



**HAL**  
open science

# Etude comparative des effets biologiques des acides gras polyinsaturés n-3 (ALA, EPA, DUA) : importance dans la prévention de l'obésité et du syndrome métabolique

Alexandre A. Pinel

## ► To cite this version:

Alexandre A. Pinel. Etude comparative des effets biologiques des acides gras polyinsaturés n-3 (ALA, EPA, DUA) : importance dans la prévention de l'obésité et du syndrome métabolique. Alimentation et Nutrition. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT: . tel-02801592

**HAL Id: tel-02801592**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02801592>**

Submitted on 5 Jun 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

Université Blaise-Pascal  
Année 2015

Université d'Auvergne  
N° d'ordre

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

## **Thèse**

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de Docteur  
(Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialité : Nutrition Humaine

Soutenue le 18 Décembre 2015

**Alexandre Pinel**

---

# Etude comparative des effets biologiques des acides gras polyinsaturés oméga-3 (ALA, EPA, DHA) : Importance dans la prévention de l'obésité et du syndrome métabolique

---

### **Président :**

M. Claude Beaudoin, Professeur d'Université, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

### **Rapporteurs :**

M. Jean-Michel Lecerf, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Institut Pasteur,  
Lille

M<sup>me</sup> Annie Quignard-Boulangé, Directrice de Recherche émérite INSERM,  
AgroParisTech, Paris

### **Examineurs :**

M. Jérôme Bellenger, Maître de Conférences Universitaire, Université de Bourgogne,  
Dijon

M<sup>elle</sup> Cécile Gladine, Chargée de Recherche INRA, UMR1019, Saint-Genès-Champanelle  
M. Alain Huertas, Directeur Scientifique Lesieur, Asnière-sur-Seine

### **Directrice de thèse :**

M<sup>me</sup> Béatrice Morio, Directrice de Recherche INRA, Institut CarMeN, Lyon

### **Co-directeur de thèse :**

M. Frédéric Capel, Chargé de Recherche INRA, UMR1019, Clermont-Ferrand

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)  
Centre de Recherche Auvergne Rhône-Alpes, Unité de Nutrition Humaine (UNH) UMR1019



## Remerciements

Chaque moment passé avec vous, qu'il soit infime ou non, a fait que mon expérience de thèse a été celle que j'ai vécue et pas une autre. Ces longues pages vous sont attribuées.

Je souhaite remercier Alain Huertas et Béatrice Morio pour avoir cru en moi et m'avoir permis de travailler sur ce projet qui m'a tout particulièrement plu. Merci de m'avoir offert ces trois années de travail dans des conditions plus qu'optimales. Je remercie également Sylvie Breton, Amélie Dhaussy et Philippe Guesnet pour leurs conseils et leur implication lors de mes comités de thèse.

Je remercie mesdames et messieurs les membres du jury, Jérôme Bellenger, Jean-Michel Lecerf, Cécile Gladine, Alain Huertas, et Annie Quignard-Boulangé d'avoir répondu présents pour cette occasion et pour leurs suggestions et critiques vis-à-vis de mon travail. Merci à monsieur Claude Beaudoin d'avoir accepté l'invitation à présider ma soutenance. J'espère que celle-ci sera à la hauteur des attentes de chacun. Merci également aux examinateurs pour leur présence à la soutenance et le temps qu'ils auront accordé à mon travail.

J'adresse un grand MERCI à mes deux encadrants, Béatrice Morio et Frédéric Capel. Vous avez toujours été présents pour me conseiller, me soutenir et me guider. Mais vous m'avez aussi laissé une grande liberté d'action. Merci pour toute l'énergie positive que vous m'avez insufflée.

Je remercie également mes nombreux collaborateurs qui ont eu une importance capitale dans la mise en œuvre du projet, à commencer par les membres de l'équipe « Mitochondries, Bioénergétique, Métabolisme et signalisation » de l'Institut Cochin qui m'ont transmis les connaissances nécessaires à l'élaboration d'une technique de radioactivité sur cellules en culture. Je remercie plus particulièrement Catherine et Carina qui nous ont chaleureusement accueilli (Jean-Paul et moi) dans leurs locaux à Paris. Merci également à Véronique que je n'ai pas eu l'occasion de rencontrer mais qui nous a apporté beaucoup de soutien par messagerie électronique pour optimiser notre protocole.

Dans ce même cadre expérimentale, je voulais aussi remercier Isabelle Auzeloux et Marianne Jarzaguet pour leur contribution à la bonne gestion des déchets radioactifs.

J'adresse mes remerciements aux nombreuses personnes travaillant à l'animalerie de Theix qui ont été d'une aide précieuse pour le bon déroulement des deux expérimentations animales que nous avons entrepris. Merci d'avoir pris soin de nos animaux et de nous avoir aidés dans la terrible épreuve de l'abattage. Et merci pour votre humour !

Merci également à Corinne Pouyet et Céline Bobby pour leur aide dans l'exploitation des échantillons en lipidomique et en transcriptomique.

Mes remerciements vont aussi à chacun des membres de l'équipe CHLEO, anciens (Jean-Michel, Brigitte, Clémence, Sarah) et actuels (Luc, Chrystèle, Elodie, Corinne, Jean



Louis). Vos apports scientifiques et techniques m'ont été bénéfiques. Votre compagnie lors des repas et pauses gourmandes m'a toujours été très agréable.

Non, je ne t'ai pas oublié Jean Paul ! Je souhaitais te mettre un peu à part pour le lien plus prononcé que j'ai pu avoir avec toi durant ces 3 années. Tu m'as beaucoup épaulé en début de thèse. Nous avons beaucoup réfléchi ensemble à la mise au point de la manip de radioactivité et nous avons à ces occasions partagé des moments de rire, de déceptions et de contentements. Tu m'as fait rencontrer et tu m'as permis de discuter avec bon nombre de gens appréciables. Lors de « nos petits tours » dans les couloirs de Theix, j'ai pu assister à des moments mémorables (ou pas) correspondants à tes blagues et tes proverbes divers et variés. Bref, une bonne bouffée d'oxygène !

Je souhaite également remercier les membres de « Nutrim bas » (Yves, Stéphane, Christelle, Jérôme, Christophe, Véronique, Alexandre, Kristel) pour leur ouverture d'esprit et les quelques conseils prodigués lorsque j'avais besoin. Merci aussi d'avoir partagé votre bonne humeur. Vous avez tous été la source d'au moins un moment de décompression nécessaire à une bonne ambiance de travail.

Mon travail a également été l'occasion de m'essayer à la transmission de mes connaissances et mon expérience à des stagiaires de passage : Julie, Marlène, Aude et Claire. Je les remercie pour leur écoute, pour m'avoir pris au sérieux et pour m'avoir conforté dans l'idée que la transmission du savoir est capitale pour faire de quelqu'un un meilleur chercheur.

Je fais maintenant un détour par Theix (un peu comme les mails du labo) pour remercier les personnes travaillant au 4ème étage du bloc III : Hervé, Catherine, Vanessa, Joëlle, Anthony, Sylvie, Ludivine et Romain. Vous avez été de très bons compagnons de tablée lors de mes séjours sur Theix. Je remercie Hervé pour son efficacité dans la réservation d'hôtels et de billet de train lors de mes diverses demandes de déplacements. Merci à Catherine pour ses réponses dans le domaine des ressources humaines et enfin, merci à Joëlle pour sa bienveillance et sa gentillesse.

De retour au LNH pour m'attarder sur mes collègues de bureau. Lors de ma première année, j'ai pu faire la connaissance d'Aurélie, avec qui je n'ai que très peu discuté, car je mets toujours un (long) moment avant de me mettre à l'aise. Tu m'as toujours aidé quand il fallait, à m'apporter des éléments de compréhension et à me transmettre ton expérience. Tu étais aussi là, Audrey et je dois avouer que j'ai vraiment commencé à te connaître plus tard, lors de notre déménagement dans « la pouponnière ». Tu as des traits de caractères qui me ressemblent, à savoir l'esprit taquin et le sens de l'exacitude. Nous avons échangé de belles joutes qui m'ont particulièrement ravi (oui ça défoule de balancer des vannes). Sont arrivés plus tard Carla et Laurie, deux autres personnes particulièrement importantes dans ma vie quotidienne au laboratoire. Nous avons vécu des moments de complicité, de joie et de suspense, propices au développement d'une amitié unique. Je vous souhaite un bel avenir et je serai ravi de vous recroiser dans les prochaines années. Nous repenserons à ces années de « folie » dans notre bureau, marqués de « points » sur bon nombre de sujets. J'ai été incisif à de

nombreuses reprises et j'espère ne jamais vous avoir blessées, n'ayant aucune arrière-pensée à votre égard.

Je pense que c'est ici le moment propice pour remercier Omar, mon collègue informaticien, qui a partagé des « moments geek » avec moi, mais aussi des moments plus personnels. Merci pour tes conseils informatiques et pour tes tests à répétitions sur mes connaissances en matière de voitures (ça m'a toujours fait rire quand je te voyais débarquer avec ton smartphone en disant « petit test ! »).

Un petit mot ici pour mes collègues thésards que j'ai rencontré à l'occasion des journées portes ouvertes et de l'exposition universelle de Milan. J'ai aimé votre décontraction, partager mon ressenti et écouter votre point de vue. Vous avez, vous aussi, participé à ma réussite, à votre manière.

Je sors du cadre du travail pour remercier mes amis, plus ou moins anciens. Merci à Laura, Aner et Peg pour ces sorties gastronomiques ou sportives toujours dans une ambiance détendue qui me plaît tant. Je suis ravi d'avoir gardé contact avec vous depuis le lycée voire même le collège pour toi Laura. Merci à Mémé, Tom et Emeline pour nos repas à la fac, moments d'échanges sur nos vies personnelles qui permet d'avoir un avis extérieur et objectif sur nos choix respectifs. Votre présence à mes côtés pendant de nombreuses années universitaires a été un plaisir. Merci également à Antoine, un pote en or, qui m'a toujours épaté par sa spontanéité et qui m'a accompagné au cinéma voir des films de qualité variable. Merci à d'autres que je vois beaucoup moins mais qui ont compté et compteront toujours, comme toi Hélène, ou encore toi Sophie.

Partons maintenant aux origines de ma vie : mes parents et ma famille. J'ai toujours eu beaucoup d'attachements pour vous, père, mère, beau-père et frères et sœurs. J'ai pu me construire et arriver là où j'en suis aujourd'hui grâce à vous tous. Vous avez été des exemples, et des soutiens inestimables. J'ai particulièrement apprécié les week-ends où nous nous sommes retrouvés et qui m'ont permis de m'aérer l'esprit et de me replonger dans l'enfance un court instant. Cette année est l'année de tes 50 ans maman et je souhaitais te dédier mon travail. J'espère que tu seras épatée et fière de ce que j'ai accompli pas seulement pour moi mais aussi pour toi, pour te prouver que tu nous as donné toutes les armes nécessaires face aux épreuves de la vie. C'est aussi à toi, papa, que je dédie ce travail. Tu t'es toujours préoccupé du devenir de tes enfants dans les moments difficiles et je nous souhaite de nombreux autres moments heureux en famille. Un gros bisou à tous !

50 ans de ma mère mais aussi 5 ans que nous sommes mariés. 5 ans que tu m'accompagnes jours et nuits, que tu me soutiens et que tu prends soin de moi. Je n'ai pas toujours été tendre lors de ces trois années de thèses, éprouvantes à certains moments pour moi, mais également pour toi. Heureusement, ta présence, ton écoute et nos nombreux moments de complicité et d'évasion m'ont permis de tenir le choc. Je nous souhaite un avenir aussi radieux que les 5 dernières années passées ensemble et je pense que sans toi je n'aurais pas eu autant de courage et de force pour mener à bien cette thèse. Je ne sais pas si c'est une

citation déjà existante mais je tenais à dire qu' « il y a deux femmes importantes dans une vie : celle qui vous la donne et celle avec qui vous la partagez ». Je crois avoir eu beaucoup de chance sur ces points.

Ceci sera mes derniers mots avant de parler de ce qui nous intéresse plus particulièrement ici : le projet de thèse. J'ai donc plutôt bien vécu cette expérience grâce à tout mon entourage (amis, famille, collègues). Souvent, on se demande si on referait les mêmes choix s'ils se présentaient à nous une seconde fois. Et je pense que grâce à vous tous, je le referai sans hésitations. Donc merci encore. Et pardonnez-moi si j'ai omis quelqu'un dans cette section d'intimité.

# Liste des Publications et Communications

## Publications

Pinel, A., Pitois, E., Rigaudière, J-P., Jouve, C., De Saint-Vincent, S., Laillet, B., Montaurier C., Huertas, A., Morio B. and Capel F. (**en révision**) EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a Western Diet. Soumis à Journal of Lipid Research. IF à 2 ans : 4.421. Notoriété à 2 ans : excellente.

Pinel, A., Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pouyet, C., Pujos, E., Malpuech-Brugère, C., Prip-Buus, C., Morio, B., Capel, F. (**accepté**) N-3PUFA Differentially Modulate Palmitate-Induced Lipotoxicity Through Alterations of Its Metabolism in C2C12 Muscle Cells. Soumis à Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. IF à 2 ans : 4.495. Notoriété à 2 ans : correcte.

Pinel, A., Morio, B., Capel, F. (**2014**). n-3 polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: implication for the prevention of type 2 diabetes. Journal of Physiology and Biochemistry. IF à 2 ans: 2.496. Notoriété à 2 ans correcte.

## Communications orales

Pinel, A., Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pouyet, C., Pujos, E., Malpuech-Brugère, C., Lenoir, V., Prip-Buus, C, Morio, B, Capel, F. ALA, EPA and DHA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism and storage in C12C12 muscle cells. 12<sup>th</sup> international Eurofed Lipid Congress. Montpellier, le 16 Septembre 2014.

Pinel, A., Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pouyet, C., Pujos, E., Malpuech-Brugère, C., Lenoir, V., Prip-Buus, C, Morio, B, Capel, F. ALA, EPA and DHA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism and storage in C12C12 muscle cells. Journée de l'institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Lyon, le 11 Juin 2014.

## Communications affichées

Pinel, A., Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pitois, E., Jouve, C., Capel, F., Morio, B. L'EPA prévient l'insulino-résistance et l'intolérance au glucose chez la souris sous régime hyperlipidique et hypersucré. Journée scientifique du CRNH Auvergne, 26 Octobre 2015.

Pinel, A, Capel, F., Morio, B. Role of p38MAPK in palmitate-induced inflammation in C2C12 muscle cells. 12<sup>th</sup> EUROPEAN NUTRITION CONFERENCE, FENS, Berlin, 2015, 20-23 Octobre 2015.

Pinel, A, Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pitois, E., Jouve, C., Capel, F., Morio, B. EPA prevents adipose tissue expansion in mice fed a high fat-high sucrose diet. 12<sup>th</sup> EUROPEAN NUTRITION CONFERENCE, FENS, Berlin, 2015, 20-23 Octobre 2015.

Pinel, A, Rigaudière, J-P., Laillet, B., Pitois, E., Jouve, C., Capel, F., Morio, B. EPA prevents insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high fat-high sucrose diet. 12<sup>th</sup> EUROPEAN NUTRITION CONFERENCE, FENS, Berlin, 2015, 20-23 Octobre 2015.

Pinel, A., Rigaudière, J-P., Laillet, L., Pouyet, C., Malpuech-Brugère, C., Lenoir, V., Prip-Buus, C., Morio, B., Capel, F. Oméga-3, Obésité et Syndrome Métabolique : les acides gras omega-3 à longue chaîne réduisent la lipotoxicité induite par le palmitate en modifiant son métabolisme et son stockage dans la cellule musculaire c2c12. Journées Francophone de Nutrition. Bruxelles, les 10, 11 et 12 Décembre 2014.

Pinel, A, Guélon, B., Rigaudière, J-P., Laillet, B., Malpuech-Brugère, C., Morio, B., Capel, F. Oméga-3, Obésité et Syndrome Métabolique : Effets comparatifs des acides gras omega-3 sur la sensibilité musculaire à l'insuline dans un contexte lipotoxique. Journée du Centre de Recherche en Nutrition Humaine. Clermont-Ferrand, le 28 Novembre 2013.

## Résumé

L'obésité est un état physiopathologique d'origine multifactorielle caractérisé par une accumulation excessive de tissu adipeux (TA). Elle est associée à une augmentation du risque de développer une insulino-résistance (IR), un syndrome métabolique et, à terme, un diabète de type 2. L'altération des fonctions du TA au cours de l'obésité joue un rôle central dans l'apparition des troubles métaboliques, tels qu'une accumulation ectopique de graisse et une IR périphérique, notamment dans le muscle. Dans ce contexte, la qualité des apports énergétiques et plus précisément en lipides pourrait jouer un rôle important dans l'adaptation des tissus au cours de l'obésité. Ainsi le palmitate (PAL), un acide gras saturé (AGS) est pro-lipogénique, pro-inflammatoire et lipotoxique, ce qui favorise l'apparition d'une IR. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 ( $\omega$ 3) auraient des effets antagonistes au PAL et donc potentiellement protecteurs vis-à-vis des perturbations métaboliques associées à l'obésité. Parmi les  $\omega$ 3, les effets spécifiques des trois principaux acides gras alimentaires, les acides alpha-linolénique (ALA), éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), ont été très peu décrits.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier les effets propres de l'ALA, de l'EPA et du DHA sur les altérations métaboliques induites en situation d'obésité. Des explorations mécanistiques ont été réalisées sur les cellules musculaires C2C12 dans lesquelles l'IR a été induite par le PAL et sur des adipocytes 3T3-L1 pour étudier l'impact des AGPI  $\omega$ 3 sur la différenciation adipocytaire. Les effets des AGPI  $\omega$ 3 ont ensuite été étudiés *in vivo*, en supplémentant des souris C57BL/6 sauvages ou déficientes en leptine (*ob/ob*) lors de la consommation d'un régime obésogène riche en lipides et en sucrose (mimant un régime occidental).

Dans les cellules musculaires C2C12, les trois  $\omega$ 3 co-incubés avec le PAL ont induit de façon comparable une diminution du contenu en composés lipotoxiques et une amélioration de la captation du glucose, mais seuls l'EPA et le DHA ont restauré la  $\beta$ -oxydation du PAL et l'activation de la voie de signalisation de l'insuline. De plus, l'EPA et le DHA ont eu un effet protecteur supérieur à l'ALA vis-à-vis de l'inflammation induite par le PAL. Dans le modèle *in vivo*, seul la supplémentation en EPA a amélioré l'homéostasie du glucose en comparaison avec les suppléments en ALA et en DHA. Alors que l'EPA a réduit la prise de masse grasse, le DHA a induit une hypertrophie des cellules adipeuses associée à une augmentation de la sécrétion de leptine et une baisse de la sécrétion d'adiponectine. Dans un modèle d'adipocytes 3T3-L1 en culture, le DHA a accéléré la différenciation des préadipocytes en comparaison avec l'ALA et l'EPA, pouvant expliquer son effet hypertrophique *in vivo*.

En conclusion et dans nos conditions expérimentales, les  $\omega$ 3 ALA, EPA et DHA ont bien des effets communs sur le métabolisme lipidique et glucidique *in vitro* mais également des effets propres qui ont permis de montrer qu'une supplémentation nutritionnelle en EPA serait plus intéressante pour limiter l'IR *in vivo* par rapport au DHA ou à l'ALA. Le DHA a quant à lui favorisé l'hypertrophie du TA, perturbant ainsi la sécrétion des adipokines participant à la régulation de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, comme le muscle squelettique.

Mots clés : acides gras oméga-3, résistance à l'insuline, obésité, syndrome métabolique

## Abstract

Obesity is characterized by an excess of adipose tissue (AT) mass and may be caused by multiple factors. It is associated with an increased risk of the development of insulin-resistance (IR) and metabolic syndrome, leading to type 2 diabetes. The impairment of lipid storage in the AT play a central role in obesity-associated disorders, as it leads to ectopic lipid accumulation and peripheral IR notably in muscles. In this context, the quality of dietary lipids may play a role in the regulation of AT and muscle metabolisms. In fact, palmitic acid (PAL), a saturated fatty acid (SFA) induces lipogenesis, inflammation and lipotoxicity favoring IR in many tissues. On the contrary, omega-3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ 3) have protective effect against obesity-associated disorders. Among them, linolenic (ALA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) specific effects remained partially described.

This work aimed at exploring the specific effects of  $\omega$ 3 on metabolic disorders and the development of obesity. Mechanisms were studied in C2C12 muscle cells during PAL-induced IR and in 3T3-L1 adipocytes to determine the impact of  $\omega$ 3 on adipocyte differentiation. *In vivo*, the effects of  $\omega$ 3 were investigated by supplementating C57BL/6 wild-type or leptin-deficient (*ob/ob*) mice with ALA, EPA or DHA during a high fat / high sucrose diet (mimicking a western diet).

In C2C12 muscle cells, co-incubation of  $\omega$ 3 with PAL induced a similar decrease in the content of lipotoxic compound and improved glucose uptake, whereas only EPA and DHA restored  $\beta$ -oxidation and insulin signaling activation. Furthermore, EPA and DHA were more potent to reduce PAL-induced inflammation compared to ALA. In mice, only EPA improved whole body glucose homeostasis compared to ALA and DHA. While EPA reduced body fat gain, DHA induced hypertrophy in AT, increased leptin secretion and decreased those of adiponectine. In cultured 3T3-L1 adipocytes, preadipocyte differentiation was also induced by DHA compared to ALA and EPA and might explain the hypertrophy observed in mice.

In conclusion and in our experimental conditions, ALA, EPA and DHA have common effects on *in vitro* lipid and glucose metabolism but also specific effects, demonstrating that EPA would be more interesting to limit IR *in vivo* compared to DHA or ALA. DHA favored hypertrophy of AT and disturbance of adipokine secretion involved in peripheral regulation of insulin sensitivity, notably in muscle.

Keywords: omega-3 fatty acids, insulin resistance, obesity, metabolic syndrome



## Liste des Abréviations

### A

AA : acide arachidonique  
ACC : acétyl-CoA carboxylase  
ACL : *ATP-citrate lyase*  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AET : apport énergétique total  
AG : acides gras  
AGNE : acides gras non estérifiés  
AGMI : acides gras monoinsaturés  
AGPI : acides gras polyinsaturés  
AGS : acides gras saturés  
ALA : acide alpha linoléique  
AMPK : *AMP-activated protein kinase*  
ANC : apports nutritionnels conseillés  
ANSES : agence nationale de sécurité  
sanitaire  
aP2 : *adipocyte protein-2*  
ARN: acide ribonucléique  
AS160 : *AKT substrate of 160kDa*  
ATGL : *adipose triglyceride lipase*

### B

BDNF : *brain derived neurotrophic factor*  
BEB : back extraction buffer  
BMP : *bone morphogenic protein*

### C

CACT : *carnitine/acylcarnitine translocase*  
CB1R/CB2R : récepteurs 1 et 2 aux  
cannabinoïdes  
CCM : chromatographie sur couche mince

CEBP : *CCAAT/enhancer binding proteins*  
CGI-58 : *comparative gene identification-58*

ChREBP : Carbohydrate-responsive  
element-binding protein

cidea/c : *cell death-inducing DNA  
fragmentation factor alpha-like  
effector a et c*

CLS: *crown-like structure*

CoA : coenzyme A

COX : cyclooxygénase

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPT1/2 : *carnitine palmitoyl transferase 1  
et 2*

### D

DGAT : *diacylglycerol acyltransferase*

DG : diglycérides

DHA : acide docosahexaénoïque

DHEA : docosahexaenoyl ethanolamide

DPA : acide docosapentaénoïque

### E

ELISA : *enzyme-linked immunosorbant  
assay*

ELOVL : *elongation-of-very-long-chain*

EPA : acide éicosapentaénoïque

EPEA: eicosapentaenoyl ethanolamide

ERK : *extracellular signal-regulated  
kinases*

## **F**

FABPpm/c : *fatty acid binding protein peripheral membrane / cytosolic*

FADS1/2 : *fatty acid desaturase*

FAS : *fatty acid synthase*

FAT/CD36 : *fatty acid translocase*

FATP : *fatty acid transporters*

FGF : *fibroblast growth factor*

FTO : *fat mass and obesity-associated*

## **G H**

GIP : *gastric inhibitory polypeptide*

GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*

GLUT4 : *glucose transporter 4*

GPAT : *glycerol-3-phosphate acyl-transferase*

GTT : *glucose tolerance test*

HDL : *high-density lipoprotein*

HF : *high-fat, hyperlipidique*

hMADs : *human multipotent adipose-derived stem*

HS : *high sucrose, riche en sucres*

## **I**

IBMX : *3-isobutyl-1-methylxanthine*

IGF: *insuline-like growth factor*

IL : *interleukine*

IMC : *indice de masse corporelle*

INSIG-2 : *insulin-induced gene-2*

ip : *intra-péritonéal*

IRS-1 : *insulin receptor substrate-1*

IR : *insulino-résistance*

IsoP : *isoprostanes*

ITT : *insulin tolerance test*

## **J K L**

JNK : *c-jun N-terminal kinase*

KLF : *Kruppel-like factors*

KO : *knock out*

## **L**

LA : *acide linoléique*

LAU : *acide laurique*

LDL : *low-density lipoprotein*

LHS : *hormone sensitive lipase*

LOX : *lipoxygénase*

LPL : *lipoprotein lipase*

LPS : *lipopolysaccharide*

## **M**

Ma : *marésine*

MAGL : *monoacylglycerol lipase*

MB : *métabolisme de base*

MCD : *malonyl-CoA décarboxylase*

MCV : *maladies cardiovasculaires*

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*

MyHC : *chaîne lourde de myosine*

MYR : *acide myristique/myristate*

## **N O**

NeuroP : *neuroprostanes*

NK : *natural killer*

NF- $\kappa$ B : *nuclear factor- $\kappa$ B*

OLE : *acide oléique/oléate*

OMS : *organisation mondiale de la santé*

## P

P : protectine  
p38MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinase*  
PAL : acide palmitique/palmitate  
PDGFR- $\alpha$  : récepteur alpha au facteur de croissance dérivé des plaquettes  
PDK : *phosphoinositide-dependent kinase*  
phPA : *primary human preadipocytes*  
PI3-K : *phosphatidyl-inositol 3-kinase*  
PIP<sub>2</sub> : *phosphatidyl-inositol-bisphosphate*  
PIP<sub>3</sub> : *phosphatidyl-inositol-trisphosphate*  
PKB : protéine kinase B  
PKC $\theta/\zeta$  : protéine kinase C theta/zeta  
PL : phospholipides  
Plin : périlipine  
PMA : phorbol myristate acétate  
PNA : programme national pour l'alimentation  
PNNS : programme national nutrition santé  
PO : plan obésité  
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*  
POMC : pro-opiomélanocortine  
pref-1 : *preadipocyte factor-1*  
PTEN : *phosphatase and tensin homolog*  
PVDF : polyfluorure de vinylidène

## Q R

qPCR: *polymerase chain reaction*  
RT: *reverse transcription*  
Rv : résolvines

## S

SAA3 : *serum amyloid A3*  
SCD-1 : stéaroyl-CoA désaturase-1  
SGBS : *Simpson Golabi Behmel syndrome*  
SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
SH2B1 : *SH2B adaptor protein 1*  
SNP : *single nucleotide polymorphism*  
SM : syndrome métabolique  
SREBP-1c : *sterol regulatory element-binding protein-1c*  
STE : acide stéarique/stéarate

## T

TA : tissu adipeux  
TAe : tissu adipeux épидидymal  
TAing : tissu adipeux inguinal  
TAmé : Tissu adipeux mésentérique  
TApg : tissu adipeux périgonadique  
TAr : tissu adipeux rétropéritonéal  
TAsc : tissu adipeux sous-cutané  
TAv : tissu adipeux viscéral  
TG : triglycérides  
TGF : *transforming growth factor*  
TMEM18 : *transmembrane protein 18*  
TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor-alpha*  
TLR4 : *toll-like receptor 4*  
TRB3: *tribbles 3*

## U V W

UCP : *uncoupling protein*  
 $\omega$ 3/6/9 : acide gras polyinsaturés oméga-3/6/9

# Sommaire

<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>2</b>
<b>Avant-Propos</b> .....	<b>3</b>
<b>I. Revue bibliographique</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Obésité et désordres métaboliques</b> .....	<b>5</b>
1.1. Définition.....	5
1.2. Prévalence du surpoids et de l'obésité.....	5
1.3. Perturbations métaboliques et pathologies associées à l'obésité.....	6
1.4. Causes de l'obésité : rôle de la génétique et de l'environnement.....	7
1.4.1. Génétique.....	7
1.4.2. Environnement.....	8
1.4.3. Réduction de la dépense énergétique.....	9
1.4.4. Apports caloriques élevés.....	10
<b>2. Métabolisme du tissu adipeux et obésité</b> .....	<b>11</b>
2.1. Généralités : tissu adipeux blanc et brun.....	11
2.1.1. Types d'adipocytes.....	11
2.1.2. Origines des adipocytes.....	12
2.2. Développement et plasticité du tissu adipeux blanc.....	13
2.2.1. Mécanismes de la différenciation adipocytaire.....	13
2.2.2. Maintien de l'adipocyte mature.....	14
2.3. Altérations du métabolisme du tissu adipeux blanc en situation d'obésité.....	15
2.3.1. Plasticité du tissu adipeux.....	15
2.3.2. Métabolisme des lipides.....	16
2.3.3. Activité sécrétoire et perturbations métaboliques.....	17
2.3.4. Infiltration des cellules immunitaires et inflammation.....	19
2.4. Obésité, altérations du métabolisme des adipocytes et conséquences sur le muscle squelettique....	21
<b>3. Métabolisme du muscle squelettique et obésité</b> .....	<b>22</b>
3.1. Généralités : Fonctions du muscle squelettique.....	22
3.2. Voie de signalisation de l'insuline et métabolisme du glucose dans le muscle.....	23
3.3. Métabolisme musculaire des lipides et régulation par l'insuline.....	25
3.3.1. Absorption des lipides.....	25
3.3.2. Beta-oxydation des lipides.....	25
3.3.3. Stockage des lipides.....	26
3.4. Obésité et altérations du métabolisme musculaire.....	27
3.4.1. Contenu intracellulaire en lipides et IR musculaire.....	27
3.4.2. Inflammation et IR musculaire.....	28
<b>4. Prévention et prise en charge de l'obésité</b> .....	<b>29</b>
4.1. Différentes approches de prévention.....	29
4.1.1. Stratégies privilégiées en France.....	30
4.1.2. Stratégies de prévention dans la population générale et évaluation de leur efficacité.....	31
4.1.3. Stratégies de prévention dans la population obèse et évaluation de leur efficacité.....	33
<b>5. Rôles des AG dans les désordres métaboliques liés à l'obésité</b> .....	<b>35</b>
5.1. Rappel sur les acides gras.....	35

5.2. Impact des AGS sur l'obésité, le développement du TA et l'IR .....	35
5.3. AGPI $\omega$ 3 .....	38
5.3.1. Elongation et désaturation .....	38
5.3.2. Sources alimentaires .....	39
5.3.3. Recommandations et intérêts pour la santé.....	40
5.3.4. Prévention de l'obésité, de l'IR et du SM par les $\omega$ 3.....	41
➤ Chez l'Homme .....	41
➤ Chez l'animal.....	43
5.4. Oméga-3 et altération du métabolisme adipocytaire .....	45
5.4.1. Modification de l'expansion et du profil sécrétoire des adipocytes .....	45
5.4.2. Réduction de l'inflammation locale .....	47
5.5. Oméga-3 et altération du métabolisme musculaire.....	48
<b>II. Objectifs .....</b>	<b>52</b>
<b>III. Protocoles et méthodes employés .....</b>	<b>54</b>
<b>1. Etude des cellules musculaires C2C12 .....</b>	<b>54</b>
1.1. Protocole expérimental.....	54
1.2. Fluidité membranaire .....	54
1.3. Suivi intracellulaire du PAL marqué au carbone 14.....	55
1.4. Stimulation de l'absorption du glucose par traitement à l'insuline .....	56
1.5. Inhibition de la voie p38MAPK à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique .....	56
1.6. Autres techniques.....	57
<b>2. Etudes <i>in vivo</i>.....</b>	<b>57</b>
2.1. Animaux.....	57
2.2. Régimes alimentaires .....	58
2.3. Protocoles expérimentaux .....	58
2.4. Tests de tolérance à l'insuline et au glucose .....	58
2.5. Oxydation <i>ex vivo</i> de palmitate marqué au $^{14}\text{C}$ .....	59
2.6. Analyses plasmatiques .....	59
2.7. Profils en lipides des tissus, des hématies et du plasma .....	60
2.8. Cellularité du TA .....	60
2.9. Dosage des DG et TG hépatiques .....	61
2.10. Autres techniques.....	61
<b>IV. Résultats.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Etudes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>63</b>
1.1. Oméga-3 et insulino-résistance des cellules musculaires C2C12 .....	63
1.2. Oméga-3 et inflammation des cellules musculaires C2C12.....	74
<b>2. Etudes <i>in vivo</i>.....</b>	<b>88</b>
2.1. Oméga-3, homéostasie glucidique et expansion du tissu adipeux .....	88
2.2. Oméga-3, lipotoxicité hépatique et musculaire .....	132
<b>V. Discussion et perspectives .....</b>	<b>142</b>
<b>VI. Conclusion .....</b>	<b>153</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>154</b>

