlipides et notamment de plasmalogènes et par conséquent celle des AG constitutifs de ces lipides complexes, tel que l'ARA et le DHA.



Dans un deuxième temps, durant ce projet, il était initialement prévu d'étudier si une augmentation des teneurs en étherlipides dans le lait était transmise aux petits durant la période de lactation et si cela avait un impact sur le métabolisme des petits. Bien que l'étude concernant l'analyse du lait maternel n'ait pas pu être réalisée, on suppose que le lait a bien été enrichi en étherlipides suite à la supplémentation alimentaire en alkyl-Gro, sur la base de précédentes études (Oh et al, 1994 ; Mitre et al, 2005 et Yu et al, 2019). En effet, il avait été constaté un enrichissement du lait maternel en étherlipides avec principalement les alcools chimylique(16:0), batylique (18:0) et sélachylique (18:1), tels que présents dans le régime administré (Oh et al, 1994).

À l'heure actuelle, on ne sait pas encore si le régime maternel enrichi en alkyl-Gro induit des changements sur le développement des petits via l'allaitement. Cependant, il a été observé que l'apport en Alkyl-Gro chez les mères réduit le poids de leurs petits après 3 semaines d'allaitement. Cette observation avait également été observée dans une précédente étude (Oh et al 1994). Par ailleurs, l'état de santé des petits ne semblait pas visuellement affecté, ils n'étaient pas chétifs malgré cette masse corporelle inférieure. La supplémentation en Alkyl-Gro pourrait avoir un effet sur le tissu adipeux qui se traduirait par ces différences de poids. En effet, il a récemment été démontré que les Alkyl-Gro du lait maternel sont précurseurs de médiateurs lipidiques qui modulent le développement du tissu adipeux (Yu et al,2019). Le manque d'apport en alkyl-Gro entraîne une perte prématurée du tissu adipeux beige et augmente l'accumulation de tissus de réserve lipidique chez les petits (Yu et al, 2019). Il a également été observé que des doses élevées d'Alkyl-Gro diminuaient le poids chez des souris nourries avec un régime riche en calories (Zhang et al, 2013). Ces différents résultats sont en accord avec nos observations qui démontrent qu'un régime en Alkyl-Gro a un impact sur le poids des petits. La consommation alimentaire des petits n'a toutefois pas pu être déterminée en raison de leur alimentation unique en lait maternel puisque la période d'étude concerne l'avant-sevrage des petits qui a lieu sur 3 semaines.

Partant de notre précédent constat chez les rates allaitantes, il est envisagé d'observer une modulation du métabolisme de lipides et notamment en plasmalogènes chez les petits à l'issue de l'allaitement dans certains organes tel que le cerveau. Ces plasmalogènes, ou des précurseurs métaboliques, seraient véhiculés par le lait maternel permettant ainsi aux petits une optimisation de leur apport en étherlipides, mais aussi peut-être en DHA. Ainsi, cet enrichissement en plasmalogènes et en DHA favoriserait le développement notamment cérébral des petits (Lauritzen et al, 2015). Par ailleurs, le métabolisme des lipides peut également être influencé par l'âge (Pédrono et 2015) et par le sexe (Ranković et al, 2017). Ces paramètres devront ainsi être pris en compte pour la suite des expériences.

Pour conclure, cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'un régime alimentaire supplémenté en Alkyl-Gro a un impact sur le métabolisme lipidique en modulant la composition des acides gras et des aldéhydes gras (dérivés des plasmalogènes) chez les rates allaitantes. Cela est une première approche sur l'étude des étherlipides qui renforce l'idée que des précurseurs Alkyl-Gro apportés par l'alimentation peuvent être métabolisés en dérivés étherlipidiques et ainsi améliorer les teneurs en étherlipides dans l'organisme. Des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer les conséquences sur les petits des rates exposées à un régime maternel en Alkyl-Gro.