# Liste des Tableaux

## Tableaux

**Tableau 1** : Critères de caractérisation du syndrome métabolique (SM)

**Tableau 2** : Cellules immunitaires du tissu adipeux blanc

**Tableau 3** : Typologie des fibres musculaires humaines

**Tableau 4** : Stratégies de prévention de l'obésité

**Tableau 5** : Sources alimentaires en ALA, EPA, DPA et DHA

**Tableau 6** : Acides gras oméga-3, obésité et insulino-résistance chez l'Homme

**Tableau 7** : Acides gras oméga-3, obésité et insulino-résistance chez l'animal

# Liste des Figures

## Figures

- Figure 1** : Répartition de masse grasse et indice de masse corporelle (IMC)
- Figure 2** : Prévalence de l'obésité chez la femme et chez l'homme de plus de 20 ans
- Figure 3** : Facteurs de risques de l'obésité
- Figure 4** : Morphologies des adipocytes
- Figure 5** : Les principaux dépôts adipeux au niveau central
- Figure 6** : Différentes origines des cellules adipeuses
- Figure 7** : Différenciation des adipocytes blancs
- Figure 8** : Maintien de la gouttelette dans l'adipocyte blanc mature
- Figure 9** : Cytokines sécrétées par le tissu adipeux blanc : les adipokines
- Figure 10** : Effet de l'obésité sur le métabolisme de l'adipocyte blanc et importance du dépôt adipeux
- Figure 11** : Voie de signalisation de l'insuline
- Figure 12** : Métabolisme musculaire des lipides
- Figure 13** : Effet de l'obésité sur le métabolisme musculaire
- Figure 14** : Principales classes de lipides dans l'organisme
- Figure 15** : Elongation et désaturation de l'acide alpha-linolénique (ALA)
- Figure 16** : Effet des oméga-3 sur le métabolisme de l'adipocyte blanc
- Figure 17** : Effet des oméga-3 sur le métabolisme musculaire
- Figure 18** : Différenciation et traitement des cellules musculaires
- Figure 19** : Choix de la dose d' $\omega$ 3, basée sur le DHA
- Figure 20** : Principe de mesure de la fluidité membranaire
- Figure 21** : Suivi intracellulaire du palmitate radioactif
- Figure 22** : Mesure de l'absorption du glucose
- Figure 23** : Composition des régimes
- Figure 24** : Protocoles expérimentaux chez la souris
- Figure 25** : Suivi et calcul de la tolérance à l'insuline et au glucose
- Figure 26** : Principe du dosage multiplex
- Figure 27** : Dosage des diglycérides et triglycérides hépatiques
- Figure 28** : Protocole expérimentale des cellules 3T3-L1
- Figure 29** : Schéma récapitulatif des principaux résultats
- Figure 30** : Protocole de l'étude transgénérationnelle
- Figure 31** : Extrapolation d'une dose utilisée chez l'animal à l'Homme
- Figure 32** : Protocoles expérimentaux d'étude du DPA

## Avant-Propos

Dans le monde, les principales causes de décès ont été classées par l'organisation mondiale de la santé (OMS). A la tête de ce classement se situent les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux suivis des broncho-pneumopathies chroniques obstructives. A la 8<sup>ème</sup> place, le diabète de type 2 a été la cause d'environ 1,5 millions de décès en 2012 contre 1 million en 2000. Toujours selon l'OMS, le diabète de type 2 (également appelé diabète non insulino-dépendant) résulte d'une mauvaise utilisation du glucose en réponse à l'insuline. Il représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité. Le diabète de type 2 est majoritairement diagnostiqué à l'âge adulte même s'il est de plus en plus fréquent de le détecter chez des enfants ou des adolescents. Un article paru dans le journal *Diabetes Care* en 2012, intitulé « le diabète de type 2 : une épidémie nécessitant une attention générale et une action urgente » insiste sur l'importance des recherches épidémiologiques, cliniques et patho-physiologiques dans la lutte contre le diabète de type 2 (Herman and Zimmet 2012). Entre 2000 et 2030, la population diabétique devrait doubler du fait d'une augmentation importante de la prévalence de la pathologie dans les populations d'Asie, notamment en Inde et en Chine. Les individus d'origine asiatique auraient, à indice de masse corporelle (IMC) égal, une susceptibilité plus élevée à développer un diabète de type 2 que les individus d'origine caucasienne. Il est donc important d'accélérer la compréhension des facteurs de risques et la mise en place de méthodes de diagnostic et de traitement adaptées à la culture des populations sont nécessaires (Herman and Zimmet 2012).

Environ 90% des personnes atteintes de diabète de type 2 sont obèses ou en surpoids. A l'inverse parmi les individus obèses, la prévalence du diabète de type 2 atteint seulement 18,3% (Gregg *et al.* 2004). Même s'il existe d'autres facteurs de risque (génétique, âge, stress, certains médicaments, alimentation, sédentarité, pollution, microbiote), l'obésité est le facteur de risque de diabète de type 2 le plus fréquent. En effet, ces deux pathologies partagent des mécanismes communs étroitement interdépendants comme l'insulino-résistance, l'inflammation, la perturbation du métabolisme des lipides et les dysfonctions de la mitochondrie (Eckel *et al.* 2011). L'insulino-résistance désigne une diminution de la réponse à l'insuline par les tissus qui sont sensibles à cette dernière comme le muscle, le foie et le tissu adipeux. Afin d'identifier précocement les personnes à risque de développer un diabète de type 2, un ensemble de 5 critères a été défini sous le terme de « syndrome métabolique » (SM)



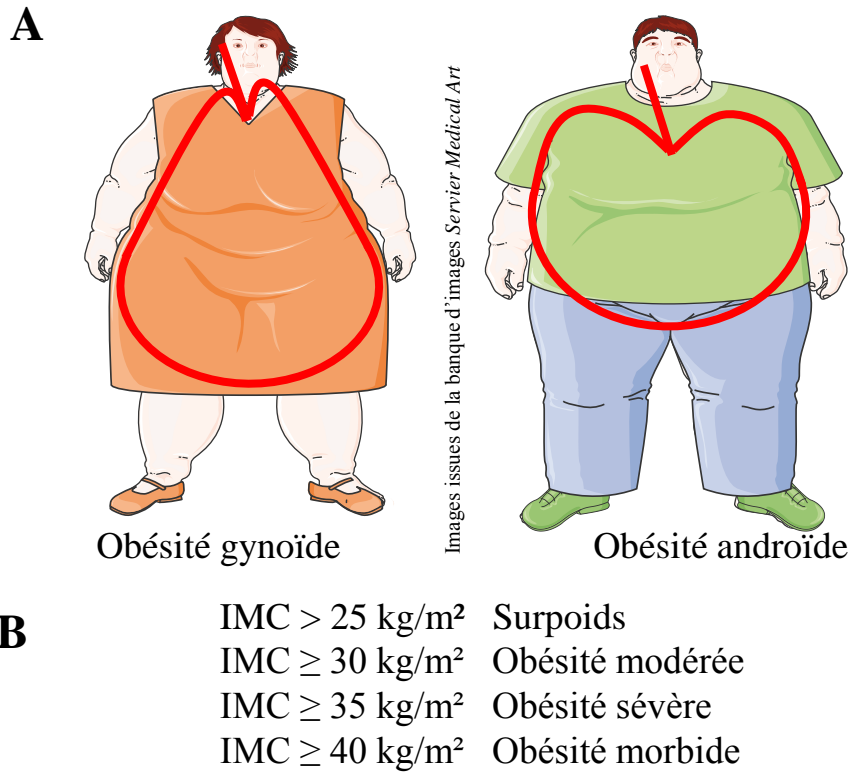
(Alberti *et al.* 2009). Un individu est considéré à risque de développer un diabète de type 2, mais aussi d'une maladie cardiovasculaire, s'il remplit 3 critères sur 5.

L'obésité est de plus en plus fréquente dans la population générale et sa prévalence ne cesse de croître depuis plusieurs décennies. De nombreuses stratégies de prévention ont été explorées dont la prévention par la promotion de l'activité physique ou d'une alimentation équilibrée. Or, l'efficacité de ces moyens de prévention est encore remise en question à l'heure actuelle.

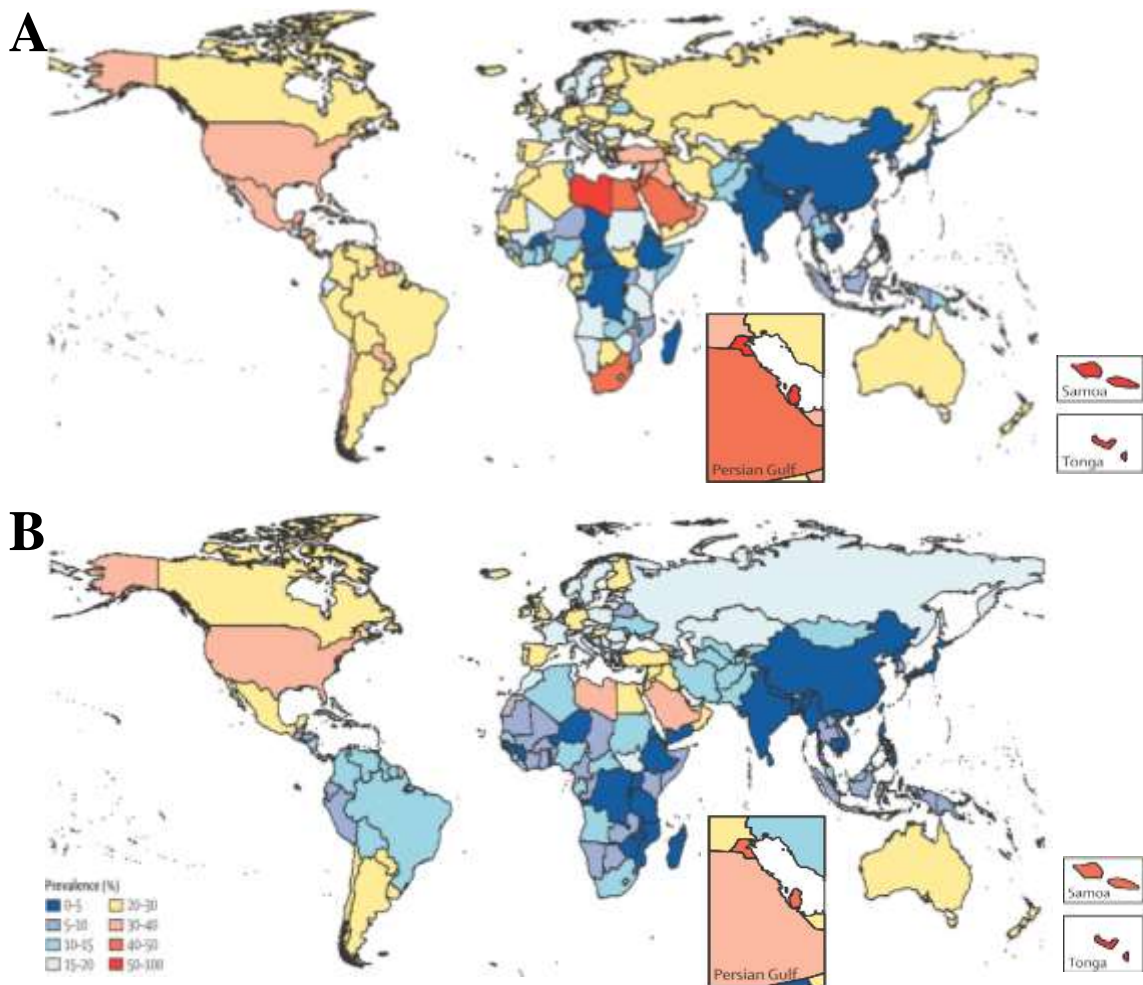
Pourtant, la qualité de l'alimentation, c'est-à-dire la capacité des aliments à répondre aux besoins nutritionnels en micro-constituants (vitamines, minéraux, polyphénols,...) mais aussi en macronutriments (lipides, glucides, protéines) a démontré son importance dans la prévention de nombreuses pathologies métaboliques. Il a notamment été démontré que les apports en lipides et l'équilibre en acides gras polyinsaturés oméga-6 et oméga-3 pourraient être important dans la lutte contre l'obésité et les désordres métaboliques qui l'accompagnent.

Dans ce mémoire, une synthèse bibliographique sur l'obésité, ses conséquences sur le métabolisme du muscle et du tissu adipeux (TA) seront développés afin d'expliquer la place majeure qu'ils occupent dans cette physiopathologie. Ensuite, nous aborderons les moyens de prévention mis en œuvre et le rôle des acides gras saturés et  $\omega 3$  dans les perturbations métaboliques liées à l'obésité seront développés. Nous présenterons ensuite les objectifs et les méthodes mise en œuvre pour répondre à ces objectifs avant d'aborder les résultats obtenus. Enfin, ces résultats seront discutés et mis en perspectives pour finalement conclure sur ce projet.

# Bibliographie



**Figure 1 : Répartition de masse grasse et indice de masse corporelle (IMC)**



Cartes tirées de Ng et al., *Lancet*, 2014

**Figure 2 : Prévalence de l'obésité chez la femme (A) et chez l'homme (B) de plus de 20 ans**

## I. Revue bibliographique

### 1. Obésité et désordres métaboliques

#### 1.1. Définition

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini l'obésité comme une accumulation excessive de masse grasse qui présente un risque pour la santé (OMS 2003). Cette accumulation de masse grasse peut se faire dans différentes régions du corps et participe de façon spécifique, selon sa localisation, à l'apparition des désordres métaboliques associés à l'obésité. Ainsi, les sujets présentant une répartition abdominale de la graisse, connue sous le nom d'obésité « androïde » ou centrale, ont plus de risques de développer des désordres métaboliques par rapport à ceux qui présentent une répartition de type « gynoïde », dans laquelle la graisse se répartit plus uniformément et de façon périphérique et sous-cutanée (cf. **Figure 1A**) (OMS 2003). L'obésité fait suite à l'apparition d'un surpoids et se différencie de ce dernier sur la base de l'indice de masse corporelle (IMC), calculé en rapportant le poids d'une personne en kilogramme (kg) sur sa taille en mètre (m) élevée au carré ( $IMC = \text{poids (kg)} / \text{taille (m)}^2$ ). Le surpoids est défini pour un IMC compris entre 25 et 30  $\text{kg/m}^2$  et l'obésité pour un IMC supérieur ou égal à 30  $\text{kg/m}^2$ . Plusieurs niveaux d'obésité ont également été définis selon le niveau de risque métabolique associé. Au-delà d'un IMC de 35  $\text{kg/m}^2$ , l'obésité est qualifiée de sévère, puis de morbide ou massive lorsque l'IMC dépasse 40  $\text{kg/m}^2$  (cf. **Figure 1B**).

#### 1.2. Prévalence du surpoids et de l'obésité

La prévalence du surpoids et de l'obésité, c'est-à-dire, le nombre de cas concernés sur la population totale étudiée à un instant donné est un indicateur fiable de son évolution. Contrairement à l'incidence qui ne comptabilise que les nouveaux cas, la prévalence inclut aussi les individus déjà malades.

A travers le monde, la prévalence du surpoids et de l'obésité est passée de 28.8% à 36.9% entre 1980 et 2013 (Ng *et al.* 2014), soit de 857 millions à 2.1 milliards d'individus en trois décennies. Aux Etats-Unis, plus de 30% des femmes et plus de 40% des hommes ont un IMC supérieur à 30 $\text{kg/m}^2$  (Ng *et al.* 2014) (cf. **Figure 2**). L'Egypte, la Libye, l'Afrique du Sud et la péninsule arabique sont des régions du monde où la prévalence de l'obésité est particulièrement forte ainsi que sur certains archipels comme les îles Samoa et Tonga (de 30% à plus de 50%) (Ng *et al.* 2014). Au contraire, l'Afrique centrale et l'Asie sont très peu

### Tableau 1: Critères de caractérisation du syndrome métabolique (SM)

Selon les critères suivants, définis par le *National Cholesterol Education Program III/Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATPIII), une personne est considérée comme atteinte du syndrome métabolique si elle répond à au moins trois des cinq critères ci-dessous. HDL : *high density lipoprotein*

#### Valeurs pour les différents critères selon les recommandations du NCEP/ATPIII (2001)

	Chez la femme	Chez l'homme
Tour de taille, en cm	> 88 <sup>†</sup>	> 102 <sup>†</sup>
Triglycéridémie, en mmol/L (mg/dL)	≥ 1,7 (150)	≥ 1,7 (150)
Pression artérielle, en mm Hg (Systolique/Diastolique)	≥ 130/85	≥ 130/85
Cholestérol HDL, en mmol/L (mg/dL)	< 1,3 (50)	< 1,0 (40)
Glycémie à jeun, en mmol/L (mg/dL)	≥ 5,6 (1,1)*	≥ 5,6 (1,1)*

<sup>†</sup>L'International Diabetes Federation (IDF) a défini des seuils à 80 et 94 cm, respectivement, laissant le choix entre ces valeurs et celles du NCEP/ATPIII pour les individus d'origine européenne.

\* Réduction de la valeur à 1,0 mg/dL selon les valeurs de l'IDF, 2009

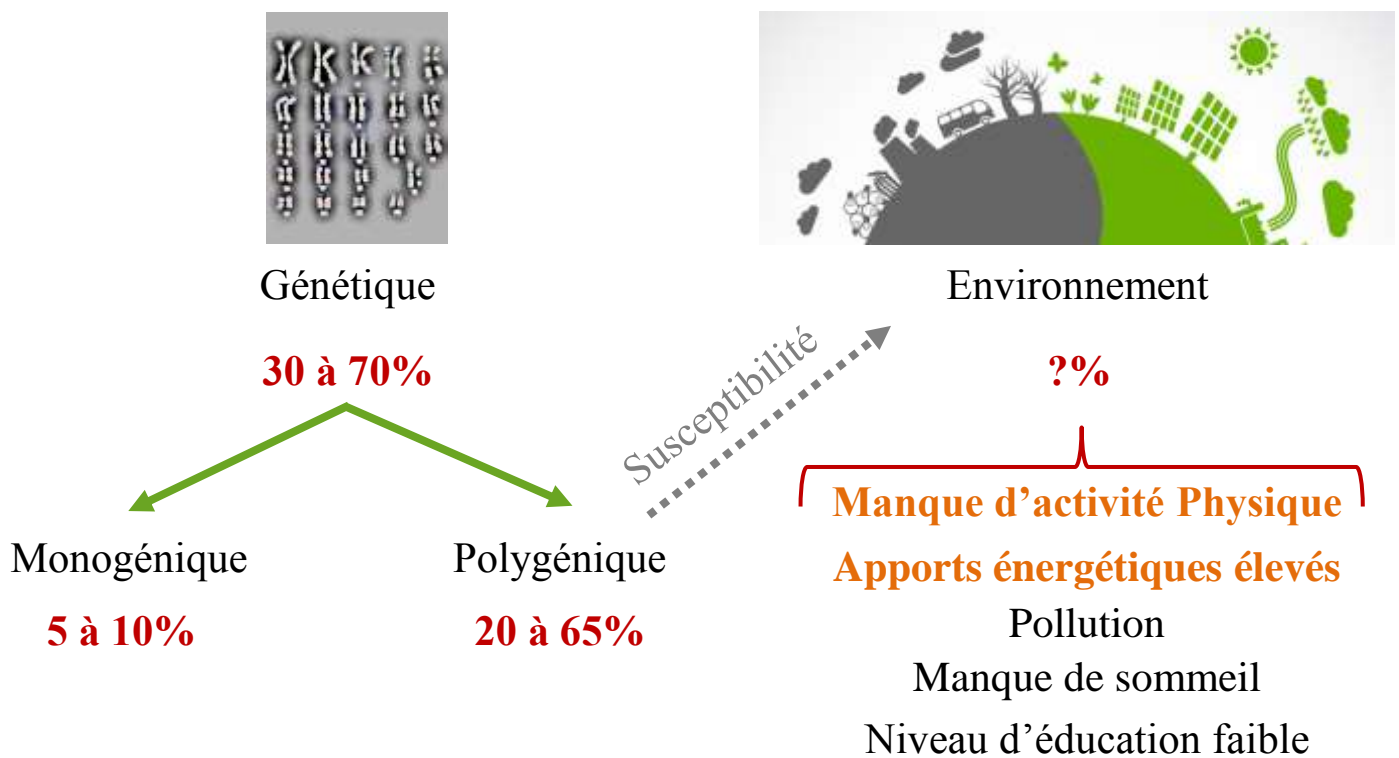
touchées par l'épidémie d'obésité (prévalence inférieure à 20%). Un ralentissement de l'augmentation de la prévalence semblerait s'opérer dans les pays développés occidentaux. Cette observation pourrait être un signe d'une prise de conscience et d'un début d'effet des campagnes de prévention.

En France, l'enquête nationale ObEpi-Roche (Eschwege *et al.* 2012), dont les derniers chiffres datent de 2012, montre que 32.3% des 18 ans et plus sont atteints de surpoids et 15% d'obésité (dont 10.7% d'obésité modérée). Ce qui fait que près de la moitié des sujets adultes sont en surpoids ou obèses en France. L'ensemble du territoire métropolitain n'est pas affecté de la même manière puisqu'un gradient Nord-Sud et Est-Ouest est observable : 21,3% pour le Nord-Pas de Calais, 11.6% en Midi-Pyrénées, 18.6% en Alsace et 12% en Bretagne.

L'obésité est un enjeu de santé publique car elle favorise l'apparition de nombreuses perturbations métaboliques qui conduisent à terme au développement de pathologies, comme les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 ou certains cancers. Le coût de l'obésité à l'échelle mondiale a été estimé par le cabinet de conseil McKinsey à 2000 milliards de dollars chaque année, la classant parmi les trois plus importantes charges sociales du monde (McKinsey Global Institute 2014). En France, son coût chaque année est estimé à environ 6 milliards d'euros (Emery *et al.* 2007). L'enquête ObEpi-Roche révèle aussi que l'obésité touche aussi de plus en plus de sujets de plus de 65 ans et amplifie le risque de développer des pathologies liées au vieillissement.

### 1.3. Perturbations métaboliques et pathologies associées à l'obésité

L'obésité est un facteur de risque majeur du syndrome métabolique (SM), un état physiopathologique réunissant au moins trois des cinq critères suivants (*cf.* **Tableau 1**) : une hypertriglycéridémie plasmatique, une baisse de la concentration plasmatique de cholestérol *high-density lipoprotein* (HDL), une obésité centrale, une hypertension artérielle et/ou une hyperglycémie à jeun (Alberti *et al.* 2009). La présence d'un SM est associée à une augmentation du risque de diabète de type 2 (Grundy 2006), notamment dû à une diminution de la réponse à l'insuline (insulino-résistance, IR) du foie, du muscle et du tissu adipeux (TA). Ceci cause une diminution de l'absorption du glucose sanguin par le muscle et le TA et une moindre inhibition de la néoglucogenèse hépatique sous l'effet de l'insuline, provoquant de ce fait une augmentation de la glycémie. Les cellules pancréatiques  $\beta$  sécrètent alors plus d'insuline pour stimuler l'absorption du glucose. Ces cellules finiront par s'épuiser,



**Figure 3 : Facteurs de risques de l'obésité**

conduisant à l'apparition du diabète de type 2, avéré lorsque la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 7 mmol/L (1,26 g/L) à deux reprises dans le plasma veineux.

L'obésité participe au développement de nombreuses pathologies métaboliques chroniques (Fardet and Boirie 2013), touchant différents tissus, comme le système cardiovasculaire, l'os, les articulations, le foie, le système digestif et le rein. L'obésité favorise le développement des maladies cardio-vasculaires (MCV) en augmentant les facteurs de risques cardiovasculaires tels que la tension artérielle, la cholestérolémie et l'inflammation de bas grade (van Rooy and Pretorius 2014) mais aussi la teneur plasmatique en acides gras (AG) non estérifiés (AGNE) (Pilz and Marz 2008) et en triglycérides (TG) (Liu *et al.* 2013). Ces modifications favorisent l'athérosclérose et les complications associées dont les plus graves sont l'accident vasculaire cérébral et l'infarctus du myocarde. L'obésité augmente également le risque de certains cancers (colon, sein) et de certaines maladies neurodégénératives. L'apnée du sommeil, fréquent chez l'obèse, se manifeste par la réduction voire l'interruption de la respiration et des apports en oxygène par obstruction des voies respiratoires supérieures (Badran *et al.* 2014).

La prévention de l'obésité semblerait donc primordiale. Celle-ci passe notamment par la compréhension de la physiopathologie et l'identification des facteurs de risques majeurs (*cf. Figure 3*).

#### 1.4. Causes de l'obésité : rôle de la génétique et de l'environnement

##### 1.4.1. Génétique

L'obésité est une maladie qui repose sur des prédispositions génétiques ainsi que sur des composantes environnementales et comportementales. Ainsi, il est admis que 30 à 70% des variations de la masse corporelle sont dues à des facteurs héréditaires (Lyon and Hirschhorn 2005). Cinq à dix pourcents des cas d'obésité seraient monogéniques c'est-à-dire dus à une mutation sur un seul gène, induisant une modification du phénotype de l'individu (ici, la masse grasse et le poids corporel). Les cas les plus répandus sont dus à une mutation du gène de la leptine, de son récepteur, du gène de la pro-opiomélanocortine ou du récepteur 4 à cette dernière (Hinney *et al.* 2010). Les cas d'obésité polygénique reposent sur la variation de la séquence ADN sur plusieurs gènes contrôlant un phénotype. Les récents progrès des méthodes de génotypage ont permis, par une approche sans hypothèse préalable (étude d'associations pangénomiques), de rechercher des variations génétiques (polymorphismes) pouvant être associées à l'obésité sur un grand nombre de gènes. Ainsi, des changements au niveau d'un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphism*, SNP) ont été identifiés sur 49



gènes et seraient associés au développement de l'obésité (Xu *et al.* 2013). Nous pouvons citer notamment les SNP touchant les gènes *fat mass and obesity-associated* (FTO), *insulin-induced gene-2* (INSIG2), *transmembrane protein 18* (TMEM18), *SH2B adaptor protein 1* (SH2B1) et *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Chacun de ces gènes aurait un faible impact sur la prise de poids mais ensemble, ils joueraient un rôle important dans la réponse de l'individu aux facteurs environnementaux et à l'activité physique, d'où le terme de « gènes de susceptibilité à l'environnement ».

Au-delà même de la séquence génétique, l'épigénétique va également jouer un rôle dans la réponse de l'organisme à son environnement. Elle est basée sur la régulation de l'expression des gènes par différents mécanismes : méthylation de l'ADN, méthylation/acétylations des histones associées à l'ADN ou expression d'ARN non codants (Youngson and Morris 2013). Ces modifications (appelées marques épigénétiques) vont moduler l'expression des gènes (Youngson and Morris 2013). Les marques épigénétiques pourraient expliquer en partie la transmission intergénérationnelle de l'obésité.

Cette transmission est particulièrement robuste puisque l'IMC des parents mais surtout de la mère a été positivement corrélé au risque de développer une obésité chez le descendant à l'âge adulte (Guillaume *et al.* 1995). Un poids de naissance supérieur à 4 kg est aussi un facteur de risque de développer une obésité plus tard (Yu *et al.* 2011). Sur cet aspect, il est très difficile d'évaluer quelle part est due à la génétique, aux marques épigénétiques ou encore à la nutrition maternelle qui constitue un des principaux facteurs environnementaux durant la gestation.

#### 1.4.2. Environnement

Beaucoup de facteurs environnementaux peuvent favoriser l'obésité et chaque facteur peut avoir un impact plus ou moins important. Le stress, en fonction de sa sévérité et de sa chronicité pourrait induire une augmentation des quantités mais également de la densité énergétique des aliments consommés (Torres and Nowson 2007). Le sommeil, qui s'est réduit de 1,5 à 2 heures durant les 50 dernières années, pourrait également jouer un rôle. Une heure de sommeil en moins équivaldrait à 0.35kg/m<sup>2</sup> supplémentaire (Cappuccio *et al.* 2008), soit environ 1kg pour un individu de 178cm. Les polluants tels que les perturbateurs endocriniens présents dans le sang maternel lors du développement fœtal, seraient favorables à l'expansion de la masse adipeuse et à l'apparition de l'obésité à l'âge adulte (Barouki 2013). Enfin, le rang social et le niveau d'éducation jouent un rôle dans l'apparition du surpoids et de l'obésité. En effet une étude réalisée dans le département français de la Seine-Saint-Denis a

montré une augmentation du risque d'obésité chez les personnes ayant un faible revenu (<834,47€), un niveau d'instruction modeste, ou encore étant au chômage ou faisant partie de la classe ouvrière (La Rosa *et al.* 2003). Tous ces facteurs vont donc influencer la prise alimentaire et l'activité physique des individus, et par conséquent, l'équilibre entre l'apport et la dépense en énergie.

#### 1.4.3. Réduction de la dépense énergétique

La dépense énergétique dépend principalement de trois composantes : la dépense énergétique de repos (métabolisme de base, MB), la thermogénèse et l'activité physique. Dans certaines conditions, une réduction du MB peut contribuer à la prise de poids puisqu'il représente environ 60 à 75% de la dépense énergétique d'un individu (Ravussin *et al.* 1988). Ainsi, un défaut de sécrétion des hormones thyroïdiennes (hypothyroïdie) a été associé à une baisse de la dépense énergétique (Kim 2008) et pourrait être la cause d'une obésité plus ou moins sévère (Knudsen *et al.* 2005). Avec l'âge, une réduction du MB a également été observée en lien avec l'évolution de la composition corporelle (fonte musculaire) et du statut hormonal (hormones sexuelles) (Fukagawa *et al.* 1996). Enfin, certains médicaments pourraient altérer le MB et participer à une augmentation du risque de prise de poids comme les bêta-bloquants (Welle *et al.* 1991).

La thermogénèse, deuxième composante de la dépense énergétique, comprend l'augmentation de la production de chaleur en réponse à la prise alimentaire (effet thermique des aliments) et la production de chaleur pour la thermorégulation. L'effet thermique des aliments serait diminué chez la personne obèse, notamment après ingestion de glucose (Laville *et al.* 1993). Toutefois, cette baisse ne serait pas suffisante pour expliquer un gain significatif de poids (Tappy 1996). De nombreuses études ont exploré l'implication de la thermogénèse dans l'obésité, sans jamais arriver à un consensus clair (Major *et al.* 2007). L'implication d'une diminution de la thermogénèse dans l'obésité est toujours un sujet de discussion.

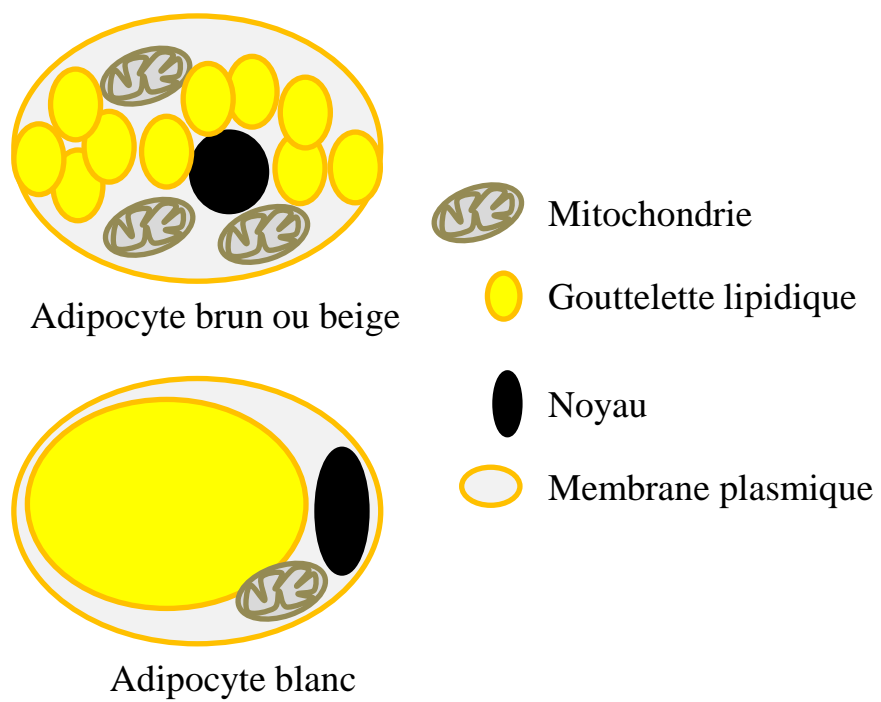
Des effets significatifs de l'activité physique sur le contrôle du poids et le pourcentage de masse grasse ont été observés, chez les adultes (Conn *et al.* 2014) et les enfants (Kelley and Kelley 2013). Le comportement sédentaire pourrait participer à la baisse de la dépense énergétique des enfants (Pearson *et al.* 2014). Or, le comportement sédentaire n'est que faiblement associé à une baisse de l'activité physique (Pearson *et al.* 2014). Toutefois, en fonction du type d'activité sédentaire, l'impact sur l'IMC peut être différent : une relation inverse mais peu robuste entre le niveau d'activité physique et le temps passé devant un écran

ou l'utilisation d'internet a été observée chez l'enfant et l'adolescent (Pearson *et al.* 2014). Au contraire, la lecture serait inversement corrélée à l'IMC des adolescents (Utter *et al.* 2003).

L'activité physique ou la sédentarité ne peuvent pas expliquer, à eux seuls, l'augmentation du risque d'obésité. Le comportement englobe également les habitudes alimentaires qui peuvent être tout aussi importantes dans la prise de poids (Utter *et al.* 2003). En effet même s'ils peuvent avoir des effets cumulatifs sur le poids des individus, la prise alimentaire et le niveau d'activité physique sont deux facteurs indépendants impliqués dans les variations pondérales (Mozaffarian *et al.* 2011).

#### 1.4.4. Apports caloriques élevés

C'est le déséquilibre entre les apports et la dépense en énergie qui conditionne la prise de poids. Or, les habitudes alimentaires des populations ont grandement évolué depuis les années 1970. Young et Nestle (Young and Nestle 2002) ont rapporté une augmentation de la taille des portions, allant de 2 à 5 fois la taille des portions originales suggérant une augmentation de la prise énergétique. Malgré tout, le risque dû à cette augmentation de l'apport énergétique n'est pas suffisamment robuste pour expliquer une prise de poids significative (Mattes 2014). La densité énergétique, c'est-à-dire la quantité d'énergie dans une portion a aussi augmenté (Stubbs and Whybrow 2004). Elle est considérée comme un risque convaincant de développer une obésité, au même titre que la sédentarité (Swinburn *et al.* 2004). La sensation de satiété après la consommation d'un aliment à haute densité énergétique est plus faible que pour un aliment à basse densité énergétique, participant encore à l'augmentation de l'énergie ingérée (Poppitt and Prentice 1996). L'augmentation de la fréquence des repas (Robinson *et al.* 2014) a aussi été pointée du doigt, notamment à cause d'une augmentation du grignotage chez l'adulte de 1 à 2,2 fois par jour entre 1977-8 et 2007-8 (Mattes 2014). Le grignotage a été associé à une augmentation des apports énergétiques mais les études peinent à démontrer une association entre grignotage et prise de poids, notamment à cause d'une sous-déclaration fréquente (Mattes 2014).



**Figure 4 : Morphologies des adipocytes**

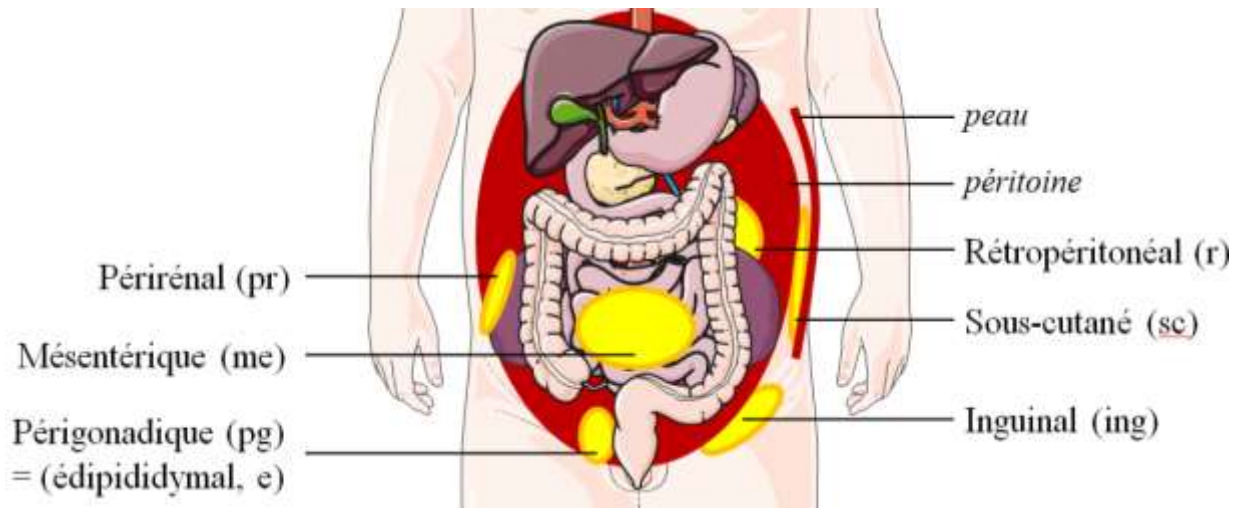
L'obésité est une maladie multifactorielle complexe qui touche de plus en plus d'individus dans le monde. Les gènes de susceptibilité à l'environnement sont nombreux et participent fortement au développement de l'obésité dans un contexte social, économique et nutritionnel favorable à la prise de poids. Cette prise de poids n'est pas sans conséquences sur l'organisme qui doit pouvoir gérer le surplus de substrats énergétiques. C'est là qu'intervient le tissu adipeux, un organe dont la fonction principale est le stockage et la redistribution de l'énergie sous forme de lipides pour redistribuer l'énergie en adéquation avec les besoins de l'organisme.

## 2. Métabolisme du tissu adipeux et obésité

### 2.1. Généralités : tissu adipeux blanc et brun

#### 2.1.1. Types d'adipocytes

Il existe trois types d'adipocytes : les adipocytes blancs, les adipocytes bruns et les adipocytes beiges. Les adipocytes bruns et beiges se distinguent des adipocytes blancs par leur morphologie (*cf.* **Figure 4**) et leur métabolisme, leur conférant des rôles physiologiques distincts. Les adipocytes bruns sont impliqués dans la thermogénèse grâce au découplage du fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative de la fabrication d'ATP. Ainsi, au niveau de la membrane interne des mitochondries, les protéines découplantes (*uncoupling proteins*, UCPs) et notamment UCP1, spécifique du TA brun (Nicholls and Rial 1999; Ricquier and Bouillaud 2000) permettent la production de la chaleur. Les adipocytes bruns sont morphologiquement reconnaissables par leur noyau central, leurs petites vacuoles lipidiques et le nombre élevé de mitochondries (Ginter and Simko 2012). Chez l'Homme, le nouveau-né possède une quantité non négligeable de TA brun qui va s'estomper au fur et à mesure de son développement. Il est situé, dans sa majeure partie, au niveau para-cervical et supra-claviculaire (Ginter and Simko 2012). A l'âge adulte le TA brun est très diffus et certains adipocytes bruns sont retrouvés isolés au sein du TA blanc. Les termes de brunissement ou de TA beige sont alors évoqués (Bartelt and Heeren 2014). Les adipocytes beiges sont retrouvés de manière isolée dans le TA blanc et ont une activité proche de celle d'un adipocyte brun (Harms and Seale 2013). Ils expriment également l'UCP1 après un exercice (Stanford *et al.* 2015), une stimulation pharmacologique (Zheng *et al.* 2014) ou par une exposition chronique au froid (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014).



Composition faite à partir de la banque d'images *Servier Medical Art*

**Figure 5 : Les principaux dépôts adipeux au niveau central**

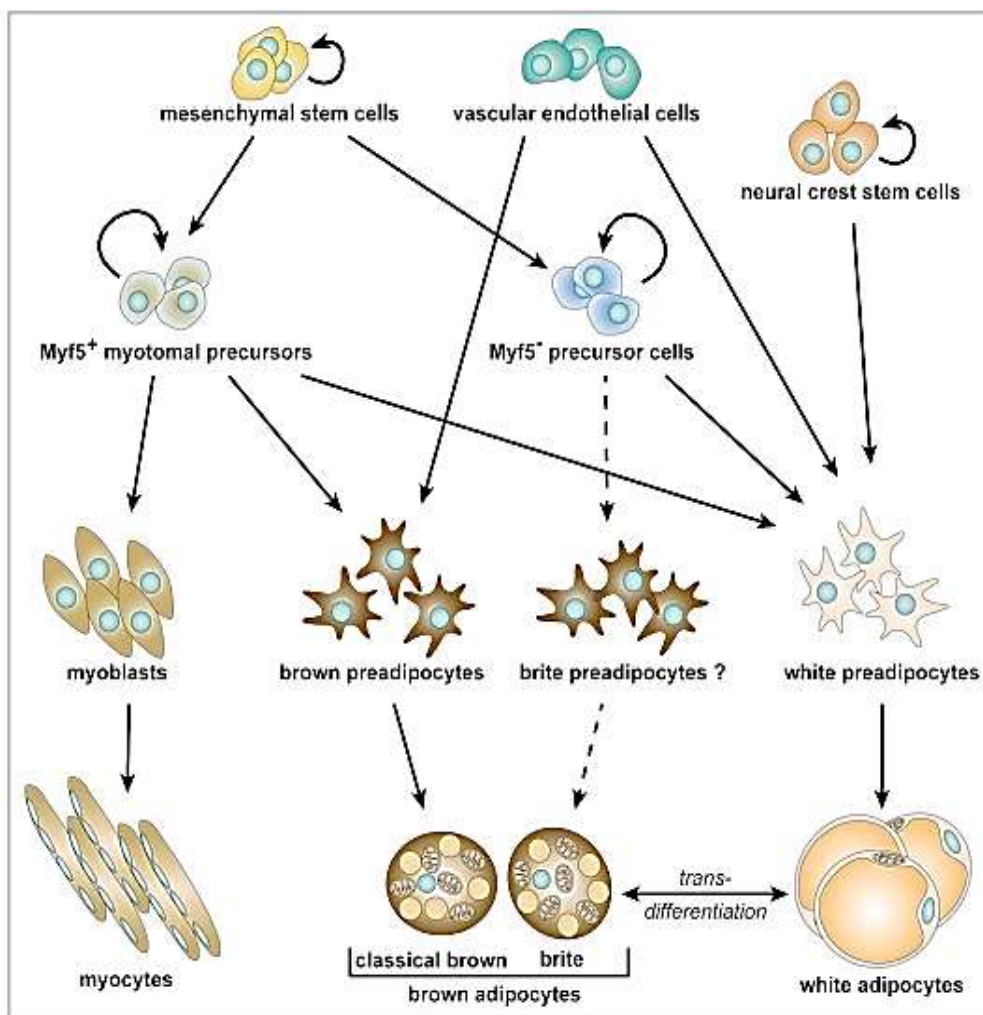


Illustration issue de Rosenwald et Wolfrum, *Adipocyte*, 2014

**Figure 6 : Différentes origines des cellules adipeuses**

Les adipocytes blancs sont caractérisés par la présence d'une unique vacuole lipidique entourée par un cytoplasme de taille relativement faible (Avram *et al.* 2005). Longtemps considéré comme un tissu limité au stockage des graisses et à la redistribution durant les phases de jeûne, le TA est maintenant reconnu comme un tissu complexe aux fonctions endocrine et métabolique importantes (Fantuzzi 2005).

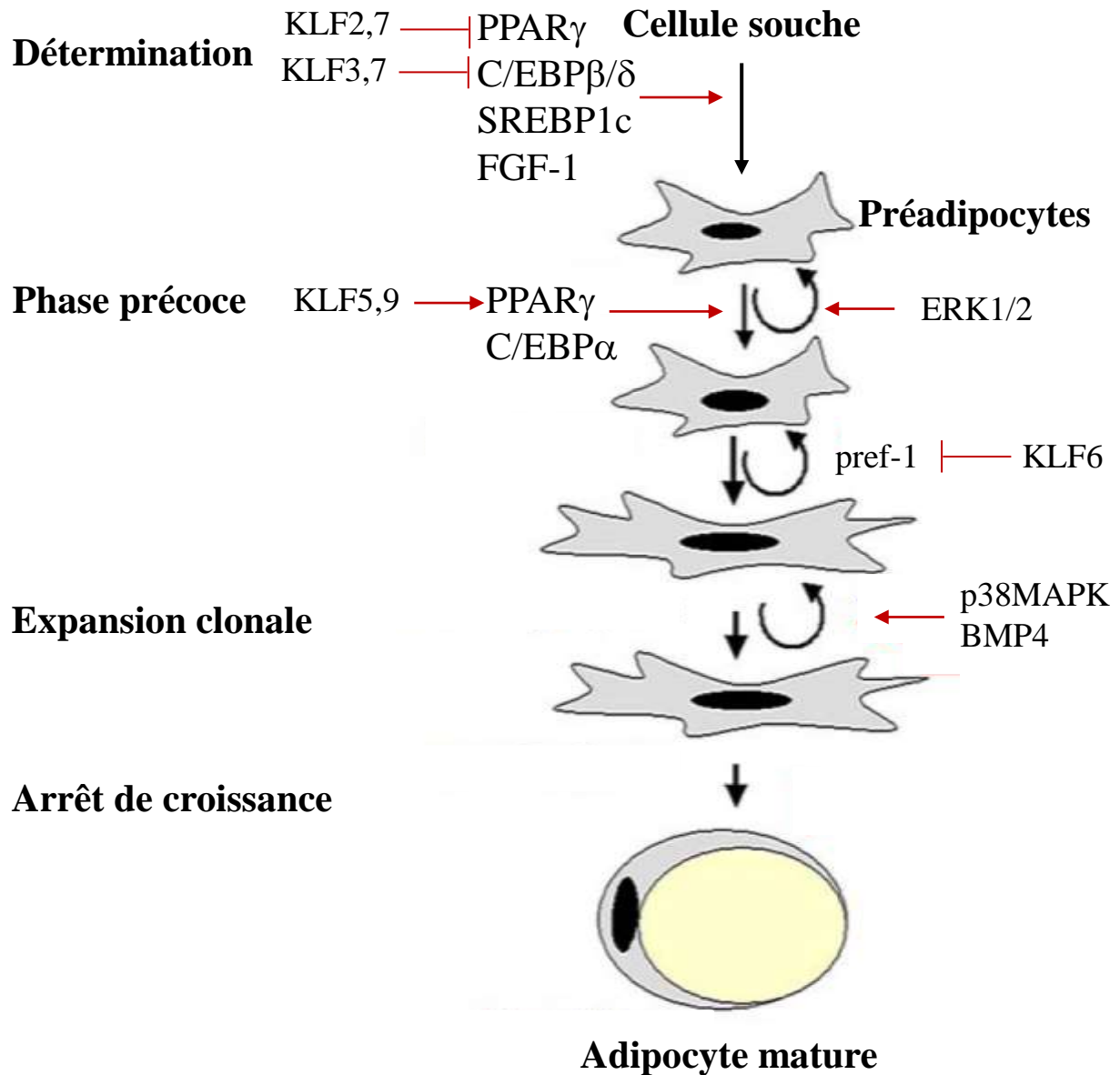
Le TA ne contient pas uniquement des adipocytes mais renferme également d'autres types cellulaires (cellules souches, cellules endothéliales, monocytes, lymphocytes macrophages, fibroblastes) et des précurseurs des adipocytes (pré-adipocytes) dans la fraction stroma-vasculaire (Vazquez-Vela *et al.* 2008). Il existe de nombreuses localisations où se développe le TA. Les principales localisations au niveau central sont récapitulées dans la **figure 5**.

### 2.1.2. Origines des adipocytes

Il semblerait que chaque type d'adipocyte puisse provenir de plusieurs type de cellules progénitrices telles que les cellules souches du mésenchyme, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules souches de la crête neurale (Rosenwald and Wolfrum 2014). La trans-différenciation d'adipocyte brun en blanc a également été évoquée, et inversement (Rosenwald and Wolfrum 2014). La **figure 6** récapitule ces différentes hypothèses.

Une revue de Sanchez-Gurmaches et Guertin a clairement récapitulé les origines identifiées en fonction du TA considéré (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014). Ainsi, les adipocytes bruns proviennent à 95% des précurseurs myf5<sup>+</sup> et les adipocytes blancs proviennent des précurseurs myf5<sup>+</sup> et myf5<sup>-</sup> de façon variable, avec 70% des adipocytes myf5<sup>+</sup> dans le TA rétro-péritonéal (TAr) et 6 et 9% respectivement dans les TA inguinal (TAin) et périgonadique (TApG). Les précurseurs de tous les adipocytes blancs exprimeraient le récepteur alpha au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- $\alpha$ ). Quant aux adipocytes beiges, deux origines ont été identifiées : à partir d'un précurseur ou à l'issue d'une trans-différenciation à partir d'adipocyte blanc, les adipocytes beiges apparaissant notamment dans le TA après stimulation par le froid (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014). Le traitement avec un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques impliqué dans le « brunissement » du TA blanc, a montré que l'apparition des adipocytes beiges provenait d'un précurseur spécifique dans le TAin et d'une différenciation à partir d'adipocytes blancs dans le TApG (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014).

Les adipocytes blancs et l'adaptation de leurs fonctions et de leur expansion durant la prise de poids étant particulièrement impliqués dans les perturbations métaboliques liées à



BMP: Bone morphogenic protein; C/EBP: CCAAT/enhancer binding proteins; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; FGF-1: Fibroblast growth factor-1; KLF: Kruppel-like factor; PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; pref-1: preadipocyte factor-1; SREBP1c: sterol regulatory element-binding protein-1c

Figure adaptée de Bost *et al.*, **Biochimie** 2005 et de Wu et Wang, **Developmental Biology** 2013, complétée des informations de Grégoire, **Experimental biology and medicine** 2001, Rosen *et al.*, **Genes & Development** 2002, et Zamani et Brown, **Endocrine reviews** 2011.

**Figure 7 : Différenciation des adipocytes blancs**



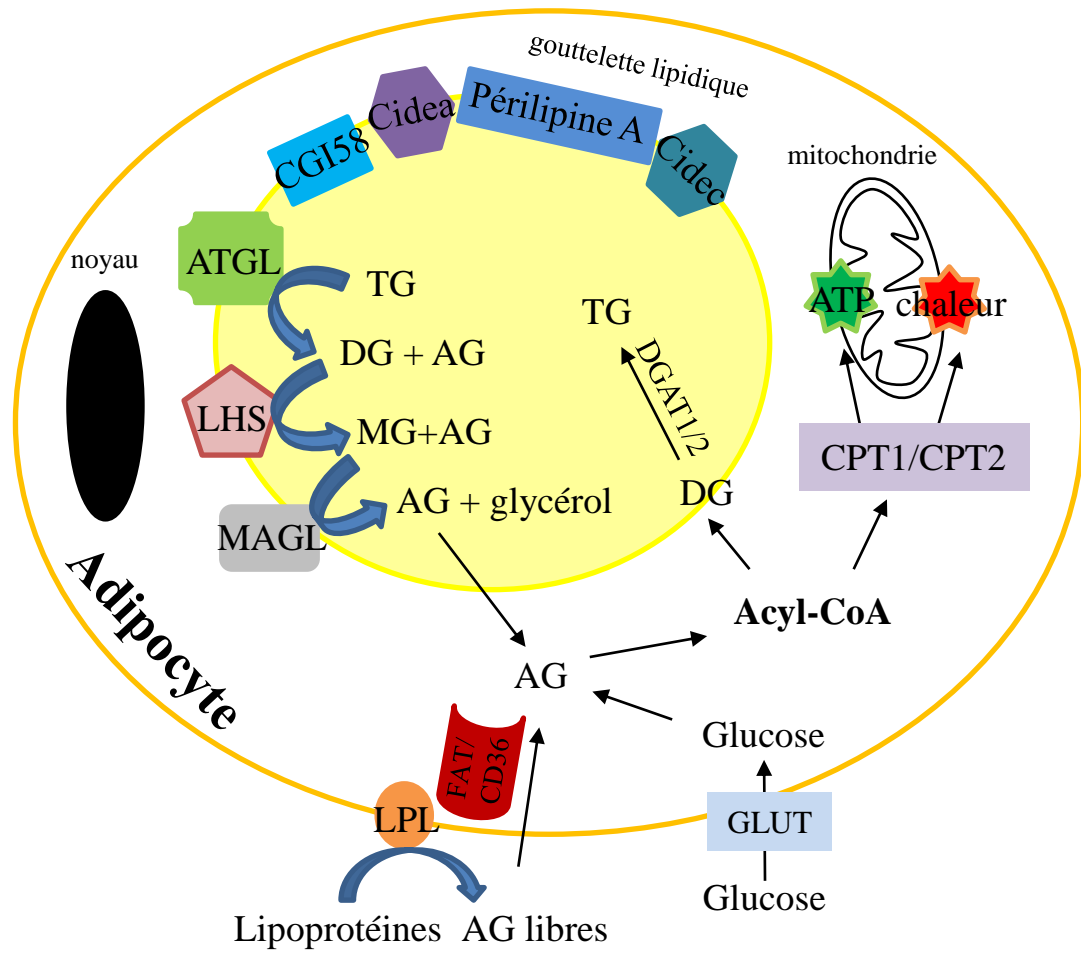
l'obésité, nous nous focaliserons sur leur développement et leur métabolisme dans les paragraphes suivants.

## 2.2. Développement et plasticité du tissu adipeux blanc

### 2.2.1. Mécanismes de la différenciation adipocytaire

Les études de la différenciation et de ses mécanismes sont principalement réalisées dans les modèles *in vitro* de préadipocytes tels que les 3T3-L1 ou 3T3-F442A d'origine murine et les cellules *human multipotent adipose-derived stem* (hMADS) ou *primary human preadipocytes* (phPA) et *Simpson Golabi Behmel syndrome* (SGBS) d'origine humaine. Les adipocytes dérivent de fibroblastes multipotents, cellules souches communes aux myocytes, aux ostéoblastes et aux chondrocytes. Par une phase de détermination, ces cellules souches perdent leur multipotence et deviennent des préadipocytes (*cf.* **Figure 7**). Les mécanismes permettant cette première étape n'ont pas été élucidés, même s'il semblerait que le facteur de croissance *fibroblast growth factor-1* (FGF-1) favorise l'engagement des cellules souches dans la voie de différenciation en préadipocyte et le déclenchement de la prolifération *via* son récepteur FGFR. L'activation des protéines kinases *extracellular signal-regulated kinases 1 et 2* (ERK1/2) ainsi que l'expression accrue du facteur de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) dans les cellules humaines phPA et SGBS semblent également impliquées (Widberg *et al.* 2009). FGF-2 a un effet similaire à FGF-1 et active également ERK1/2 dans les cellules hMADS (Zaragosi *et al.* 2006). L'activation des kinases ERK1/2 dans les phases précoces de la différenciation (Bost *et al.* 2005) est nécessaire à l'adipogenèse. Suite à cette première phase, la différenciation terminale se déroulerait alors en trois étapes : l'arrêt de croissance, avant une courte reprise de l'expansion clonale et la différenciation proprement-dite (Lefterova and Lazar 2009).

La différenciation terminale s'initie sous le contrôle des facteurs de transcription adipogénique *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c), *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP) et PPAR $\gamma$  (Gregoire 2001). PPAR $\gamma$ 2 serait indispensable puisqu'il a été démontré que sans son action, C/EBP $\alpha$  ne suffisait pas à induire la différenciation (Rosen *et al.* 2002). Tout au long de la différenciation les facteurs de transcription *Kruppel-like factors* (KLF) appuient ou réduisent l'effet de PPAR $\gamma$  à différents stades (Wu and Wang 2013) : KLF2, KLF3 et KLF7 ont démontré des propriétés anti-adipogéniques et répriment les promoteurs des gènes PPAR $\gamma$  et C/EBP $\beta/\delta$  avant la différenciation, tandis que KLF5 et KLF9 agissent dans les stades précoces et intermédiaires pour co-activer PPAR $\gamma$ . KLF6 inhibe



**Figure 8 : Maintien de la gouttelette dans l'adipocyte blanc mature**

l'expression du facteur de transcription *preadipocyte factor-1* (pref-1) et la différenciation des préadipocytes (Wang *et al.* 2006). Le rôle de deux membres de la superfamille du *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), *bone morphogenic protein 4* et *7* (BMP4 et BMP7), a aussi été décrit. Ils seraient impliqués dans la différenciation en adipocyte blanc et brun, respectivement (Zamani and Brown 2011). Une fois la différenciation engagée, les cellules s'arrondissent du fait de la restructuration de la matrice extracellulaire et du cytosquelette, et commencent à exprimer des gènes spécifiques de la différenciation des adipocytes, *adipocyte protein-2* (ap2), *stearoyl-CoA desaturase-1* (SCD-1), *glucose transporter 4* (GLUT4) et *lipoprotein lipase* (LPL) (Cornelius *et al.* 1994).

### 2.2.2. Maintien de l'adipocyte mature

Une fois différenciés, les adipocytes blancs peuvent alors stocker les lipides majoritairement sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques uniloculaires formées d'une monocouche de phospholipides (PL) associée à des protéines (*cf. Figure 8*), sauf en condition *in vitro* où les lipides restent organisés en gouttelettes pluriloculaires. Même si les mécanismes sont encore très mal connus, des récentes études ont souligné l'importance des protéines *cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector c* (Cidec/fsp27) et de la périlipine A (PlinA) dans ce processus (Sun *et al.* 2013). Ces protéines interagissent entre elles pour favoriser l'échange de lipides entre gouttelettes et permettre la formation d'une gouttelette unique. La PlinA et la protéine *cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector a* (Cidea) inhibent la lipolyse et participent au maintien de la structure de la gouttelette après différenciation. Elles ont été décrites comme étant régulées transcriptionnellement par PPAR $\gamma$  (Arimura *et al.* 2004; Viswakarma *et al.* 2007). La formation des gouttelettes lipidiques fait aussi intervenir l'activité des enzymes *diacylglycerol acyltransferase 1 et 2* (DGAT1/2) responsables de la dernière étape de synthèse des TG (Harris *et al.* 2011). L'inhibition de l'expression de leurs gènes chez la souris entraîne une réduction de la synthèse de TG et de la formation de gouttelettes lipidiques comparée à des souris témoins (Harris *et al.* 2011).

Le contenu en lipides dans la gouttelette lipidique dépend de l'équilibre entre l'influx d'AG, sous l'influence de la *lipoprotein lipase* (LPL) et du transporteur d'AG *fatty acid translocase* (FAT/CD36), et de l'efflux d'AG, qui est contrôlé par la lipase *adipose triglyceride lipase* (ATGL), la lipase *hormone sensitive lipase* (LHS) en interaction avec PlinA (Sztalryd *et al.* 2003) et la *monoacylglycerol lipase* (MAGL), aboutissant à l'obtention d'AGNE et de glycérol. La phosphorylation de PlinA libère la protéine *comparative gene*

*identification-58* (CGI58) qui peut alors activer ATGL et favoriser la lipolyse (Lass *et al.* 2006) (cf. **Figure 8**).

## 2.3. Altérations du métabolisme du tissu adipeux blanc en situation d'obésité

### 2.3.1. Plasticité du tissu adipeux

La capacité du TA à recruter de nouveaux adipocytes joue un rôle crucial durant le développement de l'obésité. Dans un premier temps, ce sont les adipocytes préexistants qui prennent en charge les lipides souvent apportés en excès par l'alimentation, on parle alors d'hypertrophie. Ceux-ci vont induire, par des mécanismes et des médiateurs encore mal connus, la différenciation de préadipocytes en nouveaux adipocytes matures, on parle ici d'hyperplasie (Faust *et al.* 1978). Chez l'Homme, l'accumulation de lipides dans les différents dépôts adipeux est dépendante du sexe de l'individu et de son statut hormonal. Ainsi, il est bien connu que les femmes pré-ménopausées accumulent plus de lipides dans le TA sous-cutané (TAsc) que dans le tissu adipeux viscéral (TAv). Le TAv ne se développerait que dans les cas d'obésité avancée ou après la ménopause (Kissebah and Krakower 1994). A l'inverse, les hommes développent un TAv très rapidement et ne mobilisent le TAsc pour le stockage des lipides que dans les cas d'obésité extrême (Kissebah and Krakower 1994).

L'hypertrophie du TAsc a été associée à un risque plus important de développer une IR et un diabète de type 2, indépendamment de la masse grasse totale (Wang *et al.* 2005; Lonn *et al.* 2010). L'hypertrophie du TAv a également été associée à une perturbation du profil plasmatique en *low-density lipoprotein* (LDL) et HDL chez la femme, indépendamment de sa composition corporelle et de la répartition de la masse grasse (Veilleux *et al.* 2011). L'obésité hypertrophique aurait plus de conséquences métaboliques néfastes (Arner *et al.* 2011). L'hyperplasie du TA serait cruciale pour éviter la surcharge en lipides dans les adipocytes déjà matures et le stockage ectopique des lipides dans d'autres organes.

D'une façon générale, le TAsc présente une plus forte hyperplasie que le TAv (Drolet *et al.* 2008). Chez le rat obèse, les adipocytes de grande taille (140-180µm) sont plus nombreux par rapport au TA d'un rat mince (Marques *et al.* 1998). La proportion plus importante de gros adipocytes est associée à une modification de la sécrétion adipocytaire et à l'induction d'une prolifération plus importante. Toutefois, des variations selon les dépôts viscéraux sont observables (Marques *et al.* 1998). Ainsi, une plus forte capacité proliférative est associée à la taille des adipocytes chez le rat obèse ou non dans le TAin, tandis que l'association n'est retrouvée que chez le rat obèse pour le TA épидidymal (TAe). Aucune

association n'a pu être observée pour le TAr, l'augmentation du nombre d'adipocytes n'ayant pas été associée au nombre de gros adipocytes dans ce dépôt (Marques *et al.* 1998). Enfin, le TA de patients obèses métaboliquement sains présente une capacité d'expansion du TAsc et une sensibilité à l'insuline préservée (Bluher 2010) démontrant l'importance de l'hyperplasie pour éviter le dysfonctionnement du TA et le stockage ectopique des lipides dans d'autres organes. Ces individus pourraient représenter 10 à 25% des personnes atteintes d'obésité (Bluher 2010).