## V – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anadón A, Martínez MA, Ares I, Ramos E, Señoráns FJ, Reglero G and Torres C. (2010). Acute and Repeated Dose (28 Days) Oral Safety Studies of an Alkoxyglycerol Extract from Shark Liver Oil in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3):2040-6.
- Anses (2013). AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à l'utilisation de boissons autres que le lait maternel et les substituts du lait maternel dans l'alimentation des nourrissons de la naissance à 1 an, signé le 5 février 2013, saisine n° 2011-SA-0261.
- Bandi ZL, Mangold HK, Hølmer G and Aaes-Jørgensen E (1971). The alkyl and alk-1-enyl glycerols in the liver of rats fed long-chain alcohols or alkyl glycerols. *FEBS Letters*; 12(4):217-220.
- Bergan J, Skotland T, Lingelem ABD, Simm R, Spilsberg B, Lindbäck T, Sylvänne T, Simolin H, Ekroos K and Sandvig K (2014). The ether lipid precursor hexadecylglycerol protects against Shiga toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), 4285-300.
- Bergstrom S and Blomstrand R (1956). The intestinal absorption and metabolism of chimyl alcohol in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 38(2), 166-72.
- Blank ML, Cress EA, Smith ZL, Snyder F (1999). Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition. *Lipids*, 26(2):166-9.
- Blomstrand R (1959). Digestion, Absorption and metabolism of Chiinyl Alcohol Fed as Free Alcohol or as Alkosydidlyceride. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 102, 662-665.
- Blomstrand R and Ahrens EH (1959). Absorption of Chiniyl Alcohol in Man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 100(4), 802-805.
- Braverman NE and Moser AB (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(9), 1442-52.
- Brites P, Ferreira AS, da Silva TF, Sousa VF, Malheiro AR, Duran M, Waterham HR, Baes M and Wanders RJ (2011). Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. *PLoS One*, 6(12):e28539.
- Brohult A and Holmberg J (1954). Alkoxyglycerols in the treatment of leukopaenia caused by irradiation. *Nature*, 174(4441), 1102-3.
- Brohult, A (1960). Alkoxyglycerols as Growth-stimulating Substances. *Nature*, 188, 591-592.
- Chorostowska-Wynimko J, Krotkiewski M, Radomska-Leśniewska D, Sokolnicka I and Skopińska-Rózewska E (2001). The synergistic effect of lactic acid bacteria and alkylglycerols on humoral immunity in mice. *International Journal of Tissue Reactions*, 23(3), 81-7.
- Cheminade C, Gautier V, Hichami A, Allaupe P, Le Lannou D and Legrand AB (2002). 1-O-Alkylglycerols Improve Boar Sperm Motility and Fertility. *Biology of Reproduction*, 66(2), 421-8.
- Das AK and Hajra AK (1988). High incorporation of dietary 1-O-heptadecyl glycerol into tissue plasmalogens of young rats. *FEBS Letters*;227(2):187-90.
- Das A, Holmes R, Wilson G and Hajra A (1992). Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. *Lipids*, 27(6), 401-5.
- Dean JM and Lodhi IJ (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein & Cell*, 9(2), 196-206.
- Deniau AL, Mosset P, Pédrone F, Mitre R, Le Bot D and Legrand AB (2010). Multiple Beneficial Health Effects of Natural Alkylglycerols from Shark Liver Oil. *Marine Drugs*, 8(7), 2175-84.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H and Lakomek M (2000). Transient and Controllable Opening of the Blood-Brain Barrier to Cytostatic and Antibiotic Agents by Alkylglycerols in Rats. *Experimental Brain Research*, 135(3):417-22.
- Folch J, Lees M and Sloanes Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Farooqui AA and Horrocks LA (2000). Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *Journal of molecular neuroscience*, 16(2-3):263-72.
- Gaposchkin DP and Zoeller RA (1999). Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *Journal of lipid research*, 40(3):495-503.
- Hadley KB, Ryan AS, Forsyth S, Gautier S and Salem Jr N (2016). The Essentiality of Arachidonic Acid in Infant Development. *Nutrients*, 12;8(4):216.
- Hallgren B, Niklasson A, Stallberg G and Thorin H (1974). On the occurrence of 1-Oalkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl) glycerols in human colostrum, human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma. *Acta Chemica Scandinavica*, 28(9), 1029-34.
- Heid HW and Keenan TW (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3), 245-58.
- Hossain JS, Tajima A, Kotoura S and Katafuchi T (2018). Oral ingestion of plasmalogens can attenuate the LPS-induced memory loss and microglial activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(4), 1033-1039.