### 2.3.2. Métabolisme des lipides

Le stockage des lipides dans le TA est la résultante de la balance entre lipolyse et lipogénèse. Ainsi, une baisse de la synthèse de TG et/ou une augmentation de la lipolyse peuvent être responsables d'une augmentation de la sécrétion d'AGNE. Le TAv serait métaboliquement plus actif que le TAsc et participerait fortement au relargage d'AGNE dans la circulation sanguine, une des principales causes de l'accumulation ectopique de lipides au niveau hépatique et musculaire (Matsuzawa *et al.* 1995). L'expression protéique de la FAT/CD36 est augmentée dans le TAsc d'individus en surpoids ou obèse, tandis qu'aucune augmentation n'est observée dans le TAv (Bonen *et al.* 2006). Ceci favoriserait la captation des AGNE par le TAsc. Les enzymes de la synthèse de TG pourraient également voir leur activité modulée par la prise de poids. Ainsi, une baisse de l'activité de la DGAT est enregistrée chez des sujets obèses comparativement à des sujets normo-pondéraux, avec une plus forte dégradation dans le TAv par rapport au TAsc (Cote *et al.* 2014). La synthèse de TG fait aussi intervenir la lipogénèse *de novo* correspondant à la synthèse d'AG à partir de glucose. Cette synthèse endogène est réalisée principalement dans le foie (Hellerstein 1999) mais elle est également présente dans le TA (Guo *et al.* 2000). Dans le TA, elle serait majoritairement sous le contrôle du facteur de transcription *carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP) (Herman *et al.* 2012; Eissing *et al.* 2013). Toutefois, le facteur SREBP1c, qui est activé par l'insuline, pourrait participer à ce processus dans le TA (Delzenne *et al.* 2001). Dans ce tissu, la lipogénèse *de novo* est très faible, aussi bien chez les individus minces que chez ceux qui sont obèses (Guo *et al.* 2000). Chez l'animal en revanche, la lipogénèse *de novo* dans le TA est plus importante que chez l'Homme (Letexier *et al.* 2003) et jouerait un rôle important dans l'homéostasie du glucose, en réduisant la concentration plasmatique de glucose (Herman *et al.* 2012). Lorsque des individus obèses présentent une IR, la lipogénèse *de novo* dans le TAsc est significativement réduite par rapport à des individus insulino-sensibles (Allister *et al.* 2015). Ceci serait notamment dû à une réduction de

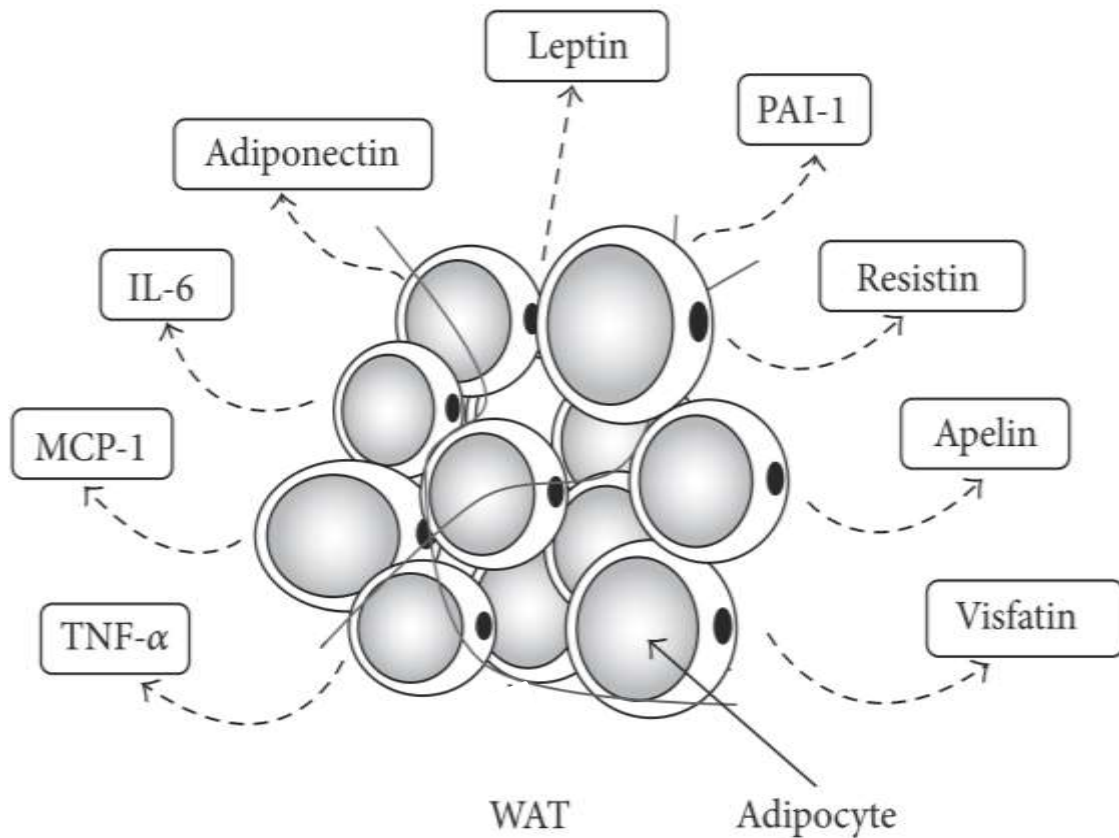


Image issue de Sakurai *et al.*, **International journal of endocrinology**, 2013  
 IL-6: Interleuline-6; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; TNF-a: Tumonr necrosis factor-alpha; WAT: white adipose tissue

**Figure 9 : Cytokines sécrétées par le tissu adipeux blanc - les adipokines -**

l'absorption du glucose (Molina *et al.* 1989). Dans le foie, la lipogenèse *de novo* serait quant à elle augmentée chez les individus obèses (Eissing *et al.* 2013). Ceci participerait notamment à l'apparition de l'IR et de la lipotoxicité.

Concernant la lipolyse, la quantité de protéines associées au maintien de la gouttelette lipidique (Cidea, Cidec, périlipine) du TAsc et du TAv n'est pas influencée par le niveau de sensibilité à l'insuline des patients obèses (Puri *et al.* 2008). Cependant, une baisse de l'activité de la lipase LHS (Large *et al.* 1999) et de la lipase ATGL (Steinberg *et al.* 2007) a été observée dans le TAsc au cours de l'obésité. En outre, les effets anti-lipolytiques de l'insuline seraient bien plus efficaces dans le TAsc par rapport au TAv (Lafontan 2013) suggérant une moindre lipolyse dans le TAsc.

Les données ici présentées démontrent la forte implication du TAv vis-à-vis du relargage des AGNE dans la circulation sanguine comparativement au TAsc. Il a été clairement démontré que leur augmentation dans la circulation est associée à une augmentation des risques d'IR et de diabète de type 2 (Capurso and Capurso 2012) et que la masse de TAv est corrélée à la lipolyse dans ce même tissu (Nielsen *et al.* 2004). La fonction sécrétoire des adipocytes est également altérée en situation d'obésité, notamment du fait de l'hypertrophie.

### 2.3.3. Activité sécrétoire et perturbations métaboliques

Les adipocytes ont la particularité de sécréter des molécules (adipokines et cytokines) impliquées dans de nombreuses fonctions telles que le contrôle de la température corporelle, de la balance énergétique et de la réponse immunitaire (Hauner 2005) (*cf.* **Figure 9** (Sakurai *et al.* 2013)). La taille des adipocytes et l'environnement inflammatoire influencent la sécrétion de ces molécules. Les adipocytes de petites tailles sécrèteraient plus d'adiponectine aux propriétés anti-inflammatoire et insulino-sensibilisante (Skurk *et al.* 2007). Des adipocytes plus gros favoriseraient quant à eux la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleukines (IL) 1 et 6 (Skurk *et al.* 2007). Chez la souris, l'infiltration des macrophages est aussi augmentée lors d'un régime hyperlipidique (*high-fat*, HF) du fait de l'augmentation de la sécrétion par le TA de la protéine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) attirant les macrophages (Kanda *et al.* 2006). Ces différentes molécules ont un effet endocrine mais également paracrine et vont influencer le métabolisme des adipocytes.

Le TNF- $\alpha$  est capable d'inhiber l'expression et la sécrétion d'adiponectine dans des adipocytes 3T3-L1 en culture (Fasshauer *et al.* 2002) et dans le TAv humain (Hector *et al.*

2007). De plus, la sécrétion de TNF- $\alpha$  favorise la lipolyse en réduisant la présence de PlinA en surface des gouttellettes (Souza *et al.* 2003). Elle inhibe aussi l'adipogenèse des adipocytes 3T3-L1 en culture (Cawthorn *et al.* 2007), confirmant encore le rôle de ces cytokines pro-inflammatoires dans les perturbations du métabolisme des adipocytes au cours de l'obésité.

Les taux de sécrétion dépendent également du dépôt adipeux considéré : la sécrétion d'IL-6 est augmentée de 2,3 fois dans le TAv comparativement au TAsc lors de culture *ex vivo* de TA issus de patients atteints d'obésité sévère (Fried *et al.* 1998). En revanche, la sécrétion de TNF- $\alpha$  est plus importante ou similaire dans le TAsc comparé au TAv chez des femmes ou des hommes obèses non-diabétiques, respectivement (Orel *et al.* 2004). La sécrétion de leptine est plus fortement induite dans le TAsc comparativement au TAv (Van Harmelen *et al.* 1998; Wajchenberg 2000; Orel *et al.* 2004). Quant à l'adiponectine, elle est sécrétée sans différence significative entre les deux types de dépôt mais sa sécrétion par le TAv est inversement corrélée à l'IMC des individus (Motoshima *et al.* 2002). Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les adipocytes auraient donc un rôle important dans les perturbations métaboliques du TA, et de manière plus importante dans le TAv.

La visfatine est une adipokine sécrétée de manière prépondérante par le TAv chez un individu normo-pondéral (Fukuhara *et al.* 2005). Une relation positive entre obésité et visfatine a été mise en évidence dans une méta-analyse de 2011 (Chang *et al.* 2011). La visfatine serait impliquée dans l'inflammation, favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et fibroblastes notamment (Stofkova 2010).

Une autre adipokine, la résistine, aurait des propriétés anti-adipogéniques (Kim *et al.* 2001). Son rôle dans l'obésité et l'IR n'a pas encore été élucidé, les données disponibles n'aboutissant pas à un consensus (Codoner-Franch and Alonso-Iglesias 2015). La résistine induirait la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et par les adipocytes (Stofkova 2010). Elle participerait ainsi à l'inflammation de bas grade en situation d'obésité.

L'obésité affecte aussi la sécrétion d'apeline. Cette dernière serait plus fortement sécrétée lorsqu'une hyperinsulinémie est détectée chez l'homme obèse (IMC 31-34kg/m<sup>2</sup>) comparativement à des sujets non-obèses (IMC 20-24kg/m<sup>2</sup>) (Boucher *et al.* 2005). Des résultats similaires ont été obtenus par injection d'insuline chez la souris C57BL/6 (Boucher *et al.* 2005). Lors d'un test de tolérance au glucose, l'utilisation du glucose est augmentée par l'injection d'apeline (200pmol/kg) chez des souris C57BL/6 atteintes d'hyperinsulinémie, d'hyperglycémie et d'obésité dues à un régime HF (45% de lipides) (Dray *et al.* 2008). Au niveau musculaire, l'apeline agirait *via* l'AMP-activated protein kinase (AMPK) et



**Tableau 2 : Cellules immunitaires du tissu adipeux blanc**

<b>Immune cell type</b>	<b>Antigens and other markers</b>	<b>Main secretory products</b>
Myeloid cells		
Macrophages		
M1	F4/80, CD11b, CD11c	TNF $\alpha$ , IL6, NOS2
M2	CD206, CD209, CD301, LYVE1	IL10, IL1Ra, arginase 1
Dendritic cells	CD1c, CD11c, CD80, CD83, CD86	IL12, IL15
Mast cells	CD117, FCER1	Histamine, PGE <sub>2</sub> , LTB4, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, TGF $\beta$ , IL4, IL10
Neutrophils	CD66b, CD11b, Ly6g	Lysozyme, NE, MPO, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8, MIP1 $\alpha$
Eosinophils	CD45, Siglec8	IL4, IL10, IL13, TGF $\beta$
Lymphoid cells		
T lymphocytes		
Helper (Th)		
Th1	CD4	IFN $\gamma$
Th2	CD4	IL4, IL5, IL13
Th17	CD4	IL17, IL21, IL22
Treg	CD4, CD25, Foxp3	IL10, TGF $\beta$
Cytotoxic	CD8	Perforines, granzymes, IFN $\gamma$
Natural killer T	CD3, NK1.1	TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL4, IL13
B lymphocytes	CD19, CD45R	IgG2c
Innate lymphoid type 2 cells	CD25	IL5, IL13

Tableau issu de Mraz et Haluzik, *The Journal of endocrinology*, 2014

l'activation de la NO-synthase endothéliale, capable de stimuler l'absorption du glucose indépendamment de la voie de l'insuline (Dray *et al.* 2008). Une activation de la protéine AKT a toutefois été décrite (Dray *et al.* 2008). L'apeline aurait donc un effet hypoglycémiant à la fois dépendant et indépendant de la voie de l'insuline.

Enfin, le TA sécrète un peptide, l'angiotensinogène, qui est le précurseur des angiotensines I et II. L'angiotensinogène circulant provient à la fois du tissu adipeux et du foie. Chez le rongeur, trente pour cent de l'angiotensinogène circulant proviendrait du tissu adipeux (Massiera *et al.* 2001). Il a été démontré que l'angiotensine II, via ses récepteurs AT1 et 2, possède des activités paracrines sur le TA. Il favoriserait la lipogenèse, réduirait la lipolyse et inhiberait la différenciation des préadipocytes (Yvan-Charvet *et al.* 2009). Or l'expression génique d'angiotensinogène est augmentée chez les hommes présentant une obésité comparativement à des individus normo-pondéraux (Van Harmelen *et al.* 2000). Ceci a conduit à suspecter l'implication de cette hormone dans les désordres métaboliques associés à l'obésité (Yvan-Charvet and Quignard-Boulangé 2011).

En situation d'obésité, l'activité sécrétoire des adipocytes est perturbée et participe au relargage de cytokines pro-inflammatoires et à la lipolyse. Outre les cytokines directement sécrétées par les adipocytes, les macrophages infiltrés participeraient également aux sécrétions du TA.

#### 2.3.4. Infiltration des cellules immunitaires et inflammation

Bien que de nombreuses cellules de l'immunité innée (cellules *natural killer* NK, monocytes et polynucléaires) et adaptative (lymphocytes T et B) soient présentes dans le TA (*cf.* **Tableau 2** (Mraz and Haluzik 2014)), les macrophages représentent la population la plus abondante. Ils s'organisent en couronne (*crown-like structure*, CLS) autour des adipocytes en apoptose. Des interrogations subsistent concernant la présence ou non de cellules dendritiques, leur marqueur CD11c étant aussi exprimé dans les macrophages infiltrés (Lolmede *et al.* 2011). En situation d'obésité, le nombre de macrophages infiltrés augmente de manière importante (Xu *et al.* 2003). Globalement, l'infiltration des cellules de l'immunité est augmentée à l'exception des lymphocytes T régulateurs et T *helper* 2 (Mraz and Haluzik 2014), impliqués dans la suppression de l'inflammation et la présence de macrophages anti-inflammatoires, respectivement (Mraz and Haluzik 2014).

L'infiltration des macrophages dans le TA est augmentée chez les patients atteints d'obésité proportionnellement au poids corporel et à la taille des adipocytes (Weisberg *et al.* 2003). Cette infiltration accrue s'expliquerait notamment par une augmentation de la sécrétion

de MCP-1, favorisant le recrutement des macrophages dans le TA (Kanda *et al.* 2006). Deux profils de macrophages peuvent être distingués : un profil M1 (F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) pro-inflammatoire et un profil M2 (F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>) anti-inflammatoire, correspondant respectivement à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) ou anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-1 *receptor antagonist*). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est favorisée par les macrophages de type M1 dans le TA humain (Canello and Clement 2006). Or, chez des patients obèses, ce profil est retrouvé majoritairement, participant ainsi à l'inflammation et à l'altération de la fonction des adipocytes (Aron-Wisnewsky *et al.* 2009). Lors d'un protocole de restriction calorique, l'abondance des macrophages M1 a été diminuée au profit des macrophages M2 chez le sujet obèse (IMC>31,5kg/m<sup>2</sup>) (Capel *et al.* 2009). Les variations du profil sécrétoire des macrophages varient donc avec le profil métabolique des individus et potentiellement en fonction du dépôt adipeux étudié.

Aucune différence d'infiltration des macrophages entre le TAsc et le TAv n'est observée chez des patients en situation d'obésité sévère avec ou sans diabète de type 2 (Bigornia *et al.* 2012). Toutefois, le nombre de CLS, *i.e.* couronnes de macrophages autour des cellules, est positivement corrélé à l'IR quel que soit le dépôt étudié. Chez la souris, un plus grand nombre de CLS est retrouvé dans le TAv par rapport au TAsc (Altintas *et al.* 2011). Dans le TAv, les auteurs ont également observé une présence de CLS plus importante dans le TAe comparé au TA périrénal (TApr) et mésentérique (TAme) (Altintas *et al.* 2011).

Les adipocytes et les macrophages de type M1 sécrètent du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 favorisant ainsi une augmentation de la lipolyse, un relargage accru d'AGNE et une augmentation de l'IR (Suganami and Ogawa 2010). Chez des individus obèses, le TA sécrète plus d'IL-6 que de TNF- $\alpha$  même si la sécrétion d'IL-6 est corrélée à celle du TNF- $\alpha$  (Kern *et al.* 2001). Une corrélation positive existe entre la concentration plasmatique d'IL-6 et l'IR mais également entre l'expression génique de TNF- $\alpha$  et l'IR (Kern *et al.* 2001). De plus, les concentrations en IL-6 et AGNE plasmatiques sont positivement corrélées entre elles. Les nombreuses sécrétions adipocytaires et macrophagiques ont donc un effet non négligeable sur le métabolisme du TA.

## 2.4. Obésité, altérations du métabolisme des adipocytes et conséquences sur le muscle squelettique

Les sécrétions adipocytaires, notamment d'adiponectine, de leptine et des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6, ont des effets paracrines mais aussi endocrines car elles vont agir sur d'autres tissus, dont le muscle. Elles vont influencer leur métabolisme et leur réponse à différents stimuli tels que celui de l'insuline. L'adiponectine a un effet insulino-sensibilisant sur le tissu musculaire (Esfahani *et al.* 2015). Sa sécrétion est diminuée lors de l'obésité, ce qui pourrait participer à l'apparition de l'IR musculaire. La sécrétion de leptine favoriserait la lipolyse et l'oxydation des lipides intracellulaires *via* l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique (Steinberg *et al.* 2003). Il est toutefois reconnu qu'une leptino-résistance, courante chez le sujet obèse, pourrait toucher le muscle et participer aux perturbations métaboliques (Sainz *et al.* 2015). Une exposition chronique à l'IL-6 a aussi montré des effets négatifs sur la sensibilité à l'insuline musculaire, contrairement à une exposition aiguë (Nieto-Vazquez *et al.* 2008).

D'autres informations ont été recueillies grâce aux modèles de co-culture entre cellules musculaires et adipocytes, et d'utilisation de milieux conditionnés d'adipocytes sur des cellules musculaires. Ces modèles présentent un intérêt dans l'étude de l'impact du TA et de ses sécrétions sur le métabolisme musculaire. Un effet favorable de l'adiponectine sur l'absorption du glucose des cellules musculaires L6 est observé lors de la co-culture d'adipocytes primaires et de cellules musculaires L6 (Vu *et al.* 2007). Si ces adipocytes proviennent de rats diabétiques, l'absorption du glucose par les cellules musculaires n'est pas augmentée, ce qui pourrait s'expliquer par une baisse de la sécrétion de l'adiponectine par les adipocytes (Vu *et al.* 2007). La co-culture avec des adipocytes matures induit également une augmentation de l'expression et de la production d'IL-6 par les cellules L6 (Seyoum *et al.* 2011). Le TA a donc une influence sur le métabolisme musculaire et des études ont montré que le type de dépôt adipeux peut également avoir un effet plus ou moins marqué. Les milieux conditionnés d'adipocytes issus du TAv de sujets obèses induisent une inflammation plus forte dans les cellules musculaires que ceux d'adipocytes issus du TAsc de sujets sains (Pellegrinelli *et al.* 2015). Dans ces mêmes conditions, la différenciation des cellules musculaires est plus fortement réduite en présence d'adipocytes du TAv par rapport à la présence d'adipocytes du TAsc. Parallèlement, la voie de l'insuline est inhibée, suggérant que les adipocytes issus du TAv pourraient induire une IR dans les myotubes (Pellegrinelli *et al.* 2015).



↑ Taille des adipocytes	$T_{Asc} > T_{Av}$
↑ Lipolyse et relargage d'AGNE	$T_{Asc} < T_{Av}$
↓ Lipogenèse	$T_{Asc} < T_{Av}$
↑ Sécrétion de leptine	$T_{Asc} > T_{Av}$
↑ Sécrétion d'IL-6	$T_{Asc} < T_{Av}$
↑ Sécrétion de TNF- $\alpha$	$T_{Asc} \geq T_{Av}$
↓ Sécrétion d'adiponectine	$T_{Asc} = T_{Av}$
↑ Sécrétion de visfatine	$T_{Asc} ? T_{Av}$
↑ Sécrétion de résistine	$T_{Asc} ? T_{Av}$
↑ Sécrétion d'apeline	$T_{Asc} ? T_{Av}$
↑ Infiltration des macrophages	$T_{Asc} = T_{Av}$
↑ Profil M1 des macrophages	$T_{Asc} ? T_{Av}$

**Figure 10 : Effet de l'obésité sur le métabolisme de l'adipocyte blanc et importance du dépôt adipeux**

La capacité du TA à s'adapter à une augmentation des apports caloriques joue un rôle crucial dans le développement des perturbations métaboliques liées à l'obésité (cf. **Figure 10**). Le faible recrutement de nouveaux adipocytes et l'hypertrophie des adipocytes déjà existants participent tout particulièrement à l'augmentation de la lipolyse et au relargage d'AGNE dans la circulation. Les macrophages infiltrés jouent aussi un rôle dans la dérégulation du métabolisme adipocytaire. Le TAv est plus impacté par la lipolyse, sécrète plus d'IL-6 et jouerait donc un rôle crucial dans l'apparition des désordres métaboliques. Les AGNE et les cytokines relargués au niveau systémique ont un impact sur le métabolisme des autres tissus périphériques et notamment sur celui du muscle.

### 3. Métabolisme du muscle squelettique et obésité

#### 3.1. Généralités : Fonctions du muscle squelettique

La principale fonction du muscle squelettique est le maintien de la posture et l'assurance de la motricité. C'est un tissu très innervé et très vascularisé, permettant ainsi un contrôle fin de son activité, de sa captation d'oxygène et de substrats énergétiques. Le muscle exerce sa fonction majeure grâce à son organisation en faisceaux de myofibres et de myofibrilles et à sa capacité de contraction. Les myofibres sont divisées en trois sous-groupes principaux (I, IIa, IIb) en fonction des chaînes lourdes de myosine (*myosine heavy chain*, MyHC) qui les composent. Les fibres musculaires peuvent en effet contenir plusieurs types de chaîne lourde. Leur capacité de contraction et leurs particularités anatomiques et fonctionnelles dépendront de leur composition (Scott *et al.* 2001) (cf. **Tableau 3**). Ainsi, les fibres de type I, riches en MyHCI, sont dites « oxydatives », « à contraction lente » et ont un rôle dans le maintien de la posture. Elles sont très résistantes aux exercices peu puissants et prolongés du fait de leur diamètre réduit, de leur vascularisation et de leur richesse en mitochondries. Les fibres de types I stockent plus de lipides dans leur cytoplasme que les autres fibres musculaires, ces fibres fonctionnant principalement à l'aide de substrats lipidiques (Schrauwen-Hinderling *et al.* 2006). Leur capacité d'oxydation est également très importante. Au contraire, les fibres de type IIb « à contraction rapide » ou « glycolytiques » sont plus grandes, moins vascularisées et moins riches en mitochondries. Les fibres appelées IIb chez l'Homme sont en fait l'homologue des fibres IIx/d chez les petits mammifères, la MyHCIIb n'étant pas détectable chez l'Homme (Scott *et al.* 2001). Elles jouent un rôle

**Tableau 3 : Typologie des fibres musculaires humaines**

Type de fibres	Type I	Type IIa	Type IIb
<b>Caractéristiques structurales</b>			
Couleur	Rouge	Rouge à rose	Blanche
Diamètre	Petit	Intermédiaire	Grand
Nombre de mitochondries	Elevé	Elevé	Faible
Nombre de capillaires	Elevé	Elevé	Faible
<b>Caractéristiques métaboliques</b>			
Activité ATPase des myosines	Lente	Rapide	Rapide
Voie principale de synthèse d'ATP	Aérobie	Aérobie	Anaérobie (glycolyse)
Contenu en myoglobines	Elevé	Elevé	Faible
Contenu en glycogène	Faible	Intermédiaire	Elevé
Contenu en triglycérides	Elevé	Intermédiaire	Faible
Métabolisme principal	Oxydatif	Oxydatif/glycolytique	Glycolytique
Fatigabilité	Faible	Intermédiaire	Elevée
Rôle fonctionnel	Endurance, posture	Sprint, Marche	Exercices courts, intenses ou puissants

Tableau issu de la thèse d'Aurélié Masgrau, **Caractérisation du métabolisme protéique musculaire au cours de l'obésité et lors de la perte de poids** soutenue le 3 Juillet 2012 à l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement de Clermont-Ferrand.

important durant les exercices de forte intensité et de courte durée. Enfin, les fibres de type IIa, qualifiées de « mixtes », ont des capacités et des caractéristiques intermédiaires aux deux autres types.

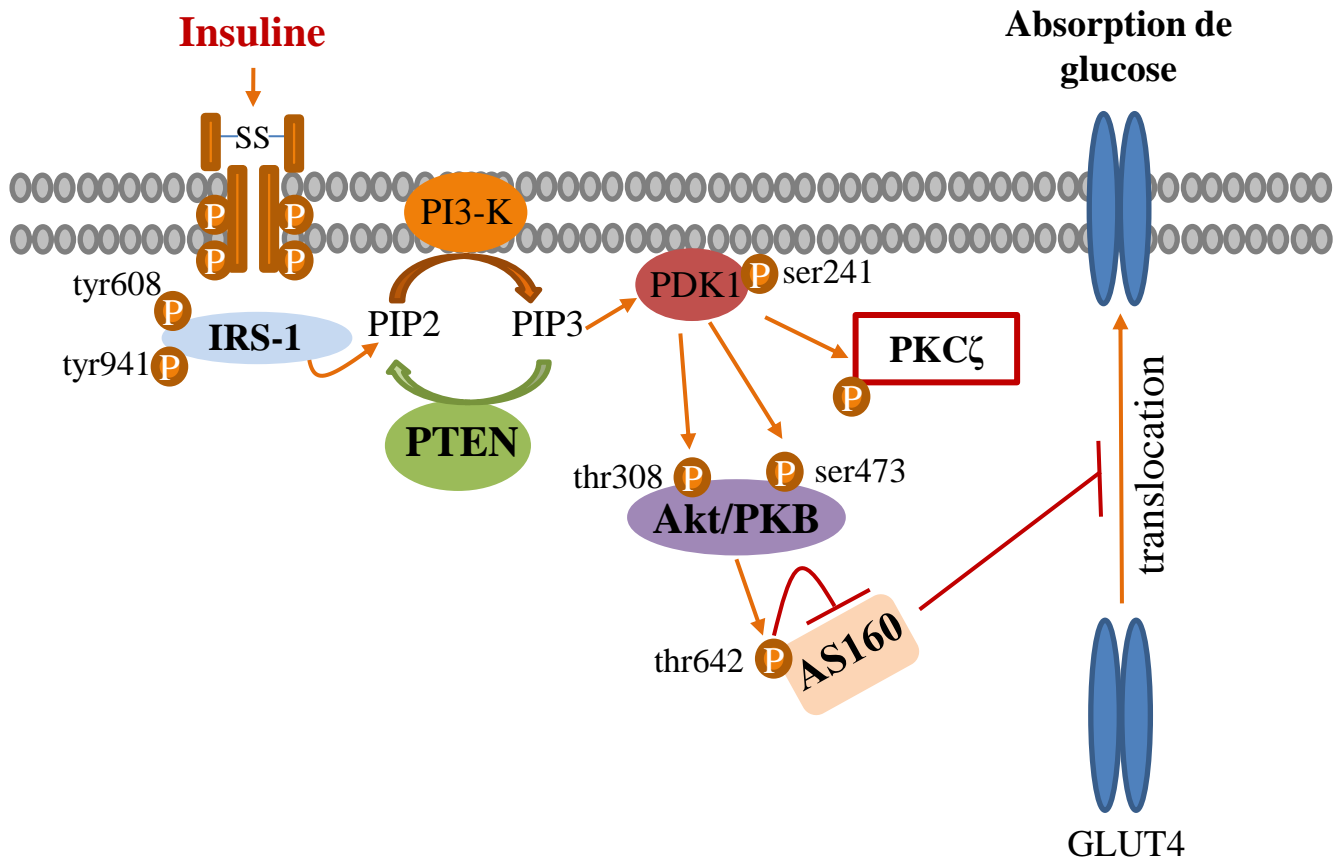
Même si certains muscles présentent une prépondérance en fibre de type I (80% dans le *soleus*) ou de type II (84.6% dans le muscle *orbicularis oculi*), la majorité des muscles sont composés d'un équilibre entre les fibres lentes et rapides (Johnson *et al.* 1973). Avec l'âge, la proportion de fibres de type IIa et IIb diminue (Nair 2005), tandis qu'un entraînement de type endurance ou résistance permet un enrichissement en fibres de type I (Short *et al.* 2005) ou IIa et IIb, (Fry 2004) respectivement, d'où une forte variabilité interindividuelle et intermusculaire. Des différences inter-espèces sont également observables. Ainsi, chez les rats et les souris, les fibres de types IIb et IIx sont plus fortement représentées (Schiaffino and Reggiani 2011) que chez l'Homme, rendant difficile l'extrapolation des données expérimentales chez la souris, même si un seul et unique muscle est considéré.

Outre sa fonction dans la motricité et la posture, la masse musculaire joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme des protéines, des lipides et des glucides. Elle participe grandement au métabolisme du glucose en réponse à l'élévation de la concentration plasmatique d'insuline en situation postprandiale, et joue de ce fait un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie glucidique (Sinacore and Gulve 1993). Lors d'une étude sur l'absorption musculaire de glucose en condition hyperinsulinémique, 74% était absorbé par le muscle squelettique au cours du clamp-euglycémique (Baron *et al.* 1988). Les muscles jouent également un rôle important dans le métabolisme des lipides, un jeûne de 12 heures suivi d'une analyse du métabolisme des lipides démontrant que le muscle participe à 80% de la consommation d'oxygène au repos (Dagenais *et al.* 1976). Les modifications de leur métabolisme au niveau musculaire peuvent influencer le statut métabolique et le profil lipidique d'un individu.

### 3.2. Voie de signalisation de l'insuline et métabolisme du glucose dans le muscle

L'insuline se fixe sur son récepteur couplé à une activité tyrosine kinase (*cf.* **Figure 11**). Cette interaction entraîne l'auto phosphorylation du récepteur et l'activation de son activité tyrosine kinase. Celle-ci va permettre la phosphorylation sur les résidus tyrosine 608 et 941 de l'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1), majoritaire dans le muscle (Schmitz-Peiffer and Whitehead 2003). IRS-1 se fixe ensuite sur la sous-unité régulatrice de la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) et induit la phosphorylation du phosphatidyl-inositol-bisphosphate



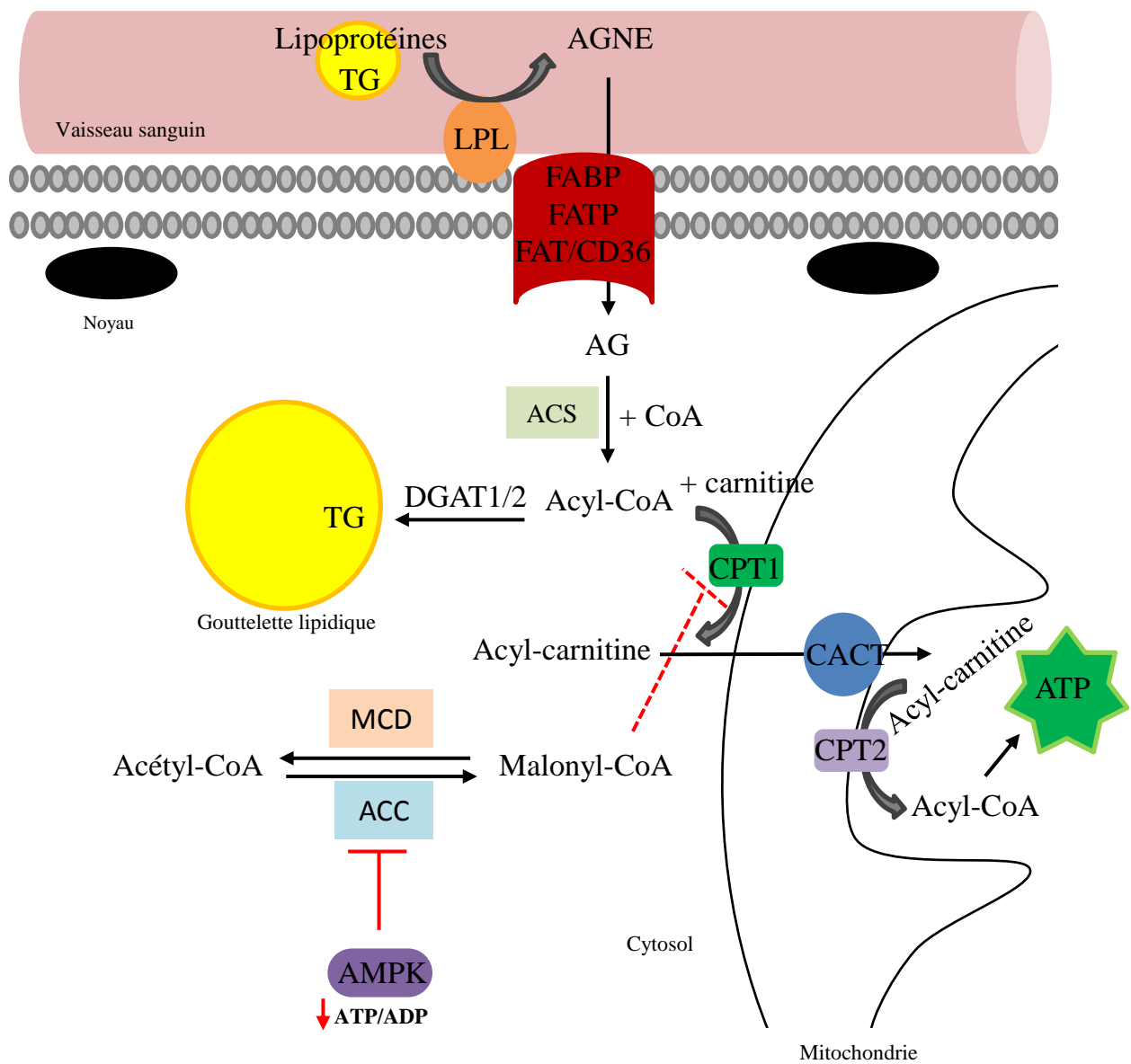


AS160: Akt substrate of 160kDa; GLUT4: Glucose transporter 4; IRS-1: Insulin receptor substrate; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1; PI3-K: phosphoinositide 3-kinase; PIP2: phosphatidyl-inositol-bisphosphate ; PIP3: phosphatidyl-inositol-trisphosphate PKB: Protein Kinase B; PKC: Protein kinase C; PTEN: phosphatase and tensin homolog;

**Figure 11 : Voie de signalisation de l'insuline**

(PIP<sub>2</sub>) pour former le phosphatidyl-inositol-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> permet ensuite le recrutement d'enzymes cytosoliques de la cascade de signalisation, dont la protéine *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) qui s'autophosphoryle sur le résidu serine 241 et la protéine kinase B (AKT/PKB) phosphorylées sur les sites activateurs serine 473 et thréonine 308. La phosphorylation d'AKT peut se faire directement par la PI3-K (Tsuchiya *et al.* 2014) ou *via* l'activité de la PDK-1 (Alessi *et al.* 1997). Il existe trois formes d'AKT : AKT1, AKT2 et AKT3, dont les isoformes 1 et 2 ont montré des effets spécifiques. AKT1 joue un rôle majeur dans la croissance chez la souris (Cho *et al.* 2001). L'isoforme AKT2 (Bae *et al.* 2003) favorise la translocation des transporteurs du glucose GLUT4 à la membrane, permettant à l'insuline d'induire la captation de glucose. Pour cela, AKT phosphoryle l'*AKT substrate of 160kDa* (AS160) sur son résidu thréonine 642. Avant phosphorylation, AS160 inhibe la translocation des vésicules de GLUT4. Sa phosphorylation libère ces vésicules qui migrent vers la membrane pour favoriser l'entrée du glucose dans la cellule musculaire (Kramer *et al.* 2006). Une étude a montré que la protéine kinase C zeta (PKC $\zeta$ ) pourrait également participer à la régulation de la captation de glucose (Bandyopadhyay *et al.* 1997). Elle serait activée sur son résidu thréonine 410 consécutivement à l'activation de la kinase PDK1 par PIP<sub>3</sub> (Chou *et al.* 1998). L'activation de la voie de l'insuline et de la protéine AKT induit aussi une augmentation de l'activité de la glycolyse et de la synthèse de glycogène (Dimitriadis *et al.* 2011). Des enzymes sont capables d'inhiber la cascade de phosphorylation. C'est le cas de la *protein phosphatase 2* (PP2A) et de la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), par inhibition de la phosphorylation d'AKT (Resjo *et al.* 2002) et par inhibition de la formation de PIP<sub>3</sub> (Leslie and Downes 2002), respectivement. Plus récemment, il a été démontré que la protéine *tribbles 3* (TRB3) pourrait également inhiber l'activation de la protéine AKT (Du *et al.* 2003).

L'insuline stimule la glycolyse par l'augmentation du transport du glucose et l'augmentation de l'activité de l'hexokinase et de la phosphofructokinase, deux enzymes clé de la glycolyse (Dimitriadis *et al.* 2011). Dans cette même voie, la pyruvate kinase est aussi activée par l'insuline (Miyanaga *et al.* 1982). La synthèse de glycogène est aussi augmentée par l'insuline *via* l'activation de la glycogène synthase mais cette activation est dépendante des réserves disponibles en glycogène. En effet, cette voie est plus particulièrement favorisée lorsque les réserves en glycogène sont déplétées (Dimitriadis *et al.* 2011). L'insuline régule aussi le métabolisme lipidique *via* son action sur la stimulation de la *fatty acid synthase* (FAS) permettant la synthèse d'AG à partir du glucose. De même, elle favorise l'absorption des AG circulants dans le tissu adipeux *via* la lipoprotéine lipase (LPL) jusqu'à leur orientation vers



ACC: Acetyl-CoA carboxylase; ACS: Acyl-CoA synthetase; AGNE: Acides gras non estérifiés; ATP: adenosine triphosphate; CoA: Coenzyme A; DGAT: Diacyl-glycerol acyltransferase; FABP: Fatty acid binding protein; FAT/CD36: Fatty acid translocase; FATP: Fatty acid transporter; CACT: carnitine/acylcarnitine translocase; CPT: Carnitine palmitoyl transferase; LPL: Lipoprotein lipase; MCD: Malonyl-CoA decarboxylase; TG: Triglyceride;

**Figure 12 : Métabolisme musculaire des lipides**

les différentes voies d'utilisation (oxydation mitochondriale, synthèse de métabolite, stockage).

### 3.3. Métabolisme musculaire des lipides et régulation par l'insuline

#### 3.3.1. Absorption des lipides

Le muscle capte les AG circulants par l'action de la lipoprotéine lipase (*cf.* **Figure 12**). Elle est excrétée dans la lumière des vaisseaux sanguins et dégrade les TG présents dans les lipoprotéines, libérant des AGNE qui sont alors pris en charge par des transporteurs ou protéines de transports. Il existe différents transporteurs : les FAT/CD36 et *fatty acid transporters* (FATP1 et 4), et les protéines de transports *fatty acid binding proteins* (FABP) membranaire (FABPpm) et cytosolique (FABPc). FAT/CD36 et FABPpm favorisent l'entrée des AG dans la cellule, les FATP facilitent également l'ajout de coenzyme A (CoA) sur les AG pour former les acyl-CoA *via* l'activité des acyl-CoA synthétases (ACS) permettant leur orientation vers l'oxydation et la production d'énergie (Kazantzis and Stahl 2012). L'isoforme 3 de la FABP est présente dans le muscle (Glatz *et al.* 2003). Celle-ci joue un rôle dans l'absorption des lipides mais n'est pas limitante dans ce processus. En effet, chez des souris hétérozygote (FABP3<sup>+/-</sup>) l'absorption du palmitate n'est pas affectée alors même que l'expression de la protéine est réduite de 66% (Glatz *et al.* 2003). Enfin, contrairement aux FATP, la FABP n'oriente pas préférentiellement les AG vers l'oxydation (Glatz *et al.* 2003).

L'insuline stimule la synthèse protéique et la translocation de FAT/CD36 vers la membrane (Corpeleijn *et al.* 2008), favorisant ainsi l'entrée des AG dans la cellule. A l'inverse, l'expression des transporteurs FABPc (Corpeleijn *et al.* 2008) et FATP4 (Kazantzis and Stahl 2012) ne serait pas influencée par l'insuline.

#### 3.3.2. Beta-oxydation des lipides

Pour rentrer dans la mitochondrie les AG activés en acyl-CoA doivent être pris en charge par la *carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT1) au niveau de la membrane externe des mitochondries avant d'être transférés sous forme d'acyl-carnitine dans l'espace intermembranaire mitochondrial. La *carnitine/acylcarnitine translocase* (CACT) permet l'entrée de l'acyl-carnitine dans la matrice mitochondriale où la CPT2 reforme l'acyl-CoA pour permettre son entrée dans la  $\beta$ -oxydation pour la production d'acétyl-CoA (Priore *et al.* 2012) (*cf.* **Figure 12**). L'oxydation mitochondriale des AG est finement régulée par la concentration cytosolique en malonyl-CoA, celle-ci étant sous le contrôle de l'acétyl-CoA

carboxylase (ACC) responsable de sa formation et de la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) qui le dégrade. Le malonyl-CoA inhibe allostériquement la CPT1, empêchant ainsi la synthèse d'acyl-carnitine et donc le transfert des AG vers la matrice mitochondriale. L'AMPK, sensible à l'état énergétique de la cellule (ratio ATP/ADP), inhibe l'ACC par phosphorylation. Dans le cas d'une déficience en ATP, l'activation de l'AMPK inhibe l'ACC et réduit la synthèse de malonyl-CoA. Ceci active la CPT1 et donc l'entrée des AG dans la mitochondrie pour produire de l'énergie. A l'inverse, lorsqu'il n'y a plus de besoin en ATP, l'augmentation de la concentration cytosolique en malonyl-CoA inhibe l'activité de CPT1 et par conséquent, réduit l'oxydation des AG.

Bien que la mitochondrie soit le lieu privilégié d'oxydation des AG, certains ne peuvent pas être pris en charge par la mitochondrie et sont orientés vers les péroxysomes. Ainsi, les AG à chaîne courte et moyenne (nombre de carbones <8 ou entre 8 et 10), ou à chaîne longue (12 à 18 carbones) sont obligatoirement ou préférentiellement oxydés dans les mitochondries, respectivement. Pour le palmitate, un acide gras à 16 carbones, 25% de l'oxydation est réalisée dans les péroxysomes musculaires chez l'Homme (Mannaerts *et al.* 1979). Les AG à très longue chaîne (plus de 20 carbones) sont obligatoirement orientés vers les péroxysomes qui raccourcissent ces AG par  $\beta$ -oxydation avant leur transfert vers la mitochondrie pour une oxydation complète (Wanders 2014).

L'insuline sécrétée en situation postprandiale inhibe l'oxydation mitochondriale des AG et favorise l'utilisation du glucose pour la production d'énergie. Dans le muscle, une hyperinsulinémie est associée à une augmentation de la concentration en malonyl-CoA et à une inhibition de la CPT1 induisant une réduction de l'oxydation mitochondriale des AG à longue chaîne (Rasmussen *et al.* 2002). L'insuline aurait également un effet inhibiteur sur l'oxydation peroxysomale, comme il a été démontré dans des hépatocytes de rats (Hamel *et al.* 2001).

### 3.3.3. Stockage des lipides

En situation physiologique, le muscle contient une quantité de lipides qui dépend de sa composition en fibre mais également des besoins en énergie. Les fibres de type I fonctionnent préférentiellement en aérobie par oxydation des lipides et stockent donc plus de lipides que les fibres de type II pour pouvoir subvenir à leur besoin (Schrauwen-Hinderling *et al.* 2006). L'absorption des AGNE circulants est sous le contrôle de FAT/CD36. Il a été montré que l'exercice en endurance favorise l'accumulation de lipides dans le muscle mais que cette accumulation n'est pas pathologique car elle s'accompagne d'une augmentation de la capacité

d'oxydation des lipides (Goodpaster *et al.* 2001). Le stockage des lipides sous forme de TG dépend de l'activité de la *glycerol-3-phosphate acyl-transferase* (GPAT) et de la DGAT (Badin *et al.* 2013) qui catalysent respectivement la réaction entre un glycérol-3-phosphate et un acyl-CoA, et celle entre un diacylglycérol et un acyl-CoA, deux étapes clés de la synthèse de TG. Les TG sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques intracellulaires dont les propriétés sont proches de celles décrites dans l'adipocyte.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'absorption d'AGNE *via* FAT/CD36 est induite par l'insuline ainsi que l'augmentation de la production de malonyl-CoA, conséquence de l'activation d'ACC et de la baisse de l'oxydation des lipides. L'insuline favorise ainsi la lipogénèse, processus favorisé par l'activation du facteur de transcription SREBP-1 (Nadeau *et al.* 2004; Boonsong *et al.* 2007) favorisant l'expression génique des enzymes de la lipogénèse (*ATP-citrate lyase* ACL, ACC et FAS). L'activité lipogénique en elle-même est augmentée dans des myotubes traités au glucose et à l'insuline (Guillet-Deniau *et al.* 2004).

### 3.4. Obésité et altérations du métabolisme musculaire

#### 3.4.1. Contenu intracellulaire en lipides et IR musculaire

L'excès d'apport en énergie provenant de l'alimentation et la synthèse endogène de lipides par la lipogénèse participent au dérèglement du métabolisme des glucides et des lipides. L'augmentation de la disponibilité en AGNE circulants favorise leur captation par le muscle, le taux d'absorption des AG étant d'une façon globale proportionnelle à leur concentration plasmatique (Pilz and Marz 2008). Dans un premier temps, l'absorption d'AGNE ne perturbe pas le métabolisme musculaire. Elle conduit à la synthèse de TG, stockés dans les gouttelettes lipidiques. Si l'afflux d'AGNE continue d'augmenter, la capacité de synthèse des TG est dépassée et les intermédiaires lipidiques tels que les diglycérides (DG) et les céramides s'accumulent (Badin *et al.* 2013). Le terme lipotoxicité est alors employé pour décrire la perturbation métabolique et les dysfonctionnements cellulaires engendrés par l'accumulation des intermédiaires lipidiques dans les tissus périphériques comme le muscle.

L'oxydation complète des AG semble diminuée dans des cellules musculaires primaires issues de patients en situation d'obésité sévère (Bell *et al.* 2010) ou chez des individus en situation d'obésité morbide (Berggren *et al.* 2008; Coen *et al.* 2013) comparativement à des patients normo-pondéraux. Ceci s'expliquerait par une augmentation du contenu musculaire en malonyl-CoA chez les sujets obèses, induisant une baisse de l'oxydation des lipides mais également une augmentation de la lipogénèse (Bandyopadhyay *et*

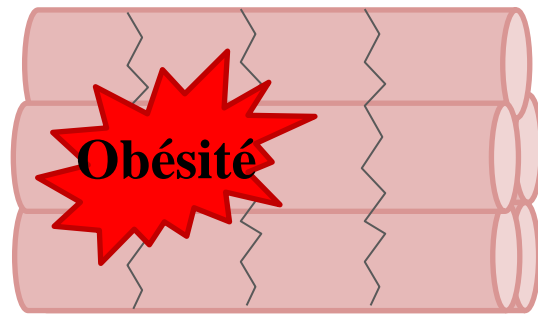
al. 2006). Les individus obèses seraient donc plus touchés par l'accumulation intramusculaire de lipides. L'obésité abdominale est en effet corrélée à une augmentation des TG intracellulaires et à l'IR chez des sujets en surpoids ou en situation d'obésité modérée, indépendamment de l'âge (de la Maza *et al.* 2014). L'accumulation de céramides à longue chaîne (>20 carbones) est augmentée (Coen *et al.* 2013). Une étude de Moro *et al.* (2009) a montré que la concentration musculaire en TG, DG et céramides est augmentée chez des sujets obèses par rapport à celle observée chez des sujets non-obèses. Ces trois types de lipides sont positivement corrélés entre eux et à l'IR (Moro *et al.* 2009). La culture de cellules musculaires de sujets obèses a conduit à des résultats similaires (Bell *et al.* 2010). Afin de mieux comprendre la relation entre lipides intracellulaires, obésité et IR, les mécanismes impliqués ont été étudiés dans des modèles *in vivo* et *in vitro*.

Chez des rats obèses insulino-résistants, les céramides et les DG sont significativement augmentés dans les muscles *soleus* et *plantaris* en comparaison avec des rats non-obèses (Turinsky *et al.* 1990). L'augmentation de l'oxydation mitochondriale des lipides dans des cellules musculaires L6 surexprimant CPT1 permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline malgré l'accumulation de DG et de céramides (Perdomo *et al.* 2004). En augmentant l'expression de la DGAT1 et la synthèse de TG, un effet protecteur vis-à-vis de l'IR est observé dans un modèle de souris transgéniques (Liu *et al.* 2007). De plus, la manipulation génétique de l'expression de la lipase ATGL au niveau musculaire n'est pas associée à une meilleure sensibilité à l'insuline ou une meilleure oxydation mitochondriale (Sitnick *et al.* 2013).

Le bon fonctionnement de l'oxydation et/ou de la synthèse de TG permettraient de limiter l'accumulation des DG et céramides particulièrement délétères pour le métabolisme et la sensibilité à l'insuline musculaire. Ces deux composantes semblent donc être des cibles intéressantes à des fins thérapeutiques.

### 3.4.2. Inflammation et IR musculaire

Comme décrit précédemment, l'inflammation du TA, la libération d'AGNE et de cytokines dans la circulation est favorable à l'apparition d'une inflammation au niveau musculaire (Boden 2006). Différentes voies inflammatoires pourraient être activées dans le muscle, telles que la voie du *nuclear factor-κB* (NF-κB), activée par la réduction de l'expression protéique de l'inhibiteur IκBα (Itani *et al.* 2002), ou l'activation de la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) qui pourraient expliquer l'augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation (Brown *et al.* 2015). L'inhibition de la p38MAPK



- ↑ Triglycérides
- ↑ Céramides et diglycérides
- ↑ Lipogénèse
- ↓ Oxydation des lipides
- ↑ Sécrétion d'IL-6
- ↑ Inflammation
- ↑ Insulino-résistance

**Figure 13 : Effet de l'obésité sur le métabolisme musculaire**



par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique (SB203580) favorise la réduction de l'expression géniques des cytokines IL-6 et IL-8 ainsi que du facteur chimiotactiques des macrophages MCP-1 (Brown *et al.* 2015). Cependant, cette inhibition ne favorise pas l'absorption du glucose dans ces mêmes conditions (Brown *et al.* 2015).

Le muscle joue un rôle important dans l'homéostasie glucidique, notamment en situation postprandiale. L'augmentation de la concentration plasmatique en AGNE due à l'impossibilité du TA à prendre en charge ces AG, entraîne une augmentation de leur captation au niveau musculaire. Si les capacités du muscle à oxyder et à stocker les AG captés ne sont pas altérées, le métabolisme musculaire ne semble pas perturbé. En revanche, dès lors que l'oxydation mitochondriale des AG est réduite, des intermédiaires lipotoxiques vont s'accumuler et perturber le métabolisme du glucose *via* l'altération de la voie de signalisation de l'insuline et l'augmentation de l'inflammation qui impliquerait l'activation de la p38MAPK (**Figure 13**). L'interaction muscle/TA joue donc un rôle clé dans la régulation du métabolisme glucidique au cours de l'obésité et l'altération de leurs fonctions respectives participent à l'apparition du SM et du diabète de type 2. La prise en charge le plus précocement possible est primordiale afin d'éviter l'apparition des dysfonctionnements métaboliques.

#### 4. Prévention et prise en charge de l'obésité

##### 4.1. Différentes approches de prévention

Les autorités de différents pays ont mis en place ou réfléchissent à des stratégies de prévention comme l'amélioration de la disponibilité des aliments sains, la taxation des aliments à haute densité énergétique et l'interdiction de leur publicité à destination des enfants, l'affichage des calories dans les menus au restaurant, et bien d'autres encore. Il est particulièrement difficile de faire une liste exhaustive des stratégies envisagées ou adoptées, celles-ci étant très nombreuses et fortement variables d'un pays à l'autre. L'importance de la culture dans l'alimentation des populations participe fortement aux différences stratégiques. Il sera donc ici question des méthodes mises en œuvre ou envisagées en France, des stratégies les plus fréquemment citées concernant la prévention chez l'individu sain et la prévention chez l'individu obèse dont l'efficacité a été évaluée (*cf.* **Tableau 4**).

**Tableau 4 : Stratégies de prévention de l'obésité**

	<b>Prévention dans la population générale</b>	<b>Prévention dans la population obèse</b>
Stratégies de collectivité	Faciliter l'accès à une alimentation saine	
	Etiquetage calorique des aliments	
	Taxer les produits riches en sucre et en graisse	
	Favoriser l'éducation des enfants dès le plus jeune âge	
	Utilisation de substituant artificiels aux sucres et aux graisses	
	Utilisation des nouvelles technologies comme vecteur d'informations	
	Interdire ou limiter la publicité alimentaire à destination des enfants	
	Approche multidisciplinaire (nutrition, activité physique, psychologie,...)	
Stratégies individuelles	-	Traitements pharmacologiques
	-	Chirurgie pour les cas sévères (BMI>40kg/m <sup>2</sup> )

#### 4.1.1. Stratégies privilégiées en France

En France, une étude s'est intéressée aux avis de différents acteurs de l'alimentation et de décisionnaires sur les stratégies prioritaires pour la prévention de l'obésité (Holdsworth *et al.* 2007). Les réformes institutionnelles (taxes des aliments à haute densité énergétique) ne sont pas vues comme pouvant être un levier significatif dans la lutte contre l'obésité, ces réformes étant considérées comme difficiles à mettre en œuvre, aussi bien d'un point de vue pratique que politique (Holdsworth *et al.* 2007). Les initiatives en relation avec l'information (étiquetage calorique, organisation en catégories « bon » ou « mauvais ») reçoivent un avis mitigé, la capacité de compréhension du consommateur et l'influence sur son comportement étant remises en cause. L'approche technologique (appareil de mesure, médication pour le contrôle du poids, utilisation de substituants artificiels aux sucres et aux graisses) n'est pas non plus considérée comme une bonne solution (Holdsworth *et al.* 2007). Le plaisir de manger et la dimension sociale sont particulièrement importants dans l'alimentation française. Les stratégies de prévention sont plus fortement orientées sur l'éducation et la recherche qui sont considérées comme peu coûteuses, bénéfiques socialement, faisables et effectives dans le changement de comportement (Holdsworth *et al.* 2007). Elles doivent concerner plus fortement les enfants que les adultes, pour inculquer dès le plus jeune âge, les bons comportements concernant la nutrition et l'activité physique.

Des plans de prévention autour de la Nutrition ont donc été proposés, dont le Plan Obésité (2010-2013, mis en place en France afin d'améliorer la prise en charge, la prévention et la recherche contre l'obésité (Ministère du Travail de l'Emploi et de la Santé 2010). Dans ce plan figurent les stratégies de prévention préconisées que sont (1) la sensibilisation des pédiatres et médecins traitants sur leur rôle dans le dépistage et la prise en charge, (2) favoriser la mise en œuvre individuelle des recommandations, (3) promouvoir l'activité physique et lutter contre la sédentarité, (4) prendre de bonnes habitudes alimentaires dans le cadre scolaire ou périscolaire, (5) former, éduquer et informer les consommateurs.

Le Plan Obésité complète le programme national nutrition santé (PNNS) mis en place en 2001 et reconduit deux fois (en 2006 et 2011). Le PNNS 2011-2015 est un plan à forte dimension interministérielle et proposent des mesures organisées en 4 axes : (1) réduire l'obésité et le surpoids dans la population, (2) augmenter l'activité physique et diminuer la sédentarité à tous les âges, (3) améliorer les pratiques alimentaires et les apports nutritionnels (notamment chez les populations à risque) et (4) réduire la prévalence des pathologies nutritionnelles (Ministère du Travail de l'Emploi et de la Santé 2011). Dans le cadre du

PNNS, une taxe sur les boissons sucrées non alcoolisées (à l'exception des sirops et des purs jus de fruits) est entrée en vigueur le 1<sup>er</sup> Janvier 2012 et a pour objectif de réduire la consommation de boissons sucrées, vecteur du développement de l'obésité. Afin d'attendre les conclusions d'un rapport, le PNNS 2011-2015 a été prolongé d'un an. Le plan suivant sera ensuite construit, son contenu et son orientation par rapport au plan actuel n'a pas encore été rendu public.

Enfin, le Programme National pour l'Alimentation (PNA) conduit par le ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt, a été initié en septembre 2010 et porte notamment sur la sécurité alimentaire (accès à une nourriture saine en quantité suffisante quel que soit le niveau social) et sur l'éducation en matière de goût, d'équilibre et de diversité alimentaire (Ministère de l'agriculture de l'agro-alimentaire et de la forêt 2010). A ces mesures s'ajoutent des dispositions plus orientées sur la qualité des productions agricoles, la vente aux restaurations collectives et en circuits courts et la préservation du savoir-faire culinaire français et du terroir.

Ces différents plans démontrent la volonté des autorités à promouvoir une alimentation saine dans la population générale, associée à une augmentation de l'activité physique et à une diminution des pratiques sédentaires. Ils ciblent tout particulièrement le consommateur afin de lui apporter les connaissances nécessaires pour faire les bons choix en matière de nutrition et d'activité physique.

#### 4.1.2. Stratégies de prévention dans la population générale et évaluation de leur efficacité

Même si l'implication de la sédentarité ou du manque d'activité physique n'est pas aussi robuste qu'attendue (*cf. paragraphe 1.4.3.*), la prévention dans la population générale basée sur l'augmentation de l'activité physique reste toutefois une stratégie très largement mise en pratique.

La promotion de l'activité physique à l'école n'a eu aucun effet sur l'IMC des enfants (Guerra *et al.* 2013). Des effets importants de la méthodologie entre les études prises en compte dans la méta-analyse (durée, intensité et type d'exercice) pourraient notamment expliquer ce résultat. En revanche, avec une prise en charge multidisciplinaire dans le cadre scolaire (auto-évaluation, éducation et politique nutritionnelles, marketing social et sensibilisation des parents), des effets protecteurs sur le développement du surpoids sont observés chez des enfants américains (Foster *et al.* 2008). La stratégie d'éducation à l'école semble donc être une bonne stratégie de prévention chez l'enfant non obèse.

La modification de l'environnement et le développement d'infrastructures urbaines pourraient également favoriser l'activité physique en incitant les déplacements à pieds et à vélo (Boarnet *et al.* 2005).

La promotion d'une alimentation saine dès le plus jeune âge fait aussi partie des stratégies utilisées par les pouvoirs publics. L'allaitement, sans distinction entre l'allaitement exclusif ou non, serait favorable à la prévention de l'obésité durant l'enfance (Yan *et al.* 2014). De plus, la durée de l'allaitement est corrélée négativement au risque d'obésité chez l'enfant (Yan *et al.* 2014). Durant l'enfance et l'adolescence, deux méta-analyses ont conclu à une faible efficacité de la promotion de la consommation de fruits et légumes sur la perte de poids, si elle n'est complétée par une stratégie de réduction des apports énergétiques issus des autres sources alimentaires (Kaiser *et al.* 2014; Mytton *et al.* 2014). Des études à plus long terme sont nécessaires afin de conclure clairement sur un effet concernant le maintien ou la perte de poids. Les résultats du PNNS ont été communiqués en Mai 2010 et sont favorables à la poursuite de ce plan. La campagne de promotion « manger-bouger » semble avoir été efficace puisque l'obésité chez l'enfant et l'adolescent s'est stabilisé entre 2000 et 2006. La consommation de sel a été réduite chez les adultes et les enfants (à l'exception de la tranche d'âge 15-17 ans). Entre 1998 et 2006, la consommation de fruits et légumes a augmenté de 10% et celle des produits sucrés a diminué de 11% et 15% chez l'adulte et l'enfant, respectivement. La promotion de la prise d'un petit déjeuner fait également partie des actions de communications du PNNS. Les résultats concernant ce point particulier ne sont pas connus à l'heure actuelle. Toutefois, deux méta-analyses disponibles dans la littérature ont confirmé l'importance du petit déjeuner et de sa composition dans la prévention de l'obésité (Horikawa *et al.* 2011; de la Hunty *et al.* 2013). La promotion d'une alimentation saine aurait donc un impact positif sur le comportement alimentaire des individus.

Une autre approche vise à modifier la réglementation en vigueur pour inciter les industries alimentaires à modifier leurs produits, ou, pour réduire la consommation d'aliments à haute densité énergétique de la population générale. L'augmentation du prix de 15 à 25% des boissons sucrées par l'application d'une taxe supplémentaire aux Etats-Unis a été proposée. Cette mesure réduirait de 15% la consommation de boissons sucrées et de 1.5% le nombre d'obèses parmi les adultes âgés de 25 à 64 ans sur une période de 10 ans (Wang *et al.* 2012). De plus, une réduction de 2,5% du nombre de nouveaux cas de diabète serait attendue avec une économie de 17,1 milliards de dollars (Wang *et al.* 2012). Une méta-analyse a montré que l'augmentation du prix des boissons sucrées s'accompagne d'une baisse de la consommation et d'une amélioration de l'IMC dans 6 études sur les 9 prises en compte

(Cabrera Escobar *et al.* 2013). Cette baisse de la consommation est toutefois accompagnée par une augmentation de la consommation de jus de fruits ou de boisson à base de lait (Cabrera Escobar *et al.* 2013), réduisant donc l'effet de cette taxe sur l'apport énergétique journalier. Plus largement, une taxe sur les produits alimentaires à haute densité énergétique (allant de 10 à 50%) a induit une baisse de la consommation de ce type d'aliments montrant la capacité d'une telle taxe à changer les habitudes alimentaires des individus et à favoriser la perte de poids (Thow *et al.* 2010). Les résultats restent toutefois à nuancer, les études prises en compte étant en grande partie des études de modélisation.

Pour limiter le développement de l'obésité chez les plus jeunes, les pouvoirs publics pourraient aussi travailler sur la proposition de lois interdisant ou limitant le marketing ciblant les enfants (Novak and Brownell 2012). Si une étude américaine a estimé que la mesure pourrait être efficace (Veerman *et al.* 2009), les effets des mesures télévisuelles prises dans certains pays ne sont pas du tout évidents (Galbraith-Emami and Lobstein 2013). De plus, même si une faible baisse de la quantité de publicités à destination des enfants pouvait être enregistrée à la télévision, les publicités *via* d'autres moyens de communication ont particulièrement augmenté durant la dernière décennie (Galbraith-Emami and Lobstein 2013).

La prévention dans la population générale ne semble être efficace que si une approche pluridisciplinaire est adoptée. La promotion de l'allaitement et la taxation des produits à haute densité énergétique sont des stratégies qui doivent être intégrées dans la lutte contre l'obésité, leur efficacité étant démontrée.

#### 4.1.3. Stratégies de prévention dans la population obèse et évaluation de leur efficacité

Les nouvelles technologies d'information et de communication faisant maintenant partie prenante du quotidien de la population générale, des stratégies de prévention peuvent être envisagées par ce biais. La réception de messages textuels contenant des recommandations (en nutrition et activité physique) a fait l'objet d'une méta-analyse sur la perte de poids chez des individus en surpoids ou obèses (Liu *et al.* 2015). Celle-ci a été significative chez les individus recevant ces messages par rapport à ceux qui n'en recevaient pas (Liu *et al.* 2015).

Chez l'enfant et l'adolescent, la prise en charge de l'obésité est basée sur l'étude de leur état de santé (risques cardiovasculaires, IR, diabète, fonctions endocriniennes, courbe de croissance et de poids), de leur comportement alimentaire (troubles alimentaires), du cadre

familial (habitudes alimentaires, dépression, antécédents familiaux d'obésité), de leur état psychologique (humeur, estime de soi) et des relations qu'ils ont avec les autres enfants (Viner and Nicholls 2005). La plupart des cas d'obésité chez l'enfant sont traités par un changement de régime mis en place par un diététicien et un suivi mensuel pour vérifier la compliance au régime alimentaire, le contrôle du poids et le comportement dans le cadre d'un programme bien défini (Viner and Nicholls 2005). Comme pour la prévention dans la population générale, l'IMC d'enfants âgés de 4 à 11 ans n'est pas amélioré si un programme diététique ou d'activité physique est préconisé seul (Williams *et al.* 2013). Mais lorsqu'ils sont intégrés dans un programme global, les effets sont significatifs (Williams *et al.* 2013). Le traitement médicamenteux est réservé aux individus pour lesquels la prise en charge multidisciplinaire n'a pas fonctionné (Viner and Nicholls 2005). Ces traitements sont les mêmes pour les enfants et les adultes. Lorsqu'ils sont associés à des recommandations alimentaires, les traitements médicamenteux au sibutramine, à l'orlistat, au phentermine, au bupropion, ou au topiramate ont montré des effets positifs sur la perte de poids dans un délai d'un an (Li *et al.* 2005). Ces différentes molécules agissent au niveau central pour réduire l'appétit, à l'exception de l'orlistat qui est un inhibiteur des lipases gastriques et intestinales. Le maintien du poids à long terme suite au traitement pharmacologique reste à déterminer.

Dans les cas d'obésité morbide ( $>40\text{kg/m}^2$ ) et de diabète de type 2, la chirurgie est une prise en charge de plus en plus envisagée. Elle est plus efficace que les traitements médicamenteux chez l'obèse (Maggard *et al.* 2005) ou chez les patients atteints de diabète de type 2 présentant une obésité modérée (Muller-Stich *et al.* 2015).