- Honsho M, Asaoku S and Fujiki Y (2010). Posttranslational regulation of fatty acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 19;285(12):8537-42.
- Innis SM (2007). Human Milk: Maternal Dietary Lipids and Infant Development. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(3):397-404.
- Kumar R, Weintraub ST and Hanahan DJ (1983). Differential susceptibility of mono- and di-O-alkyl ether phosphoglycerides to acetolysis. *Journal of lipid Research*, 24(7):930-7.
- Léonil J, Michalski MC and Martin P (2013). Les structures supramoléculaires du lait : structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras. *Inra Productions Animales*, 26(2), 129-144.
- Lewkowicz P, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz N and Tchorzewski H (2005). Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function. *Polski Merkurusz Lekarski Medpress*, 18(108), 686-92.
- Linman JW, Bethell FH and Long MJ (1958). The erythropoietic stimulatory activity of batyl alcohol. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 52(4), 596-604.
- Marigny K, Pedrono F, Martin-Chouly CA, Youmine H, Saiag B and Legrand AB (2002). Modulation of endothelial permeability by 1-O-alkylglycerols. *Acta Physiologica Scandinavica*, 176(4), 263-8.
- Martin-Agnoux A, Antignac JP, Boquien CY, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, Darmaun D, Parnet P and Alexandre-Gouabau MC (2015). Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(7), 784-95.
- Mitre R, Cheminade C, Allaume P, Legrand P and Legrand AB (2004). Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology*, 62(8), 1557-66
- Mitre R, Etienne M, Martinais S, Salmon H, Allaume P, Legrand P and Legrand AB (2005). Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation. *British Journal of Nutrition*, 94(5), 753-62.
- Oberg TS, Ward RE, Steele JL and Broadbent JR (2012). Identification of Plasmalogens in the Cytoplasmic Membrane of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3):880-4.
- Oh SY and Jadhav LS (1994). Effects of Dietary Alkylglycerols in Lactating Rats on Immune Responses in Pups. *Pediatric research*, 36(3), 300-5.
- Park WJ (2018). Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism, Chapter 5 - The Biochemistry and Regulation of Fatty Acid Desaturases in Animals. *American Oil Chemists' Society*, 87-100.
- Pédrone F, Martin B, Leduc C, Le Lan J, Saiag B, Legrand P, Moulinoux JP and Legrand AB (2004). Natural Alkylglycerols Restrain Growth and Metastasis of Grafted Tumors in Mice. *Nutrition and Cancer*, 48(1), 64-9.
- Pédrone F, Saiag B, Moulinoux JP and Legrand AB (2007). 1-O-Alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation in vitro. *Cancer Letters*, 251(2), 317-22.
- Pédrone F, Boulier-Monthéan N, Catheline D and Legrand P (2015). Impact of a Standard Rodent Chow Diet on Tissue n-6 Fatty Acids,  $\Delta 9$ -Desaturation Index, and Plasmalogen Mass in Rats Fed for One Year. *Lipids*, 50(11):1069-82.
- Pinault M, Guimaraes C, Couthon H, Thibonnet J, Fontaine D, Chantôme A, Chevalier S, Besson P, Jaffrès PA and Vandier C (2018). Synthesis of Alkyl-Glycerolipids Standards for Gas Chromatography Analysis: Application for Chimera and Shark Liver Oils. *Marine Drugs*, 16(4). pii: E101.
- Ranković S, Popović T, Martačić JD, Petrović S, Tomić M, Ignjatović Đ, Tovilović-Kovačević G and Glibetić M (2017). Liver phospholipids fatty acids composition in response to different types of diets in rats of both sexes. *Lipids and health in disease*, 16(1):94.
- Rizzo WB, Heinz E, Simon M, Craft DA (2000). Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1535:1-9.
- Saab S, Mazzocco J, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, Bretillon L and Acar N (2014). Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. *Biochimie*, 107 Pt A, 58-65.
- Snyder F. (1999). The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436 (3), 265-278.
- Watschinger K and Werner ER (2013). Alkylglycerol monooxygenase. *IUBMB Life*, 65(4):366-72.
- Weber N (1985). Metabolism of orally administered rac-1-0-[I<sup>14</sup> C]dodecylglycerol and nutritional effects of dietary rac-1-0-dodecylglycerol in mice. *Journal of Lipid Research*, 26(12):1412-20.
- Yu H, Dilbaz S, Coßmann J, Hoang AC, Diedrich V, Herwig A, Harauma A, Hoshi Y, Moriguchi T, Landgraf K, Körner A, Lucas C, Brodesser S, Balogh L, Thuróczy J, Karemure G, Kuefner MS, Park EA, Rapp C, Travers JB and Röszer T (2019). Breast milk alkylglycerols sustain beige adipocytes through adipose tissue macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 129(6), 2485-2499.
- Zhang M, Sun S, Tang N, Cai W and Qian L (2013). Oral Administration of Alkylglycerols Differentially Modulates High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 834027.

**Tableau 2 : Procédure du protocole de qPCR**

	<b>Taqman®</b>	<b>Sybergreen®</b>
ADNc	2.5 µL (dilué au 1/10)	5 µL (dilué au 1/10)
Composition du mix à préparer	Taqman ® 10 µL Amorce 5' (500 nmol/L) 2 µL Amorce 3' (500 nmol/L) 2 µL Sonde (250 nmol/L) 1 µL Eau (qsp 17,5µl) 2,5 µL	SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal 10µL Amorce 5' (200 nmol/L) 0,8 µL Amorce 3' (200 nmol/L) 0,8 µL Fluorescein 0,02 µL Eau (qsp 15 µl) 3,38 µL
Composition du KIT	Takyon™ DNA polymerase, MgCl <sub>2</sub> (5.5mM final concentration), dNTPs, Stabilizers, ADN glycosylase d'uracile (UDG)	SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal contient la thermostart ADN polymerase, le colorant fluorescent SYBR® GreenER™, MgCl <sub>2</sub> , dNTP (avec dUTP au lieu de dTTP) et de l'ADN glycosylase d'uracile (UDG)
Paramètres de thermocycle	50°C pendant 2 minutes (1), 95° C pendant 3 minutes (2), 95° C pendant 10 secondes (3) 60° C pendant 55 secondes (4)	50° C pendant 2 minutes (1) 95° C pendant 8 minutes, 30 secondes (2) 40 cycles à 95° C pendant 15 secondes (3) 60° C pendant 60 secondes (4)

*dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate ; dUTP : deoxyuridine triphosphate ; dTTP : désoxy thymine tri-phosphate ; UDG : uracile-ADN glycosylase ; q.s.p. : quantité suffisante pour.*

*(1) : incubation l'UDG, (2) : activation de la polymérase et inactivation l'UDG,*

*(3): dénaturation de l'ADN ; (4) : Hybridation des amorces puis élongation des brins d'ADN (polymérisation).*