Les recherches dans le domaine de la prévention ont permis de mettre en évidence qu'une prise en charge globale et multidisciplinaire était nécessaire afin de réduire la masse pondérale des individus en surpoids ou obèses et de maintenir cette perte de poids à long terme. La prévention de l'obésité chez l'enfant peut passer ou non par le cadre scolaire et semblerait efficace. La prise en charge globale est aussi utilisée en prévention chez le sujet obèse dans le but d'éviter l'utilisation des traitements médicamenteux et dans les cas les plus sévères, la chirurgie. D'un point de vue réglementaire à l'échelle de la population, les taxes sur les produits à haute densité énergétique pourraient être une mesure intéressante qui compléterait la prévention à l'échelle de l'individu. Au-delà de l'aspect quantitatif, la qualité nutritionnelle doit être considérée.

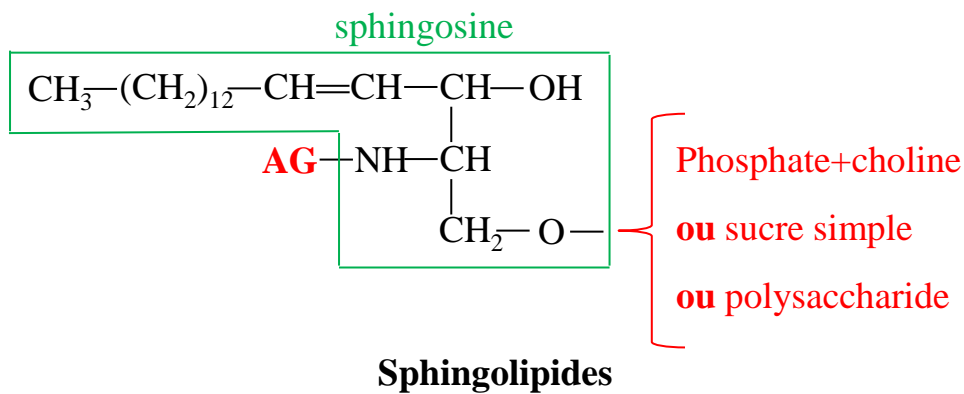
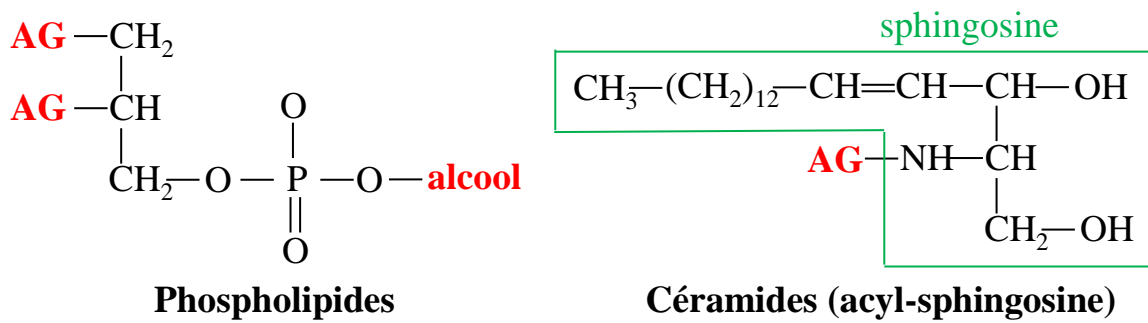
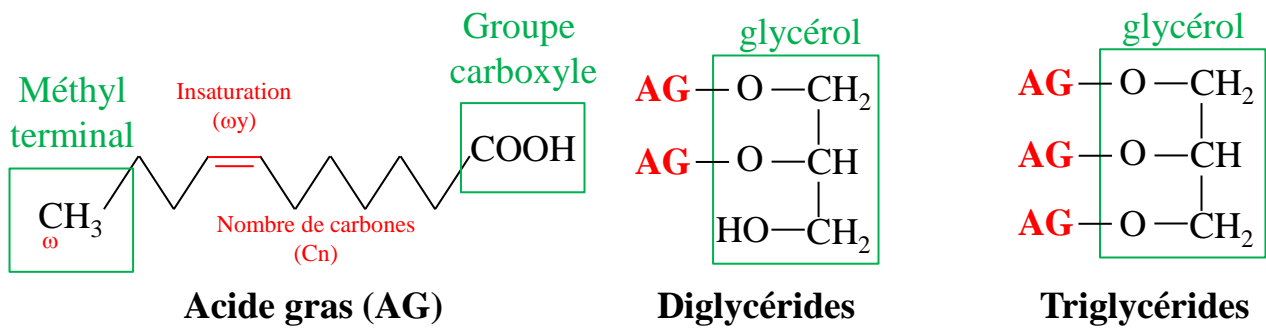


Figure 14 : Principales classes de lipides dans l'organisme



## 5. Rôles des AG dans les désordres métaboliques liés à l'obésité

### 5.1. Rappel sur les acides gras

Les AG sont les constituants des DG, TG (forme de stockage des AG), des céramides, et des PL et des sphingolipides qui constituent les membranes cellulaires (*cf.* **Figure 14**). Une immense majorité des AG sont linéaires et sont composés d'un nombre pair de carbones (4 à 36) et d'un groupement carboxyle (-COOH) (Leray 2010). Le groupement carboxyle et la chaîne carbonée confèrent aux AG des propriétés hydrophile et lipophile, respectivement. La longueur de cette chaîne va jouer un rôle important dans la solubilité des AG en milieu aqueux. Les AG à chaîne courte (nombre de carbones <8) sont très solubles dans l'eau, puis la solubilité diminue rapidement pour les AG à chaîne moyenne (nombre de carbones entre 8 et 10) et à chaîne longue (12 à 18 carbones) (Leray 2010). Au-delà de 12 carbones, la solubilité dans l'eau est fortement réduite voire nulle pour des AG présentant un nombre de carbone supérieur à 20. Pour décrire et identifier précisément un AG, il faut donner son nombre de carbones, de doubles liaisons et leur position. La chaîne carbonée peut être saturée (AG saturés, AGS) ou présenter un nombre variable d'insaturations (1 pour les AG mono-insaturés AGMI ou 2 à 6 pour les AG polyinsaturés, AGPI). En biologie, la position des insaturations est donnée à partir du groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>, ω), tandis que les chimistes numérotent les carbones à partir du groupement carboxyle (Leray 2010). Les AGMI et AGPI sont divisés en famille selon la position de la première insaturation (ωy ou n-y) en partant du groupe méthyl (-CH<sub>3</sub>, ω). La différence de nombre de carbone (C<sub>n</sub>), de nombre d'insaturation (x) et de position de la première insaturation par rapport au méthyl entre les AGMI ω9, les AGPI ω3 et ω6 permettent d'identifier chaque AG (C<sub>n</sub> :x ωy).

Sur le plan biologique, un rapport de l'ANSES sur l'actualisation des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les AG (ANSES 2011) confirme que les AG de l'alimentation à eux seuls ne peuvent pas expliquer l'augmentation de la prévalence de l'obésité. Il insiste aussi sur le fait que la nature des AG de l'alimentation peut jouer un rôle dans le contrôle du poids (ANSES 2011).

### 5.2. Impact des AGS sur l'obésité, le développement du TA et l'IR

Dans l'alimentation occidentale, les AGS représentent 15,9% de l'apport énergétique total (AET) et plus de 40% des AG totaux consommés quotidiennement dans l'alimentation

des adultes âgés de 18 à 79 ans (ANSES 2009). Ces AGS comprennent des AG à chaîne courte (acides butyrique C4 :0 et caproïque C6 :0), à chaîne moyenne (acides caprylique C8 :0 caprique C10 :0, laurique LAU C12 :0) et à chaîne longue (acides myristique MYR C14 :0, palmitique PAL C16 :0 et stéarique STE C18 :0).

La consommation d'AGS a longtemps été pointée du doigt et accusée de participer majoritairement à l'apparition de l'obésité et du SM. Elle a été positivement associée à la prise de poids chez la femme dans l'étude de cohorte *Nurses' Health Study* (Field *et al.* 2007) et à l'augmentation de l'IMC et du développement de l'obésité chez l'adulte de plus de 45 ans en association à des facteurs de risque génétique de développer une obésité (Casas-Agustench *et al.* 2014). Des points importants font qu'à l'heure actuelle la conclusion est beaucoup plus nuancée puisque l'existence d'une synthèse endogène de PAL et STE rend difficile la distinction entre l'effet de l'apport alimentaire et l'effet de la production endogène. De nombreuses études ont démontré que l'apport en AGS n'est que faiblement corrélé à la concentration en AGS dans les PL plasmatiques chez l'Homme. Une étude récente a également montré que la consommation d'AGS n'est pas associée à une augmentation du risque de diabète contrairement à la concentration plasmatique en AGS issus de la lipogenèse *de novo* (PAL et STE notamment) (Ma *et al.* 2015). Une méta-analyse a mis en évidence que la consommation d'AGS n'est pas associée à une augmentation du risque cardiovasculaire (Siri-Tarino *et al.* 2010). Dans un commentaire en lien avec cette méta-analyse, ces mêmes auteurs expliquent que réduire l'apport en AGS au profit d'un apport plus élevé en sucre serait même plus délétère notamment sur le plan cardiovasculaire, démontrant que les AGS alimentaires ne seraient pas incriminés dans les désordres métaboliques associés à l'obésité (Siri-Tarino *et al.* 2010). La baisse de l'oxydation des AG observée durant l'obésité pourrait aussi expliquer, au moins partiellement, l'augmentation de l'abondance des AGS et leur effet délétère. En effet, une étude a montré que le STE serait notamment moins oxydé que les AG de longueur de chaîne équivalente (C18) mais insaturés (OLE, LA, ALA) (DeLany *et al.* 2000). Une oxydation préférentielle des autres types d'AG pourrait donc favoriser l'augmentation des AGS dans l'organisme. Une analyse plus détaillée des effets des AGS sur l'apparition des désordres métaboliques associés à l'obésité a prouvé que tous les AGS n'ont pas le même impact métabolique. Il a notamment été mis en évidence que les AGS MYR et PAL sont nécessaires à certaines régulations post-traductionnelles (myristoylation et palmitoylation) (Rioux *et al.* 2011). Un apport alimentaire en MYR (1,2% de l'AET) aurait un effet positif sur l'activité de la désaturase impliquée dans le processus d'élongation de l'ALA en EPA (Legrand and Rioux 2010).

Dans le TA de sujets sains, des effets neutres ou protecteurs contre l'adiposité ont été démontré suite à la consommation de TG enrichis en AGS à chaîne moyenne en comparaison avec des TG riches en AG à longue chaîne (Nosaka *et al.* 2003). Le PAL induit une augmentation de la différenciation et a un effet pro-adipogénique sur des cellules embryonnaires issues de TA de souris (Petrighi Polidori *et al.* 2012). Ces effets seraient dus à une induction de l'expression génique de PPAR $\gamma$ , non retrouvée avec les AG STE et LAU à la même concentration (500 $\mu$ M) (Petrighi Polidori *et al.* 2012). A l'inverse, une autre étude a montré que les AG STE et LAU induisent bien une hypertrophie adipocytaire (Yeop Han *et al.* 2010).

Lors d'un traitement d'adipocytes humains en culture avec du PAL, la lipogénèse est augmentée ainsi que l'expression de SCD-1 responsable de la formation d'OLE à partir de STE (Collins *et al.* 2010). Ces adaptations favoriseraient la détoxification des adipocytes (Collins *et al.* 2010). Les auteurs de ce travail ont observé que certains adipocytes étaient intolérants au PAL et présentaient une moindre lipogénèse ainsi qu'une IR (Collins *et al.* 2010). Le PAL est un précurseur important des DG et des céramides responsables de la lipotoxicité intracellulaire. Un traitement au PAL à forte dose (600 $\mu$ M) induit une augmentation des céramides intracellulaires dans les adipocytes 3T3-L1 en culture (Hamada *et al.* 2014). Cette augmentation est favorable à la sécrétion d'IL-6 par les adipocytes (Hamada *et al.* 2014). A forte concentration le PAL est donc capable d'induire une réponse inflammatoire dans les cellules présentes au niveau du TA, alors qu'aucun effet n'a été démontré avec une concentration de 40 ou 100 $\mu$ M (Murumalla *et al.* 2012). Comme le PAL, une dose élevée d'AGS LAU et MYR (250 $\mu$ M) induisent la sécrétion de MCP-1 par les adipocytes 3T3-L1 en culture (Yeop Han *et al.* 2010). Le PAL induirait l'inflammation par une cascade d'activation impliquant la PKC theta (PKC $\theta$ ), activée par les DG puis le facteur de transcription NF- $\kappa$ B aboutissant à l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kennedy *et al.* 2009). La voie des MAPK et le récepteur *toll-like receptor 4* (TLR4) au lipopolysaccharide (LPS, (Kennedy *et al.* 2009)) pourraient aussi être impliqués dans l'effet inflammatoire du PAL en activant NF- $\kappa$ B.

Dans un modèle de cellules musculaires murines C2C12, Chavez *et al.* (Chavez *et al.* 2003) ont étudié l'effet de l'apport de PAL sur la signalisation de l'insuline. Dans ces myotubes, la synthèse et l'accumulation de DG et de céramides est induite par le PAL à forte dose (750 $\mu$ M). Dans ces conditions, la phosphorylation d'AKT sur le résidu sérine 473, essentielle pour l'activation de la kinase, est inhibée. A l'inverse, la cascade de signalisation

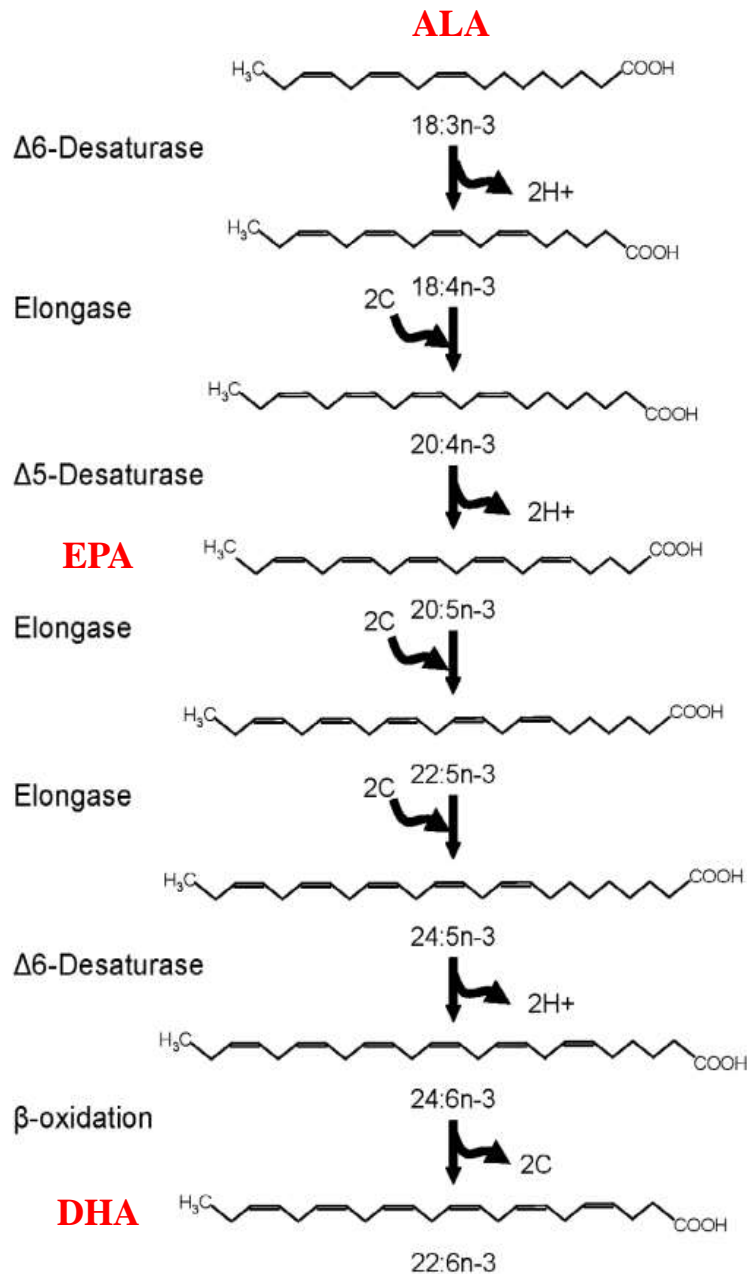


Schéma issu de Burdge et Calder, *Reproduction, Nutrition, Development*, 2005

**Figure 15 : Elongation et désaturation de l'acide alpha-linolénique (ALA)**

de l'insuline n'est pas altérée par un traitement à l'OLE à la même concentration. Par ailleurs, l'augmentation du contenu cellulaire en DG active la PKC $\theta$  et favorise la phosphorylation de la sérine 307 d'IRS-1, inhibant en amont la cascade de phosphorylation nécessaire à la signalisation de l'insuline (Zhang *et al.* 2010).

L'inflammation pourrait également jouer un rôle dans l'IR. En parallèle de la diminution de l'absorption du glucose (Barma *et al.* 2009), 750 $\mu$ M de PAL réduit aussi l'expression de GLUT4 et l'abondance de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  de NF- $\kappa$ B (Jove *et al.* 2005). Toutefois, une dose de 200 $\mu$ M de PAL ne suffit pas pour induire une IR, même si une augmentation de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  est observée. Le palmitate pourrait donc avoir un effet inflammatoire à des concentrations plus faibles que celles nécessaires à l'apparition de l'IR. L'induction par le PAL de l'inflammation dans les cellules musculaires serait due à l'activation en cascade de la PKC epsilon et de NF- $\kappa$ B (Barma *et al.* 2009). L'inhibition de cette voie par le parthénolide, inhibiteur spécifique, ou par l'inhibiteur des PKC, le phorbol myristate acétate (PMA) annule complètement l'induction de l'expression de l'IL-6 (Jove *et al.* 2005).

L'apport en excès mais surtout l'augmentation de la synthèse endogène des AGS à chaîne longue seraient donc délétères et favoriseraient la prise de poids et l'apparition de désordres métaboliques liés à l'obésité. De plus, le PAL participerait donc à l'apparition d'un état inflammatoire connu pour contribuer à l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline. Son action impliquerait l'activation des PKC et des voies inflammatoires de NF- $\kappa$ B et des MAPK. En accord avec ces observations, l'ANSES a donc déterminé un apport nutritionnel conseillé pour les AGS totaux inférieur à 12% de l'AET (ANSES 2011). Concernant le sous-groupe LAU, MYR et PAL, les apports ne doivent pas dépasser 8% de l'AET du fait de leur effet athérogène lorsqu'ils sont apportés en excès (ANSES 2011).

### 5.3. AGPI $\omega$ 3

#### 5.3.1. Elongation et désaturation

Les principaux AG de la famille des AGPI  $\omega$ 3 ( $\omega$ 3) sont l'acide alpha-linolénique (ALA, C18 :3  $\omega$ 3), et les AG éicosapentaénoïque (EPA, C20 :5  $\omega$ 3) et docosahexaénoïque (DHA, C22 :6  $\omega$ 3) à très longue chaîne qui sont obtenus par désaturations et élongations successives du précurseur ALA (Sassa and Kihara 2014) (*cf.* **Figure 15**). Chez les mammifères et principalement au niveau du foie, L'ALA est désaturé par la delta ( $\Delta$ ) 6-désaturase aussi nommée *fatty acid desaturase 2* (FADS2) avant élongation à l'aide de

l'elongase *elongation-of-very-long-chain 5* (ELOVL5) (Sassa and Kihara 2014). Une autre désaturation se produit ensuite à l'aide de la  $\Delta 5$ -désaturase (FADS1) aboutissant à la formation de l'EPA. L'addition de deux carbones par l'ELOVL2 permet la formation de l'acide docosapentaénoïque (C22 :5  $\omega 3$ , DPA) (Sassa and Kihara 2014). Une élongation, une désaturation par la  $\Delta 6$ -désaturase et une  $\beta$ -oxydation partielle dans le peroxyosome est nécessaire pour obtenir le DHA à partir du DPA. Il est important de noter qu'une rétro-conversion du DHA en EPA est également possible, comme il a été observé chez le rat (Gronn *et al.* 1991) ou chez l'homme (Brossard *et al.* 1996) *via* l'action de réductases, d'isomérasés et par  $\beta$ -oxydation partielle dans le peroxyosome.

La disponibilité des enzymes joue un rôle important dans l'efficacité de conversion des  $\omega 3$  car elles sont communes aux voies d'élongation des  $\omega 3$  et des  $\omega 6$  (Sassa and Kihara 2014). Le suivi de la conversion de l'ALA en EPA puis en DPA et DHA par l'utilisation d'un marquage isotopique au  $^{13}\text{C}$  ou au deutérium a montré que le taux de conversion de l'ALA en ces différents composés est de 0,2-6%, 0,13-6% et moins de 0,05% respectivement chez l'Homme. L'efficacité de conversion est dépendante du genre, avec une conversion plus importante chez la femme que chez l'homme (Burdge *et al.* 2002), mais aussi des variations génétiques (Lattka *et al.* 2010; Alsaleh *et al.* 2014), du tour de taille, du statut socio-économique et du tabagisme (Wagner *et al.* 2015), même si la quantité de substrat semble plus importante (Tu *et al.* 2010). Ces taux de conversion sont également dépendants du ratio  $\omega 6/\omega 3$ , puisque l'élongation et la désaturation des  $\omega 3$  et des  $\omega 6$  font intervenir les mêmes enzymes. Ceci démontre clairement l'intérêt d'optimiser les apports alimentaires en  $\omega 3$  à longue chaîne EPA et DHA (abordés dans le **paragraphe 5.3.3**).

### 5.3.2. Sources alimentaires

L'apport alimentaire en ALA et DHA est primordial puisque l'ALA n'est pas synthétisé chez les mammifères et sa conversion en DHA est particulièrement faible. Ces deux AG sont donc dits « essentiels », contrairement à l'EPA. L'ALA a pour source principale les plantes terrestres tandis que l'EPA et le DHA sont plus largement apportés par la consommation de produits d'origine marine. Abedi et Sahari (Abedi and Sahari 2014) ont proposé une revue des sources riches en  $\omega 3$ . Les huiles de lin et de Chia sont les sources végétales les plus riches en ALA (58.7 et 63g pour 100g d'huile, respectivement). Deux autres huiles issues de plantes oléagineuses ne figurent pas dans cette revue, l'huile de Perilla et de Cameline qui sont également très riches en ALA (60% (Asif 2011) et 30% (Budin *et al.* 1995)

**Tableau 5 : Sources alimentaires en ALA, EPA, DPA et DHA**

Poissons et œufs de poissons	Concentration en ALA (g pour 100g)	Concentration en EPA (g pour 100g)	Concentration en DHA (g pour 100g)	Concentration en DPA (g pour 100g)
Anchois	ND	0,538	0,991	ND
Caviar	ND	2,741	3,800	ND
Morue	ND	0,004	0,154	ND
Morue Charbonnière	ND	0,867	0,920	ND
Saumon	ND	0,690	1,457	ND
Maquereau	ND	0,504	0,699	ND
Mullet doré	ND	7,56	3,86	ND
Mollusques	Concentration en ALA (g pour 100g)	Concentration en EPA (g pour 100g)	Concentration en DHA (g pour 100g)	Concentration en DPA (g pour 100g)
Moules	ND	0,276	0,506	ND
Huîtres	ND	0,229	0,211	ND
Huîtres du Pacifique	ND	0,876	0,500	ND
Produits animaux	Concentration en ALA (en % des acides gras totaux)	Concentration en EPA (en % des acides gras totaux)	Concentration en DHA (en % des acides gras totaux)	Concentration en DPA (en % des acides gras totaux)
Muscle	2,97	1,19	1,99	0,77
Cerveau	0,04	0,17	25,0	8,05
Foie	1,61	1,45	3,42	3,98
Moelle osseuse	0,86	0,08	0,06	0,07
Viande de bœuf	0,8	0,3	0,5	ND
Viande de porc	1,4	0,3	0,5	0,3
Viande de poulet	1,7	Tr	0,8	0,8
Lait de vache	0,5	ND	Tr	ND
Œuf	0,9	ND	ND	ND
Produits végétaux	Concentration en ALA (en % des acides gras totaux)	Concentration en EPA (en % des acides gras totaux)	Concentration en DHA (en % des acides gras totaux)	Concentration en DPA (en % des acides gras totaux)
Basilic	57,4-62,5	ND	ND	ND
Graine de lin	58,7	ND	ND	ND
Graine de chia	63	ND	ND	ND
Mûre	35,2-35,3	ND	ND	ND
Framboise	29,1-32,4	ND	ND	ND
Myrtille	25,1	ND	ND	ND

des AG totaux, respectivement). Rapportée à 100g d'huile, la richesse des baies et du basilic reste assez élevée (Abedi and Sahari 2014). Parmi les sources en EPA et DHA, le caviar, le saumon, les anchois, le maquereau, les sardines et les huîtres du pacifique présentent un pourcentage d'EPA+DHA variant de 0.9 à 6.5g/100g de poisson ou crustacé (Abedi and Sahari 2014) (*cf.* **Tableau 5**). Les produits issus d'animaux terrestres tels que le muscle et le foie sont également des sources non négligeables en  $\omega_3$  avec jusqu'à 6 et 10% des AG totaux représentés par les AGPI  $\omega_3$  dans le muscle et dans le foie, respectivement. Le cerveau est riche en DHA (25% des AG totaux) et en EPA (8%). Il faut toutefois rester prudents sur ces chiffres puisqu'ils sont dépendants de l'âge, du sexe, de la race et de l'alimentation de l'animal considéré (Wood and Enser 1997).

### 5.3.3. Recommandations et intérêts pour la santé

Selon les apports nutritionnels conseillés (ANC) proposés par l'ANSES (ANSES 2011), l'ALA doit être apporté à hauteur de 1% de l'apport énergétique soit  $1.8 \text{ g.j}^{-1}$  pour 2000 kcal d'AET. La très faible conversion de l'ALA en DHA, a conduit à fixer le besoin physiologique minimal à  $250 \text{ mg.j}^{-1}$  de DHA pour un adulte (soit 0,113% de l'énergie). Les sources en DHA étant aussi riche en EPA, un ANC de  $500 \text{ mg.j}^{-1}$  pour la somme EPA+DHA est également proposé. Les apports en  $\omega_3$  sont aussi considérés en fonction des apports en  $\omega_6$  car les précurseurs de ces deux familles rentrent en compétition pour la prise en charge par les enzymes responsables de l'élongation et de la désaturation en AG à très longue chaîne. Ainsi l'ANSES préconise également que le ratio  $\omega_6/\omega_3$  ou LA/ALA soit strictement inférieur à 5 (ANSES 2011). Cette valeur de rapport est la valeur optimale pour limiter au maximum les risques cardiovasculaires mais elle est surtout indicative chez les individus atteints d'un déficit d'apport en ALA et/ou d'un excès d'apport en LA (ANSES 2011).

En Europe, les apports journaliers en EPA et DHA n'excèdent pas les  $100 \text{ mg.j}^{-1}$  chez l'adulte (Ian Givens and Gibbs 2008). En France, les apports quotidiens enregistrés dans le cadre de l'étude INCA 2 étaient de 102 mg d'EPA et 137 mg de DHA (Tressou-Cosmao *et al.* 2015). Ces apports insuffisants en AGPI  $\omega_3$  pourraient être impliqués dans le développement de certaines pathologies, les AGPI  $\omega_3$  ayant démontrés des effets bénéfiques dans le fonctionnement cérébral et dans la prévention des MCV. En effet, le DHA est abondant au niveau cérébral et contribue au bon fonctionnement du cerveau à tout âge de la vie (Stonehouse 2014). L'apport en ALA mais surtout en EPA et DHA protège des MCV par de



nombreux mécanismes dont une baisse des TG plasmatiques (Balk *et al.* 2006), du rythme cardiaque (Mozaffarian *et al.* 2005), et de l'agrégation plaquettaire (Calder 2004).

L'EPA et le DHA sont également la source de métabolites oxygénés regroupés sous les termes d'écicosanoïdes de la série 3 (dérivés de l'EPA), de résolvines (Rv), de protectines (P) et de marésines (Ma) pour les métabolites obtenus par voie enzymatique (Lagarde *et al.* 2013), et le 4-hydroxy-2E-hexenal, les isoprostanes (IsoP, dérivés de l'EPA) et les neuroprostanes (NeuroP, dérivés du DHA) pour les dérivés non-enzymatiques (Galano *et al.* 2015). L'ALA est aussi la source de dérivés obtenus par voie enzymatique *via* l'action des lipoxigénases (LOX) et cyclooxygénases (COX) et par voie non enzymatique pour la formation des phytoprostanes (Galano *et al.* 2015). Ces composés ont démontré des effets antioxydants, anti-inflammatoires et protecteurs vis-à-vis des MCV (Lagarde *et al.* 2013).

D'autres dérivés de l'EPA et du DHA ont aussi fait l'objet d'un intérêt tout particulier dans le cadre de l'obésité : les endocannabinoïdes. Ils participent à la régulation de la prise alimentaire au niveau central et au métabolisme des lipides et des glucides au niveau périphérique (TA, muscle et foie) (Maccarrone *et al.* 2010). Ces composés sont synthétisés par le transfert d'AG sur la phosphatidyléthanolamine puis l'action d'une phospholipase ou par condensation d'AG avec de l'éthanolamide sous le contrôle de la *fatty acid amide hydrolase* (Naughton *et al.* 2013). Ils agissent par fixation aux récepteurs aux cannabinoïdes (CB1R et CB2R) au niveau du système nerveux central et du muscle, et *via* les récepteurs CB1R dans le TA et le foie. Les dérivés de l'acide arachidonique (AA 20 :4  $\omega$ 6), anandamide et 2-arachidonyl glycérol, sont plus fortement synthétisés au cours de l'obésité. Ces dérivés favorisent la prise alimentaire au niveau central, la synthèse de TG et l'absorption des AG dans le TA ainsi que la réduction de l'absorption du glucose au niveau musculaire (Kim *et al.* 2013). La supplémentation d'un régime en  $\omega$ 3 favoriserait la formation d'endocannabinoïdes *eicosapentaenoyl ethanolamide* (EPEA) et *docosahexaenoyl ethanolamide* (DHEA) au détriment des dérivés de l'AA. Ils réduiraient donc les effets néfastes de ces derniers. De plus, un effet anti-inflammatoire des endocannabinoïdes dérivés des  $\omega$ 3 a été démontré dans le TA (Balvers *et al.* 2010).

#### 5.3.4. Prévention de l'obésité, de l'IR et du SM par les $\omega$ 3

##### ➤ Chez l'Homme

Afin de sélectionner les études les plus probantes, les études cliniques présentes dans ce document ont été choisies en fonction de 3 critères : les études présentant une dose d' $\omega$ 3 la

**Tableau 6 : Acides gras oméga-3, obésité et insulino-résistance chez l'Homme**

	Auteurs / Année	Sujets	Traitements	Dose, Durée	Principaux résultats	Résultats secondaires	Conclusion
Oméga-3 et données anthropo- métriques	Thorsdottir <i>et al.</i> 2007	Jeunes adultes, surpoids ou obésité	Restriction calorique + Huile de poisson	6 capsules/j Soit 1,5g/j 8 semaines	Réduction de poids supérieure avec la supplémentation.	Réduction du tour de taille et de l'IMC.	L'huile de poisson favorise la perte de poids lors d'une restriction calorique.
	Kunesova <i>et al.</i> 2006	Femmes, obésité sévère	Restriction calorique + Huile de poisson	2,8g/j 3 semaines	Réduction du poids, de l'IMC et du tour de taille vs restriction calorique seule.	Augmentation plasmatique d'EPA et de DHA. Augmentation d'un marqueur de la $\beta$ -oxydation.	Les oméga 3 favorisent la perte de poids.
	Vasickova <i>et al.</i> 2011	Enfants, obésité	DHA+EPA	300mg/j DHA + 42mg/j EPA 3 semaines	Diminution du poids corporel.	Diminution de la concentration totale de cholestérol.	Amélioration des paramètres anthropométrique et lipidique des enfants obèses.
	Spadaro <i>et al.</i> 2008	Adultes, stéatose	Restriction calorique + Huile de poisson	2g/j 24 semaines	Diminution des taux plasmatiques de TG, TNF- $\alpha$ et réduction de l'accumulation de graisse au niveau du foie.	Amélioration de la sensibilité à l'insuline	Les oméga-3 réduisent la stéatose hépatique.
	Nobili <i>et al.</i> 2012	Enfants en surpoids, stéatose	Restriction calorique + DHA	250 ou 500mg/j 36-96 semaines	Même effets des deux doses sur la réduction de la stéatose.	Baisse des TG plasmatiques. Pas d'effet sur l'IMC.	Le DHA reverse la stéatose hépatique chez l'enfant à des doses relativement faibles.
Oméga-3 et insulino- résistance	Egert <i>et al.</i> 2008	Jeunes adultes, sains	Huile de colza $\pm$ EPA ou DHA	6g/j ALA $\pm$ 2,8g/j EPA ou 2,9g/j DHA) 3 semaines	Pas d'effet des traitements sur le métabolisme glucidique.	Augmentation faible de la glycémie à jeun avec l'EPA.	Pas d'effet sur l'insulinémie et la glycémie chez des sujets sains normo-pondéraux.
	Gunnarsdottir <i>et al.</i> 2008	Jeunes adultes, surpoids ou obésité	Restriction calorique + Poisson ou Huile de poisson	Morue (0,2g/j) ou saumon (3g/j) ou Huile de poisson (1,5g/j EPA+DHA) 8 semaines	Réduction des TG avec les 3 régimes supplémentés.	Réduction du cholestérol total avec la consommation de poisson.	La restriction calorique associée à une consommation d'oméga-3 est favorable à une baisse des TG.
	Skula-Ray <i>et al.</i> 2011	Adultes, Hypertriglycéridémie modérée	EPA+DHA	0,85g/j ou 3,4g/j 8 semaines	Réduction des TG avec 3,4g/j d'oméga-3.	Pas d'effet sur la glycémie, l'insulinémie ou l'inflammation.	Effet favorable sur la triglycéridémie.
	Itariu <i>et al.</i> 2012	Adultes obésité, non diabétiques	Oméga-3	3,36g/j (460mg EPA + 380mg DHA) 8 semaines	Augmentation de production d'éicosanoïdes anti-inflammatoires, diminution des TG et IL-6 plasmatiques.	Pas d'effet sur la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose.	L'EPA et le DHA réduisent l'inflammation du tissu adipeux et plasmatique.

plus proche des recommandations, portant sur des sujets les plus jeunes possibles, mais également avec une durée de traitement la plus longue possible (supérieure ou égale à 3 semaines) ont été retenues (*cf. Tableau 6*). Lors d'une restriction calorique de 8 semaines, l'IMC et le tour de taille sont réduits uniquement chez les hommes quelle que soit la source d' $\omega 3$  considérée (poisson maigre ( $0,3 \text{ g.j}^{-1} \omega 3$ ), poisson gras ( $3 \text{ g.j}^{-1} \omega 3$ ) ou huile de poisson ( $1,5 \text{ g.j}^{-1} \omega 3$ )) par rapport à la restriction calorique seule (Thorsdottir *et al.* 2007). Chez la femme en situation d'obésité sévère, une restriction calorique de 3 semaines accompagnée de  $2,8 \text{ g.j}^{-1}$  d'oméga-3 induit une réduction plus importante du poids, de l'IMC et du tour de taille par rapport à une restriction calorique seule (Kunesova *et al.* 2006). En accord avec cette étude, une supplémentation en  $\omega 3$  pendant 3 semaines (EPA  $42 \text{ mg.j}^{-1}$  et DHA  $300 \text{ mg.j}^{-1}$ ) associée à de l'activité physique favorise la perte de poids chez d'enfants souffrant d'obésité comparativement à l'activité physique seule (Vasickova *et al.* 2011). Cependant, certaines études n'ont pas observées d'amélioration lors de la supplémentation en  $\omega 3$ . Dans le contexte particulier de la stéatose hépatique, l'IMC est également réduit après 6 mois de recommandation alimentaire mais aucune amélioration supplémentaire n'a été induite par la supplémentation de  $2 \text{ g.j}^{-1}$  en  $\omega 3$  chez des patients obèses (Spadaro *et al.* 2008). De la même manière, aucune baisse de l'IMC ou du tour de taille n'est observée en absence de recommandation alimentaire ou de restriction calorique chez des patients atteints d'obésité sévère et non diabétiques lorsqu'ils sont supplémentés quotidiennement et pendant 8 semaines en EPA et DHA ( $460 \text{ mg}$  et  $380 \text{ mg}$  respectivement) (Itariu *et al.* 2012). Dans une autre étude, la perte de poids est similaire chez des enfants atteints de stéatose hépatique qu'ils suivent un régime supplémenté en DHA ( $250$  ou  $500 \text{ mg}$ ) ou non (Nobili *et al.* 2012). Les études de supplémentation ont conduit à des résultats contradictoires en termes de modulation de l'IMC et du tour de taille. Toutefois, une méta-analyse d'essais contrôlés et randomisés sur l'effet de la consommation de poisson ou d'huile de poisson a montré un effet significatif sur le poids ( $-0,59 \text{ kg}$  vs témoins), le tour de taille ( $-0,81 \text{ cm}$ ), l'IMC ( $-0,24 \text{ kg/m}^2$ ) et le pourcentage de masse grasse ( $-0,49\%$ ) comparativement au groupe témoin (Bender *et al.* 2014).

Concernant l'IR et le SM, aucune donnée actuellement disponible ne permet de conclure clairement à un effet bénéfique global des  $\omega 3$  chez l'Homme (Flachs *et al.* 2014). Trois semaines de régime riche en ALA ( $2,5\%$  de l'AET), en EPA ( $1,1\%$  de l'AET) ou en DHA ( $1,1\%$  de l'AET) n'ont pas modulé la glycémie à jeun chez des sujets sains (Egert *et al.* 2008). En revanche, il a été clairement démontré que l'apport en huile de poisson (Gunnarsdottir *et al.* 2008), ou en EPA et DHA (Skulas-Ray *et al.* 2011), favorise la baisse

**Tableau 6 Suite**

Auteurs / Année	Sujets	Traitements	Dose, Durée	Principaux résultats	Résultats secondaires	Conclusion
Hutchins <i>et al.</i> 2013	Adultes, pré-diabètes	Graines de lin riches en ALA	2,9g/j ou 5,8g/j ALA 12 semaines	Amélioration de la glycémie à jeun, de l'insulinémie et de la sensibilité à l'insuline avec 2,9g/j.	Pas le même effet avec 5,8g/j de graines de lin.	L'apport en graine de lin favorise la sensibilité à l'insuline chez des patients en surpoids ou obèse pré-diabétiques.
Effet de l'ALA	Nieman <i>et al.</i> 2009	Graines de chia riches en ALA	8,8g/j ALA 12 semaines	Aucun effet sur l'inflammation la lipidémie et la composition corporelle.	Augmentation des concentrations plasmatiques en ALA.	Stratégie nutritionnelle « ALA+ fibres » non recommandée pour induire une perte de poids.
	Muramatsu <i>et al.</i> 2010	Adultes sains	Etude d'observation	-	Diminution du risque relatif d'insulino-résistance avec l'augmentation de la consommation d'ALA.	Seulement chez les individus sans problèmes de surpoids ou d'obésité.

des TG plasmatiques chez des sujets en surpoids ou obèse et en restriction calorique ou chez des sujets sains, respectivement. Une intervention nutritionnelle de 8 semaines comprenant 460mg.j<sup>-1</sup> d'EPA et 360mg.j<sup>-1</sup> de DHA chez des individus obèses non diabétiques a permis une augmentation de la sécrétion de prostaglandines anti-inflammatoires et une diminution de la concentration plasmatique en TG et en IL-6 (Itariu *et al.* 2012). Les études disponibles sur l'ALA ont abouti à des résultats contradictoires. Une baisse de la glycémie à jeun et une augmentation de la sensibilité à l'insuline ont été observées chez des individus obèses pré-diabétiques consommant 13g de graines de lin moulues par rapport à des sujets non supplémentés ou supplémentés avec 26g de ces mêmes graines, suggérant qu'un apport trop important n'est pas recommandé (Hutchins *et al.* 2013). Une autre étude n'a pas mis en évidence d'effet lors de la consommation de graine de chia (25g.j<sup>-1</sup>) chez des adultes en surpoids par comparaison avec des adultes consommant un placebo isoénergétique (Nieman *et al.* 2009). Une étude d'observation portant sur la consommation d'ALA, EPA et DHA dans une population japonaise a montré qu'un apport d'ALA à hauteur de 1.16% de l'AET était associé à une meilleure sensibilité à l'insuline, tandis que les apports en EPA+DHA (0,88 et 0,36% de l'AET, respectivement) ne modifiaient pas la sensibilité à l'insuline (Muramatsu *et al.* 2010).

Chez l'Homme, les  $\omega 3$  ont des effets intéressants au niveau cérébral et cardiovasculaires (que nous n'aborderons pas ici), mais peinent à démontrer des effets nets sur l'obésité et le SM. Seule l'amélioration de la triglycéridémie a été clairement démontrée (Hartweg *et al.* 2009). En revanche, les effets semblent plus clairement établis dans les études animales (*cf.* **Tableau 7**).

#### ➤ Chez l'animal

Chez l'animal, les investigations portent le plus souvent sur l'utilisation d'EPA, de DHA ou d'huile de poisson. L'ALA n'a été que très peu étudié. La supplémentation en  $\omega 3$  permet généralement de réduire la prise de poids ou de masse grasse viscérale que ce soit chez la souris génétiquement obèse, ou lors d'une induction de l'obésité à l'aide d'un régime riche en graisse (*high-fat*, HF), ou riche en sucre et en graisse (*high-fat/high-sucrose*, HF/HS). Ainsi, lorsque 5g pour 100g du poids du régime est remplacée par de l'EPA, une moindre prise de poids est observée chez la souris soumise à un régime obésogène (Sato *et al.* 2010). Avec une supplémentation en EPA de 3,6g pour 100g de nourriture ou en huile de poisson (8g/100g) chez la souris sous régime HF, le même effet est retrouvé ((LeMieux *et al.* 2015), (Mori *et al.* 2007) respectivement). Au cours d'un régime riche en sucre (57,5g pour 100g), la

**Tableau 7 : Acides gras oméga-3, obésité et insulino-résistance chez l'animal**

Auteurs / Année	Modèle	Régime	Dose, Durée	Principaux résultats	Résultats secondaires	Conclusion	
Effet de l'EPA et du DHA sur l'obésité	Sato <i>et al.</i> 2010	Souris mâles C57BL/6	Régime HF-HS + EPA	25% de lipides dont 5% substitués par de l'EPA et 32,5% de sucres, 4-20 semaines	Réduction du poids de l'hyperglycémie et de l'insulinémie avec l'EPA.	Pas d'effet lors d'un régime HF à 38,1% de lipides et 8,5% de sucres.	Les paramètres du syndrome métabolique sont améliorés par l'EPA.
	Le Mieux <i>et al.</i> 2015	Souris mâles C57BL/6	Régime HF + EPA	45% de lipides supplémentés avec de l'EPA (3,6g/100g de nourriture), 5 semaines	Réduction du poids et de l'adiposité.	Réduction de l'infiltration de macrophages dans le TA.	L'EPA prévient l'obésité induite par un régime HF.
	Mori <i>et al.</i> 2007	Souris C57BL/6	Régime HF + Huile de poisson	30% de lipides supplémenté à 8g pour 100g de nourriture en huile de poisson, 20 semaines	Réduction du poids des animaux sous régime supplémenté en huile de poisson.	Augmentation du catabolisme dans les cellules intestinales.	L'huile de poisson réduit l'effet obésogène d'un régime riche en graisse.
	Peyron-Caso <i>et al.</i> 2003	Rats mâles Sprague-Dawley	Régime HS + Huile de poisson	57,5g/100g de sucres et 14g/100g d'huile de poisson, 3 semaines	Réduction de la masse adipeuse épидимale et rétro-péritonéal.	Réduction de la lipogenèse dans le tissu adipeux rétro-péritonéal.	L'huile de poisson contribue à la réduction de la masse grasse viscérale.
	Liu <i>et al.</i> 2013	Rats mâles Sprague-Dawley	Régime HF	40% de lipides Ratio $\omega 6/\omega 3$ 1:1 (8,3g/100g chacun), 16 semaines	Réduction de la masse grasse viscérale par rapport au régime HF $\omega 6/\omega 3$ 4:1.	Amélioration de la glycémie et de l'insulinémie vs 4:1.	Le régime enrichi en $\omega 3$ prévient l'obésité et l'insulino-résistance.
	Hoper <i>et al.</i> 2013	Souris mâles C57BL/6	Régime HF + EPA/DHA	46% de lipides supplémentés en EPA+DHA à 0,2g pour 100g de nourriture sous forme d'esters éthyliques ou 1g pour 100g d'esters de cire, 20 semaines	Réduction du poids et de la masse adipeuse avec les esters de cire. Pas d'effet de l'EPA+DHA.	Amélioration de la tolérance au glucose et l'inflammation du tissu adipeux uniquement avec les esters de cire.	Les effets observés ne peuvent pas être attribués exclusivement à l'EPA et au DHA dans la fraction d'esters de cire.
	Philp <i>et al.</i> 2015	Souris C57BL/6	Régime HF + Huile de poisson	59,6% de lipides dont 7,5% substitués par de l'huile de poisson, 14 semaines	Gain de poids identique quel que soit le régime HF.	L'huile de poisson favorise l'activation des gènes de l'oxydation des lipides dans le muscle.	L'huile de poisson a un effet protecteur sur les dérégulations induites par le régime HF.

graisse viscérale est réduite chez le rat supplémenté avec de l'huile de poisson (14g pour 100g de nourriture) (Peyron-Caso *et al.* 2003). Une baisse simultanée du poids et de la masse grasse viscérale a également été observée chez le rat en réduisant le ratio  $\omega_6/\omega_3$  à 1 :1 (8,3g/100g chacun, apportés respectivement par de l'huile de bourrache et de l'ALA purifié) comparativement à un régime HF dépourvu d' $\omega_3$  et d' $\omega_6$  ou avec un ratio  $\omega_6/\omega_3$  de 4 :1 (Liu *et al.* 2013). Néanmoins, certaines études publiées n'ont pas mis en évidence d'effet favorable de la supplémentation en  $\omega_3$  sur la prise de poids et la masse grasse en condition de diète obésogène (Hoper *et al.* 2013; Lanza *et al.* 2013; Philp *et al.* 2015). Si la plupart des études ont porté sur les effets de l'EPA et du DHA, peu de travaux se sont focalisés sur l'ALA. Les deux expériences retrouvées n'ont pas montré d'effet de l'ALA sur le poids des animaux (souris (Enos *et al.* 2014) et rats (Ikeda *et al.* 1998)) dans le cadre d'un régime HF avec substitution d'une partie des AG par l'ALA.

Les paramètres du SM sont également améliorés dans de nombreuses études animales sur les  $\omega_3$ . La tolérance au glucose et donc la capacité à sécréter de l'insuline pour permettre la baisse de la glycémie postprandiale ou post injection est améliorée par le remplacement du lard (10% de l'AET) par de l'EPA et du DHA chez des hamsters dorés sous régime HF (Kasbi Chadli *et al.* 2011). Dans cette étude, les teneurs plasmatiques en TG et cholestérol sont aussi réduites. La substitution de 3,4% de l'AET par de l'huile de poisson dans un régime HF chez la souris a permis une amélioration de la tolérance au glucose (Lanza *et al.* 2013). Cette amélioration a aussi été observée dans un modèle d'obésité plus modérée où 10% de l'AET est apportée par de l'huile de poisson (Jelinek *et al.* 2013).

Globalement, les études chez l'Homme et l'animal ont conjointement démontré un effet hypotriglycéridémiant des  $\omega_3$ . Une moindre prise de poids et de masse grasse viscérale ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose ont été observées uniquement chez l'animal. D'autres études seront nécessaires pour conclure clairement sur ces effets. Pour mieux les caractériser, il est crucial d'étudier les tissus qui sembleraient impliqués, tel que le muscle squelettique qui participe à la captation du glucose lors de la stimulation par l'insuline, et le TA, lieu privilégié de stockage des lipides qui contribue à l'altération du métabolisme du muscle et du foie en cas d'anomalie de stockage des AG.

## Tableau 7 Suite

Auteurs / Année	Modèle	Régime	Dose, Durée	Principaux résultats	Résultats secondaires	Conclusion	
Effet de L'ALA	Enos <i>et al.</i> 2014	Souris mâles C57BL/6	Régime HF + ALA	40% de lipides dont 4,7% apportés sous forme d'ALA, 20 semaines	Pas d'amélioration du poids avec l'apport en ALA.	Pas d'amélioration de la masse grasse avec l'apport en ALA.	Réduire le rapport $\omega 6/\omega 3$ avec l'ALA n'a pas d'effet suffisant pour atténuer le développement de l'obésité et du diabète de type 2.
	Ikeda <i>et al.</i> 1998	Rats mâles Sprague-Dawley	Régime normal + ALA, EPA ou DHA	10% de lipides dont 10% sont apportés sous forme d'ALA, EPA ou DHA, 2 semaines	Augmentation de l'oxydation par l'EPA et réduction de l'activité lipogénique par l'EPA et le DHA.	Pas d'effet des oméga-3 sur le poids.	Effets différentiels des oméga-3 sur la lipogénèse hépatique, l'oxydation et la synthèse de glycérol.
Oméga-3 et IR	Kasbi Chadli <i>et al.</i> 2011	Hamsters mâles dorés	Régime HF + EPA et DHA	45% de lipides dont 10% substitués par de l'EPA et du DHA, 20 semaines	Amélioration de la tolérance au glucose.	Réduction des TG musculaires et plasmatiques. Amélioration du statu inflammatoire du tissu adipeux.	Les oméga-3 préviennent des perturbations métaboliques induites par le régime HF.
	Lanza <i>et al.</i> 2013	Souris mâles C57BL/6	Régime HF + Huile de poisson	60% de lipides dont 3,4% substitués par de l'huile de poisson, 10 semaines	Amélioration de la tolérance au glucose.	Augmentation de l'abondance des mitochondries et de l'oxydation mitochondriale dans le muscle.	Les oméga-3 protègent de l'insulino-résistance induite par le régime HF.
	Jelinek <i>et al.</i> 2013	Souris mâles C57BL/6	Régime HF + Huile de poisson	45% de lipides dont 10% substitués par de l'huile de poisson, 30 semaines	Amélioration de la tolérance au glucose.	Amélioration du statut hépatique (Cholestérol, TG)	Les oméga-3 améliorent la tolérance au glucose et réduisent la stéatose hépatique.



## 5.4. Oméga-3 et altération du métabolisme adipocytaire

### 5.4.1. Modification de l'expansion et du profil sécrétoire des adipocytes

Le TA jouant un rôle central dans le stockage des AG et leur distribution aux autres organes, l'étude des effets des  $\omega 3$  sur la capacité de différenciation des adipocytes et sur leur métabolisme est de première importance. Les modèles *in vitro* permettent notamment de caractériser les effets propres de chaque  $\omega 3$  sur la différenciation adipocytaire. L'EPA semblerait induire une réponse visant à réduire l'adipogenèse des adipocytes 3T3-L1 puisqu'il diminue l'expression de PPAR $\gamma$  et de C/EBP $\alpha$  sans toutefois affecter le degré de différenciation (Tanabe *et al.* 2008). Ces effets n'ont pas été observés avec le DHA à concentration identique (Tanabe *et al.* 2008). Des gènes connus pour être associés à la formation des gouttelettes lipidiques, et induits par l'AG STE tels que PPAR $\gamma$ , SCD-1, Cidea, sont sous-exprimés en présence d'EPA à 100 $\mu$ M, signe d'une moindre différenciation adipocytaire (Manickam *et al.* 2010). Dans cette étude, la taille des gouttelettes lipidiques sous EPA est significativement réduite par rapport à celle des adipocytes 3T3-L1 traités aux acides STE et OLE à la même concentration (Manickam *et al.* 2010). Il a été démontré que le DPA qui s'accumule dans des cellules exposées à l'EPA pourrait être le médiateur des effets de ce dernier (Murali *et al.* 2014). Au contraire, l'expression des gènes de la différenciation dans le groupe traité au DHA (50 $\mu$ M) est augmentée comparativement aux groupes traités à l'EPA ou à l'OLE à une concentration équivalente (Murali *et al.* 2014). Le DHA induit la différenciation des adipocytes 3T3-L1 *via* une inhibition des MAPK, impliquées dans la phase tardive de différenciation (Murali *et al.* 2014). Pourtant, Kim *et al.* ont montré que 100 $\mu$ M de DHA induit l'apoptose des cellules avant le stade de différenciation et réduit l'accumulation de lipides dans la même lignée adipocytaire (Kim *et al.* 2006). Le DHA a aussi limité l'accumulation de lipides ainsi que le nombre de gouttelettes lipidiques dans les cellules 3T3-L1 (Kim *et al.* 2006). Une lipolyse accrue est accompagnée d'une activation de PPAR $\alpha$  ainsi que de l'induction de la protéine découplante UCP2 lors de l'incubation des adipocytes avec du DHA à 100 $\mu$ M (Kim *et al.* 2006).

La cellularité influençant directement le profile sécrétoire des adipocytes, Oster *et al.* ont confirmé une sécrétion plus élevée d'adiponectine dans les cellules traitées avec 125 $\mu$ M de DHA ou d'EPA par rapport à des cellules traitées avec une même concentration de PAL (Oster *et al.* 2010). Un effet plus marqué sur la sécrétion d'adiponectine a été observé avec le DHA comparé à l'EPA. Le DHA augmenterait l'expression génique de PPAR $\gamma$ , connu pour être impliqué dans l'activation du gène de l'adiponectine (Oster *et al.* 2010). Néanmoins, ni

les taux protéiques, ni l'activité de PPAR $\gamma$  n'ont été mesurés dans cette étude. Les voies impliquées dans l'induction de la sécrétion de l'adiponectine mériteraient de plus amples investigations notamment pour expliquer l'effet différentiel de l'EPA et du DHA. Ces résultats suggèreraient une amélioration du profil sécrétoire et pourraient être liée à une moindre cellularité.

*In vivo*, l'apport en  $\omega$ 3 modulerait l'hyperplasie et l'hypertrophie du TA et pourrait ainsi limiter la prise de masse grasse lors d'un régime hypercalorique. Le poids corporel et la masse grasse sont réduits par une forte supplémentation en  $\omega$ 3 (EPA/DHA, 6.7% ou 19.6% de l'AET) d'un régime HF chez la souris (Ruzickova *et al.* 2004). Chez le rat, le poids et le volume du TAe et du TA périrénal sont diminués lors d'un régime HF dont 3.6% de l'AET ont été apportés par l'EPA et le DHA (Rokling-Andersen *et al.* 2009). Un régime HF, où 15% de l'apport énergétique sous forme de graisse sont remplacés par de l'EPA, a induit des effets similaires chez la souris (LeMieux *et al.* 2015). L'hypertrophie des adipocytes dans le TAe et dans une moindre mesure dans le TA dorsolombaire est diminuée chez les souris sous régime HF supplémenté en  $\omega$ 3 (EPA/DHA 6.7% ou 19.6% de l'AET) (Ruzickova *et al.* 2004). De nombreuses études ont observé les mêmes effets chez le rat (Tekeleselassie *et al.* 2013; Guelzim *et al.* 2014; Lionetti *et al.* 2014) ou la souris (Liu *et al.* 2014; Zhao and Chen 2014) soumis à un régime HF. Afin d'étudier *in vivo* la prolifération et la différenciation des préadipocytes, un modèle de souris présentant une désactivation transitoire de PPAR $\gamma$  au niveau adipeux a permis l'exploration de l'impact des  $\omega$ 3 sur la prolifération et la différenciation des adipocytes *in vivo* (Hensler *et al.* 2011). La désactivation de PPAR $\gamma$  entraîne la mort des adipocytes matures permettant ainsi d'étudier la formation des nouveaux adipocytes. Six semaines après l'inactivation de PPAR $\gamma$ , la substitution de 15% de lipides par des  $\omega$ 3 (46% de DHA, 14% d'EPA), a significativement réduit l'hypertrophie cellulaire comparée au régime HF non supplémenté (Hensler *et al.* 2011). La forme adoptée pour les apports en  $\omega$ 3 pourrait avoir un effet sur la cellularité, les travaux d'Awada *et al.* ayant montré qu'un apport sous forme de PL était beaucoup plus favorable à une baisse de la cellularité que sous la forme de TG dans un régime HF relativement modéré (20% de l'AET) (Awada *et al.* 2013). En accord avec les données obtenues *in vitro* (Tanabe *et al.* 2008), l'expression génique de C/EBP $\alpha$  et de la leptine est réduite et serait associée à une moindre adipogenèse lorsque 15% de l'AET est apporté par de l'EPA chez la souris sous régime HF (LeMieux *et al.* 2015). La sécrétion d'adiponectine qui est associée à une cellularité plus faible, est diminuée dans un régime HF par rapport à un régime témoin tandis que l'ajout

d'ω3 dans le régime permet de restaurer la concentration plasmatique d'adiponectine des souris (Todoric *et al.* 2006).

En résumé, la réduction du nombre et de la taille des adipocytes induite par les ω3 serait favorable à une moindre accumulation de lipides par une apoptose des préadipocytes, une moindre différenciation et une meilleure oxydation des lipides. Les études *in vivo* ont plus largement étudié l'impact des ω3 (EPA+DHA) sur l'adiposité. Cependant, l'ALA, l'EPA et le DHA pourraient avoir des effets spécifiques comme suggéré par les résultats *in vitro* de Murali. Enfin, la taille des cellules ayant une influence sur le profil sécrétoire des adipocytes, la réduction de l'hypertrophie devrait favoriser une normalisation de l'inflammation.

#### 5.4.2. Réduction de l'inflammation locale

*In vitro*, le DHA permet d'inhiber l'expression de facteurs chimiotactiques responsables de l'infiltration des macrophages (MCP-1 et *serum amyloid A* (SAA3)) dans les adipocytes 3T3-L1 et par un mécanisme dépendant de PPARγ (Yeop Han *et al.* 2010). Dans ce même modèle, le DHA inhibe l'induction de la voie pro-inflammatoire NF-κB suite à un traitement au PAL. L'EPA et le DHA à 50μM réduit l'activation de la p38MAPK et le nombre de macrophages de type M1 (Oliver *et al.* 2012). En co-culture avec des adipocytes, ces mêmes macrophages traités au LPS et au DHA présente une sécrétion d'IL-6 réduite comparativement au LPS seul (Oliver *et al.* 2012).

*In vivo*, la substitution de 40% des graisses d'un régime HF (30% de l'AET) par des TG enrichis en EPA et DPA inhibe l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (marqueurs des macrophages, récepteur au LPS) chez des souris *db/db* hyperphagiques et obèses par rapport à un régime HF supplémenté en AGMI (Todoric *et al.* 2006). Dans le même temps, la supplémentation en ω3 a significativement réduit l'infiltration des macrophages dans le TA (Todoric *et al.* 2006). Une étude plus récente a confirmé cette moindre infiltration lors d'un régime HF où 15% de l'apport énergétique sont substitués par de l'EPA (LeMieux *et al.* 2015). De plus, des souris *fat-1* synthétisant de manière endogène de grandes quantités d'ω3, nourries avec un régime à 60% de l'AET sous forme de lipides, sont moins touchées par l'infiltration de macrophages dans le TA. Ces macrophages expriment aussi moins de marqueurs du profil M1 par rapport aux souris sauvages (Belchior *et al.* 2015). L'induction de la production endogène d'ω3 a aussi favorisé une baisse de l'activation de la voie NF-κB (Belchior *et al.* 2015). Ces effets sembleraient indépendants de l'activation de PPARγ, l'inhibition avec un antagoniste ou le *knock out* (KO) du gène n'ayant



- ↓ Taille des adipocytes
- ↓ Lipolyse et relargage d'AGI
- ↑ Lipogenèse
- ↓ Sécrétion de leptine
- ↓ Sécrétion d'IL-6
- ↓ Inflammation
- ↑ Sécrétion d'adiponectine
- ↑ Oxydation des lipides
- ↓ Infiltration macrophages
- ↑ Profil M2  
des macrophages

**Figure 16 : Effet des oméga-3 sur le métabolisme de l'adipocyte blanc**

pas démontré d'effet (Belchior *et al.* 2015). Dans la littérature, l'ALA n'a été que très peu étudié et les données manquent quant à son effet sur l'inflammation du TA. Seule une étude d'Enos *et al.* est disponible. Lors d'un régime HF chez la souris, où le ratio  $\omega 3:\omega 6$  est de 1:1, l'ALA (seule source d' $\omega 3$ ) ne permet pas d'améliorer le statut inflammatoire, l'infiltration ou le profil M1 des macrophages du TA (Enos *et al.* 2014).

Les  $\omega 3$  permettraient de limiter l'accumulation de masse grasse, notamment au niveau viscéral. Ils favoriseraient l'utilisation des AG et la réduction de leur relargage dans la circulation. Ils restaureraient également le profil sécrétoire et inflammatoire des adipocytes (*cf.* **Figure 16**). Ces effets auraient donc des conséquences favorables sur d'autres tissus dont le muscle, contributeur majeur de l'absorption postprandiale de glucose. Si les  $\omega 3$  exercent également des effets spécifiques dans le muscle, ils pourraient contribuer à l'optimisation du fonctionnement de ce tissu.

### 5.5. Oméga-3 et altération du métabolisme musculaire

Les effets que les  $\omega 3$  ont sur différents paramètres du SM pourraient aussi être liés à un effet bénéfique sur l'IR au niveau du tissu musculaire. Ils pourraient moduler la captation, le stockage ou l'oxydation des lipides. En association avec la diminution du relargage des AG par le TA, cela pourrait réduire le contenu intracellulaire en composés lipotoxiques défavorables à la sensibilité à l'insuline. Les  $\omega 3$  ayant également des effets anti-inflammatoires reconnus, une réduction de l'inflammation pourrait également participer à l'amélioration du métabolisme musculaire.

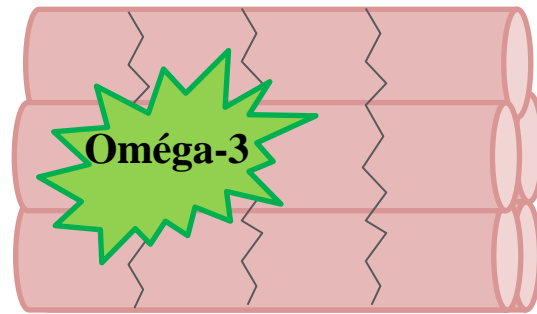
Dans un modèle *in vitro* de cellules musculaires de rat, Lam *et al.* se sont intéressés à la combinaison, ou à l'utilisation séparée, de PAL ou de DHA sur la sensibilité à l'insuline (Lam *et al.* 2011). Le PAL diminue l'absorption de glucose tandis que l'ajout de DHA permet de prévenir cet effet. Étonnamment, le DHA seul entraîne une augmentation de la quantité de céramides. Le DHA additionné au PAL entraîne une augmentation de la quantité de TG mais atténue l'effet du PAL sur l'accumulation de DG. La dose élevée de DHA (400 $\mu$ M) pourrait expliquer l'augmentation des céramides intracellulaires, les doses habituellement utilisées se situant plus généralement entre 50 et 100 $\mu$ M. L'augmentation du contenu intracellulaire en céramides par le DHA est liée à la stimulation de l'activité de la sphingomyélinase (Lu *et al.* 2010) tandis que la synthèse *de novo* par la céramide synthase est favorisée par le PAL. Ces sources de céramides auraient des effets métaboliques différents et le DHA pourrait induire

une  $\beta$ -oxydation plus importante expliquant son effet moins délétère comparativement au PAL. L'expression de SCD-1 est réduite de manière non significative par le DHA (-33%) et l'expression de l'AMPK $\alpha$ 2 impliquée dans l'activation de la  $\beta$ -oxydation des AG est significativement augmentée. Les auteurs ont conclu à un effet favorable des AGPI  $\omega$ 3 sur la  $\beta$ -oxydation *via* l'AMPK $\alpha$ 2 et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Dans une autre étude, 24h d'incubation avec une dose supra-physiologique d'EPA (600 $\mu$ M) augmente l'absorption du glucose et son oxydation au détriment de la synthèse de glycogène dans des cellules musculaires humaines (Aas *et al.* 2006). Une augmentation de l'absorption des lipides et de la synthèse de lipides complexes en faveur de l'oxydation a également été observée dans les mêmes conditions (Aas *et al.* 2006). A des doses plus physiologiques, la sensibilité à l'insuline est complètement restaurée avec l'ajout de 30 $\mu$ M de DHA lors d'un traitement au PAL. Cette amélioration est associée à une inhibition des voies inflammatoires NF- $\kappa$ B et p38MAPK, induisant ainsi une diminution de l'expression génique d'IL-6 et de la COX2 (Capel *et al.* 2015). L'activation de la PKC $\theta$  est réduite dans cette étude. Cette réduction serait liée à la diminution du contenu intracellulaire en céramides comme démontré lors de l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse de céramide, la myriocine (Capel *et al.* 2015).

*In vivo*, les recherches sur les  $\omega$ 3 et le métabolisme musculaire ont principalement concerné l'EPA et le DHA. Lors d'un régime HF riche en AGS, le remplacement de 7,5% des lipides par de l'huile de poisson a réduit le contenu en lipides du *soleus* (muscle oxydatif) et du *quadriceps* (muscle mixte) chez la souris (Philp *et al.* 2015). Une baisse des lipides intramusculaires chez le rat a également été observée, lors d'une substitution de 21% des AG par de l'huile de poisson dans un régime HF (Lionetti *et al.* 2014). Avec un régime HF plus modéré dont 3.6% des lipides sont substitués par de l'EPA, l'accumulation intracellulaires de TG est réduite (Bertrand *et al.* 2013). Dans un régime HF similaire mais où seulement 3.4% ont été remplacés par un apport en EPA+DHA, le contenu en céramides intracellulaires est significativement réduit (Lanza *et al.* 2013). Ces études démontrent l'effet bénéfique des  $\omega$ 3 sur la réduction des lipides intracellulaires qui devrait s'accompagner d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. La sensibilité à l'insuline des souris *fat-1* est également améliorée sous régime HF contrairement aux souris sauvages qui n'ont pas la capacité de synthétiser en quantité importante des  $\omega$ 3 (White *et al.* 2010). Dans un régime contenant seulement 10% de lipides et où 2% de l'AET est apporté par gavage avec de l'huile riche en DHA, la sensibilité à l'insuline et l'activation de la voie AKT dans le muscle stimulé à l'insuline sont améliorées (Capel *et al.* 2015). De nombreux mécanismes sous-jacents ont été proposés. L'oxydation

mitochondriale permettrait d'éviter l'accumulation de composés lipotoxiques et pourrait ainsi participer au maintien de la sensibilité à l'insuline musculaire. Les  $\omega 3$  d'origine marine favoriseraient l'utilisation des AG par le muscle *via* l'augmentation de l'expression des gènes de l'oxydation mitochondriale (PGC1 $\alpha$ , CPT1, UCP3 et PPAR $\alpha$ ) (Bertrand *et al.* 2013; Lanza *et al.* 2013; Philp *et al.* 2015) indépendamment du type de muscle (*soleus* oxydatif, ou *extensor digitorum longus* glycolytique). Toutefois, la respiration mitochondriale n'est pas affectée tandis que l'expression génique de PPAR $\gamma$  est augmentée dans un régime HF où seulement 3.4% ont été remplacés par un apport en EPA+DHA (Lanza *et al.* 2013). L'inhibition de la voie inflammatoire *c-jun N-terminal kinase* (JNK) et l'augmentation des concentrations en  $\omega 3$  et dérivés oxygénés anti-inflammatoires pourraient également expliquer leurs effets bénéfiques (White *et al.* 2010). Cependant, certaines études n'ont pas observé d'améliorations du métabolisme musculaire lors de la supplémentation en  $\omega 3$ . Un remplacement de 90% des graisses par de l'huile de poisson dans un régime à 60% d'énergie sous forme de lipides n'a montré aucun bénéfice en comparaison du régime HF à base de lard, que ce soit sur le métabolisme musculaire du glucose ou des lipides chez la souris (Fiamoncini *et al.* 2013). Dans d'autres études chez la souris sous régime HF, le remplacement de 15% des lipides par un mélange d'EPA et de DHA (14% et 46%, respectivement) n'a entraîné aucun bénéfice au niveau musculaire (*soleus* et *gastrocnemius*) (Kuda *et al.* 2009; Horakova *et al.* 2012). Des résultats similaires ont été observés chez le rat soumis à un régime HF avec ou sans l'apport de 3g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> d'EPA+DHA (Feillet-Coudray *et al.* 2013).

Les effets concernant l'ALA lors d'un régime obésogène restent très mal connus. Le contenu en TG et l'activation de la PKC $\theta$  dans le *gastrocnemius* de rat est réduit lors d'un apport de 23% de l'AET provenant d'huile de chia comparée à de l'huile de maïs dans un régime riche en sucrose (Oliva *et al.* 2013). L'ALA maintiendrait la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire lors d'un régime à 16% de lipides dont 10% étaient apportés par de l'huile de lin chez le rat Zucker obèse (Matravadia *et al.* 2014). Là encore, plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de l'ALA. Il réduirait l'expression d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  et de PPAR $\gamma$  au niveau musculaire lorsqu'il est apporté par 3% ou 1.5% d'huile de lin (rapport  $\omega 6/\omega 3$  de 1:1 et de 2,5:1, respectivement) en comparaison avec un régime au ratio  $\omega 6/\omega 3$  de 10:1 chez le porc (Duan *et al.* 2014). L'activation de la PKC $\theta$  (Oliva *et al.* 2013) et l'amélioration du statut des mitochondries sub-sarcolemmales seraient également impliqués



- ↑ Triglycérides
- ↓ Céramides et diglycérides
- ↑ Lipogénèse
- ↑ Oxydation des lipides
- ↓ Sécrétion d'IL-6
- ↓ Inflammation
- ↓ Insulino-résistance

**Figure 17 : Effet des oméga-3 sur le métabolisme musculaire**



(Matravadia *et al.* 2014), ainsi qu'une amélioration de la synthèse de glycogène (Oliva *et al.* 2013).

Dans le muscle, les  $\omega 3$  amélioreraient la sensibilité à l'insuline musculaire par des mécanismes impliquant une réduction des céramides et une amélioration de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (*cf.* **Figure 17**). Leur effet anti-inflammatoire serait également favorable à l'amélioration du métabolisme musculaire. Les effets spécifiques de l'EPA et de l'ALA à dose physiologique restent inconnus. *In vivo*, les résultats restent très controversés sur les effets bénéfiques des  $\omega 3$  sur le métabolisme musculaire.

# Objectifs

## II. Objectifs

Dans un contexte d'augmentation de la prévalence de l'obésité et sur un fond de susceptibilité génétique à l'environnement, les déséquilibres alimentaires et le manque d'activité physique jouent, à l'évidence, un rôle important. Les lipides et les sucres ont souvent été désignés comme les facteurs alimentaires majeurs dans l'apparition de l'obésité. Plus récemment, une distinction en sous-classes telles que celle des AGS et plus encore des AGS à longue chaîne (PAL, STE et MYR) a permis d'identifier plus précisément les AG qui pourraient être en cause. Le PAL participerait à l'apparition de l'IR par la perturbation du métabolisme des lipides dans les tissus périphériques tels que le TA et le muscle, en favorisant l'hypertrophie, la lipolyse et l'inflammation dans le premier et en induisant une accumulation de composés lipotoxiques, une IR et une inflammation dans le second.

Les AG  $\omega 3$ , quant à eux, auraient un effet favorable sur le métabolisme des lipides et empêcheraient l'apparition des perturbations liées à l'obésité. Toutefois, il est aujourd'hui impossible de déterminer si des effets spécifiques de l'ALA, de l'EPA ou du DHA sont observables. De plus les résultats concernant l'ALA sont très peu nombreux.

***En connaissance de ces éléments, les objectifs de cette thèse ont été d'étudier et de clarifier les effets biologiques propres des  $\omega 3$  ALA, EPA et DHA sur l'obésité et le SM et plus particulièrement sur le rôle qu'ils pourraient jouer dans le métabolisme des lipides et des glucides au niveau musculaire et adipocytaire.***

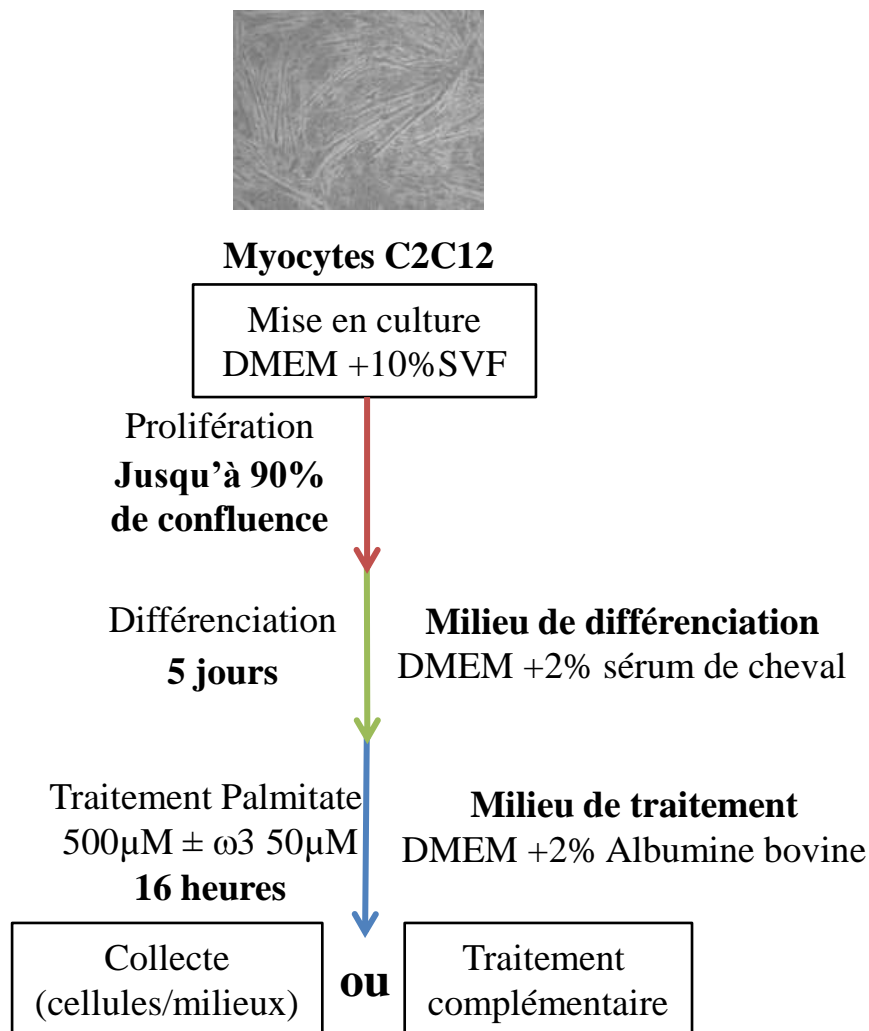
Afin de répondre à ces objectifs, un modèle cellulaire *in vitro* et des modèles murins *in vivo* ont été mis en œuvre. Dans un premier temps, les mécanismes d'action des trois  $\omega 3$  ont été étudiés dans des modèles de cellules musculaires C2C12. Dans ces cellules, l'objectif a été d'étudier l'effet des  $\omega 3$  (ALA, EPA et DHA) sur l'IR par le PAL, l'objectif étant de déterminer si les  $\omega 3$  permettaient de réduire son effet néfaste sur la réponse à l'insuline, sur l'accumulation des DG et céramides et sur l'oxydation des AG.

Cette première étude nous a conduits à nous intéresser à la régulation de l'inflammation induite par le PAL. L'activation de la voie inflammatoire p38MAPK par celui-ci, son implication dans l'inflammation musculaire ainsi que les capacités anti-inflammatoires des  $\omega 3$  ont été étudiées.

Dans un deuxième temps et dans le but de confirmer *in vivo* les effets des  $\omega$ 3 préalablement observés, des souris C57BL/6 sauvages et génétiquement obèses *ob/ob* ont été soumises à un régime HF-HS (45% de l'AET sous forme de lipides, 17% sous forme de glucides) pendant 16 et 6 semaines, respectivement. La substitution de 2% de l'AET par l'ALA, l'EPA et le DHA a été réalisée afin d'étudier les modulations des paramètres systémiques (glycémie, insulinémie, adipokines), adipeux (IR, cellularité), musculaires (IR) et dans une moindre mesure au niveau hépatique.

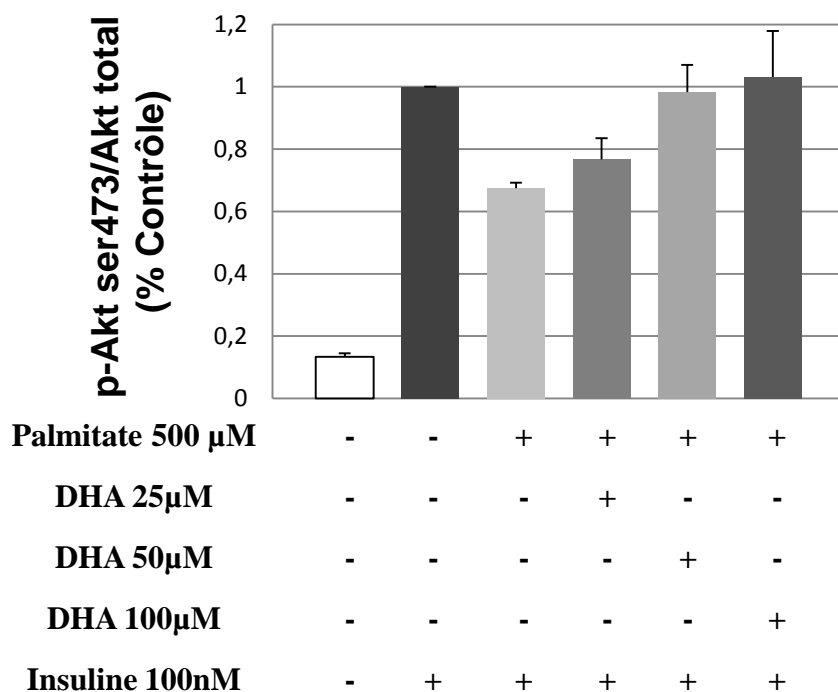
Afin de compléter nos investigations sur le TA, son développement en condition d'apports en PAL, ALA, EPA ou DHA a été étudié. Des adipocytes ont été mis en présence de ces AG pendant toute la durée de la différenciation et une étude cinétique de l'expression des gènes de la différenciation a été conduite afin de discriminer les effets de chacun de ces AG au cours du temps.

*P*rotocolos  
et méthodes employés



DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; SVF: Serum de veau fœtal

**Figure 18 : Différenciation et traitement des cellules musculaires**



**Figure 19 : Choix de la dose d'ω3, basée sur le DHA**

### III. Protocoles et méthodes employés

Afin de rendre les résultats de cette thèse aussi transparents que possible, les principaux protocoles et méthodes utilisées sont présentés ci-dessous. Les choix méthodologiques y sont plus particulièrement abordés.

#### 1. Etude des cellules musculaires C2C12

##### 1.1. Protocole expérimental

Les myoblastes C2C12 ont été utilisés afin d'obtenir des myotubes différenciés et d'étudier le métabolisme musculaire. Ce modèle est très utilisé pour étudier la voie de signalisation de l'insuline. La différenciation nécessite une première phase de prolifération en présence de sérum de veau fœtal à 10%. Une fois la prolifération suffisante (confluence des cellules à 80-90%), le sérum de veau est remplacé par 2% de sérum de cheval dont la composition favorise la différenciation des myoblastes (*cf.* **Figure 18**). La différenciation est maintenue pendant 5 jours pour permettre une complète différenciation en myotubes, par fusion des membranes de cellules voisines.

Le traitement consiste ensuite à mettre les cellules en présence de PAL préalablement dilué et lié dans une solution contenant 2% d'albumine bovine avec ou sans  $\omega 3$  pendant 16h. L'albumine dépourvue d'AG sert de transporteur aux AG pour favoriser leur captation par les myotubes. Sa capacité étant de 4 AG libres par molécule, la concentration d'albumine est largement suffisante par rapport aux concentrations en AG utilisées. Les doses retenues de 500 $\mu$ M de PAL et 50 $\mu$ M d' $\omega 3$  ont été retenues pour les raisons suivantes : 500 $\mu$ M suffisent à induire une IR sans provoquer d'apoptose cellulaire due à la lipotoxicité et 50 $\mu$ M de DHA a montré un effet suffisant pour restaurer la phosphorylation d'AKT à un niveau normal dans une étude de mise au point (*cf.* **Figure 19**). Pour pouvoir comparer les effets de chaque  $\omega 3$ , une concentration identique a été utilisée.

L'éthanol étant le solvant des AG, une concentration identique d'éthanol a été ajoutée dans le traitement témoin exempt d'AG. La concentration finale s'élève à 1,16% et ne provoque pas de mort cellulaire dans notre modèle.

##### 1.2. Fluidité membranaire

Les  $\omega 3$  sont des AG qui s'incorporent préférentiellement dans les fractions phospholipidiques des tissus. Ils sont ainsi retrouvés dans la bicouche lipidique des

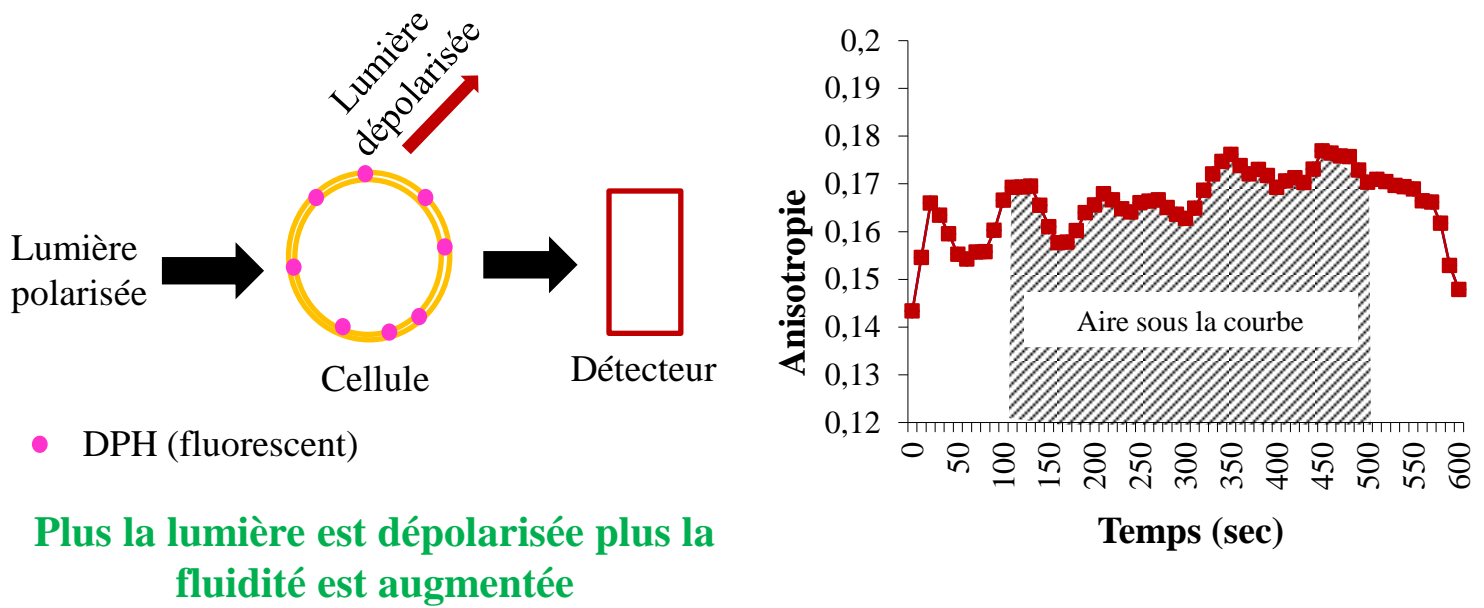
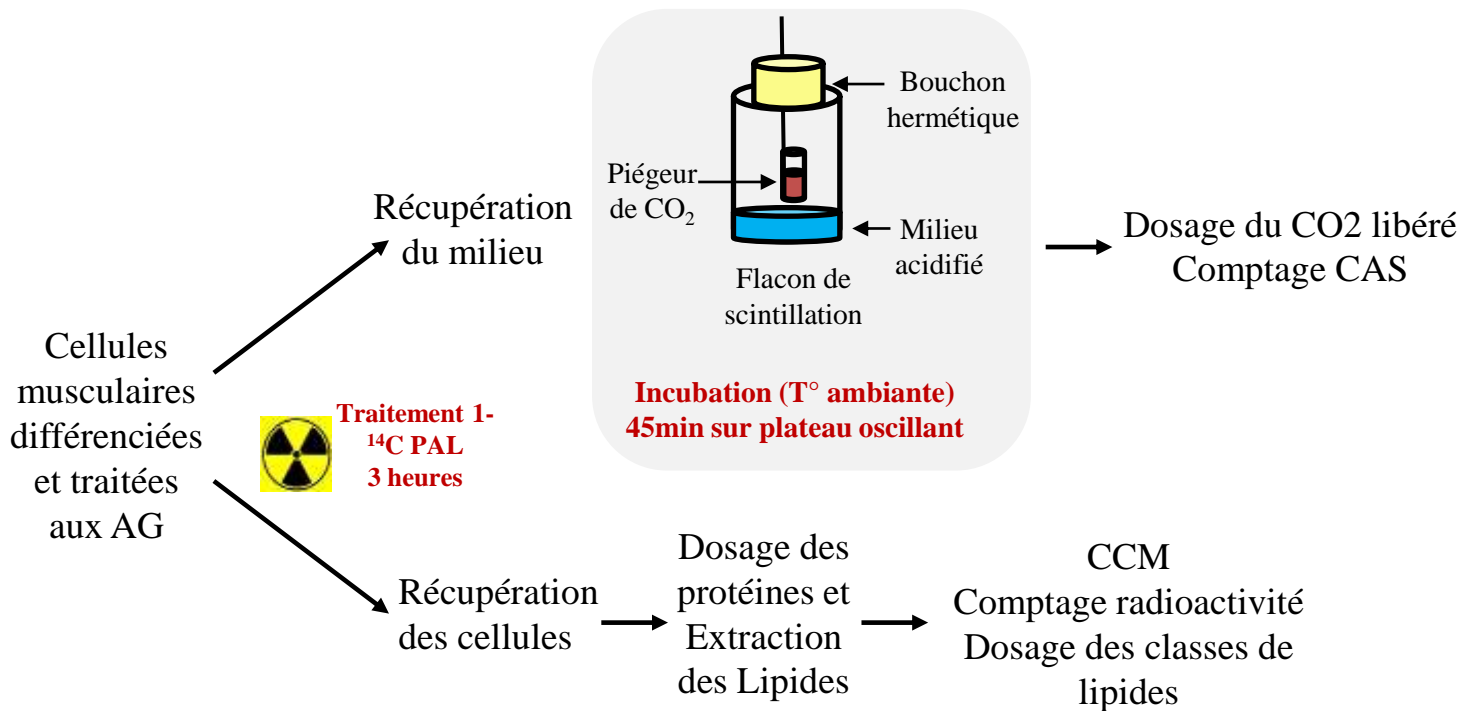


Figure 20 : Principe de mesure de la fluidité membranaire



AG: Acides gras; CAS: Corps acido-soluble; CCM: Chromatographie sur couche mince

Figure 21 : Suivi intracellulaire du palmitate radioactif

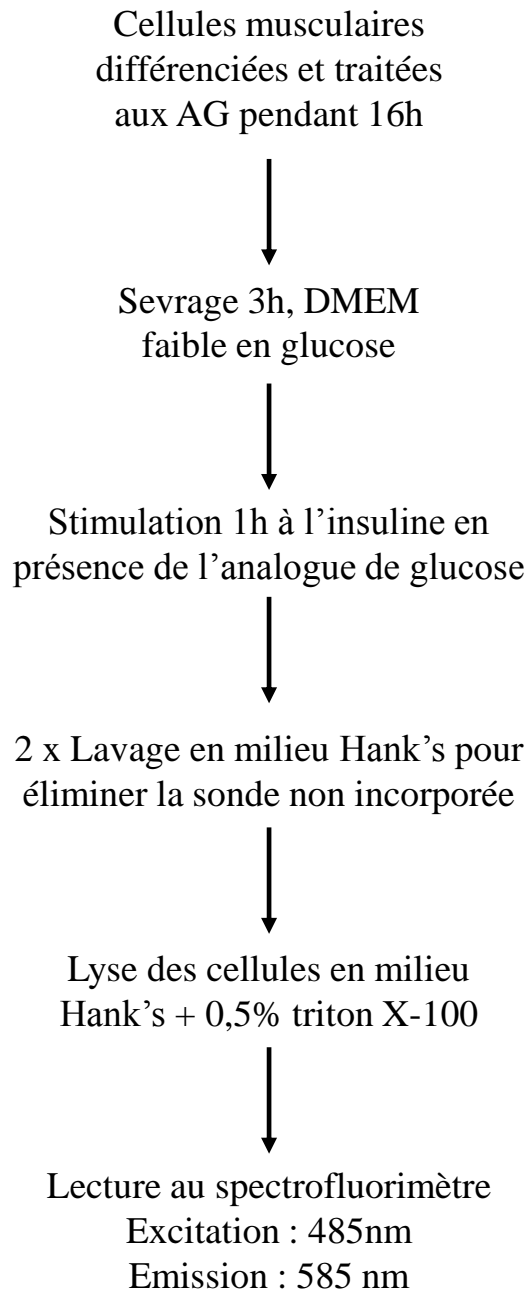


membranes cellulaires. Du fait de leur insaturation, ils favorisent la fluidité des membranes, contrairement aux AGS. Notre hypothèse était qu'une augmentation de l'incorporation des  $\omega 3$  dans les membranes des myotubes pourrait favoriser les interactions entre les kinases responsables de la transmission du signal de l'insuline, expliquant ainsi une partie des effets bénéfiques des  $\omega 3$  sur la sensibilité à l'insuline. Pour étudier la fluidité membranaire, le diphényl-hexatriène (DPH), une sonde fluorescente qui s'incorpore dans les membranes, a été utilisée. Cette sonde permet d'évaluer l'anisotropie, basée sur la polarisation de fluorescence et décrit pour la première fois par G. Weber en 1952 (Weber 1952) (*cf.* **Figure 20**). Plus l'objet étudié (ici le DPH) est mobile, plus la dépolarisation de la fluorescence sera importante et l'anisotropie faible. La rigidité de la membrane réduisant la mobilité du DPH, la fluidité sera inversement proportionnelle à l'anisotropie.

Après le traitement de 16h aux différents AG, les cellules ont été lavées, récupérées et soumises à cette sonde pendant 10 minutes à 37°C avant la lecture de l'anisotropie au spectrofluorimètre. L'enregistrement de cette dernière a été réalisé durant 10 minutes et en duplicat pour chaque échantillon. L'aire sous la courbe moyenne a ensuite été calculée sur un intervalle s'étendant de 100 secondes à 500 secondes (1min40sec à 8min30sec) où la mesure est la plus stable.

### 1.3. Suivi intracellulaire du PAL marqué au carbone 14

Nous avons émis l'hypothèse que les  $\omega 3$  influenceraient le devenir du PAL dans les cellules C2C12, les  $\omega 3$  ayant démontré certaines propriétés favorables à l'oxydation des lipides et à la sensibilité à l'insuline. La technique la plus adaptée était donc d'utiliser un traceur, en l'occurrence le [1-<sup>14</sup>C]-PAL (*cf.* **Figure 21**). Cette technique a été utilisée pour la première fois au laboratoire grâce à une collaboration avec l'équipe « Mitochondries, Bioénergétique, Métabolisme et signalisation » de l'institut Cochin à Paris, qui utilise différents marqueurs radioactifs dans des myoblastes en culture, un modèle très proche du nôtre. Le carbone radioactif permet de suivre l'incorporation du PAL dans les grandes classes de lipides que sont les PL, les DG et les TG de la cellule. C'est une technique très sensible mais de moins en moins utilisée car très contraignante en terme de manipulation : elle nécessite des salles dédiées et une gestion des déchets particulièrement lourde sans oublier les risques pour la santé que peut engendrer la manipulation de la radioactivité. De plus, ces techniques sont maintenant réalisables avec des isotopes non radioactifs tels que le <sup>13</sup>C suivi d'une analyse en spectrométrie de masse (Godin *et al.* 2007).



AG: Acides gras; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

**Figure 22 : Mesure de l'absorption du glucose**

Suite aux traitements de 500 $\mu$ M de PAL avec ou sans  $\omega$ 3 à 50 $\mu$ M, les cellules ont été soumises à des solutions aux concentrations identiques en AG mais avec 20 $\mu$ M de PAL radioactif pendant 3h à 37°C. Seul le groupe témoin a également été soumis à une concentration différente de celle utilisée dans l'incubation de 16h qui était dépourvue d'AG. L'incubation de 3h suffit à l'incorporation du PAL dans les différentes fractions lipidiques de la cellule. Suite à cela, les milieux ont été récupérés et ont été utilisés pour doser le  $^{14}\text{CO}_2$  et les corps acido-solubles marqués, métabolites issus respectivement de l'oxydation complète ou partielle du PAL. Quant aux cellules, elles ont été soumises à une extraction des lipides avant le dépôt en chromatographie sur couche mince (CCM) pour la séparation des PL, DG et TG. Le dosage de la radioactivité a été réalisé par scintigraphie. En parallèle, une quantification par dosage colorimétrique des quantités totales de PL, DG et TG a également été faite. Nous avons ainsi obtenu des résultats concernant l'incorporation du PAL traceur mais aussi concernant la quantité totale de lipides qui peuvent varier de manière totalement indépendante l'une de l'autre.

#### 1.4. Stimulation de l'absorption du glucose par traitement à l'insuline

Afin de vérifier la sensibilité à l'insuline des cellules, une technique de mesure de l'absorption du glucose a été mise en œuvre, faisant intervenir un analogue du glucose, non radioactif, non métabolisable par la cellule et détectable par fluorimétrie : le 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (*cf.* **Figure 22**). Après incubation pendant 16h aux AG, les cellules sont sevrées dans un milieu pauvre en glucose et en absence d'AG pendant 3h avant d'être soumises 1h à une stimulation avec 100nM d'insuline et en présence de 2-NBDG. Celui-ci s'incorpore dans la cellule sans pouvoir être métabolisé. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées avec du milieu Hank's (solution saline tamponnée) pour éliminer la sonde qui ne s'est pas incorporée avant la lyse des cellules et la lecture au spectrofluorimètre de la densité optique, proportionnelle à la quantité de 2-NBDG incorporée.

#### 1.5. Inhibition de la voie p38MAPK à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique

Lors de l'analyse de différentes voies de l'inflammation, j'ai pu m'apercevoir que l'activation de la p38MAPK n'était observable que dans les cellules traitées au PAL et au PAL + ALA. Ce résultat a attiré mon attention et j'ai donc pris l'initiative d'approfondir mes recherches sur cet aspect, non prévu dans le cadre du projet initial. Il m'a effectivement semblé que ceci pourrait être une des explications concernant un éventuel effet propre de

	Régime témoin		Régime HF	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	19.2	20	24	20
Carbohydrate	67.3	70	41	35
Fat	4.3	10	24	45
<b>Total</b>		100		100
<b>kcal/gm</b>	3.85		4.73	
<b>Ingredient</b>	<b>gm</b>	<b>kcal</b>	<b>gm</b>	<b>kcal</b>
Casein, 30 Mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch	452.2	1808.8	72.8	291
Maltodextrin 10	75	300	100	400
Sucrose	172.8	691.2	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Lard*	20	180	177.5	1598
Mineral Mix S10026	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.04	0		
FD&C Red Dye #40	0.01	0	0.05	0
<b>Total</b>	<b>1055.05</b>	<b>4057</b>	<b>858.15</b>	<b>4057</b>

+ 1% mélange (OLE/PAL/STE/LA, 50/25/15/10%),  
ALA, EPA ou DHA sous forme d'AGNE

**Figure 23 : Composition des régimes**

l'EPA et du DHA par rapport à l'ALA, ce dernier ne semblant pas pouvoir réduire l'activation de la p38MAPK induite par le PAL. Afin de répondre à cette hypothèse, un inhibiteur de la p38MAPK, le SB203580 a été utilisé en co-incubation avec les AG pendant 16h, avant l'évaluation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (IL-6, TNF- $\alpha$  et COX2).

## 1.6. Autres techniques

Des *western blots* ont été réalisées afin d'évaluer l'activation de différents acteurs de la voie de l'insuline, qu'ils soient connus pour activer (AKT, PDK-1) ou inhiber (PKC $\theta$ ) cette voie. L'expression de nombreux gènes impliqués dans l'oxydation, la captation ou encore le stockage des lipides a également été explorée par *reverse transcription* (RT) et *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR). Afin de valider la bonne incorporation des AG dans les cellules musculaires, nous avons également étudié le profil en lipides des AG totaux, analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) suite à l'extraction et la méthylation des lipides.

Ce modèle a fait l'objet d'une grande partie de mon projet de thèse et d'un article accepté dans le journal *Biochimica Biophysica Acta – Molecular and cellular biology of lipids*, concernant l'influence des  $\omega$ 3 sur le métabolisme du palmitate. Une autre publication est prévue et concerne les résultats observés avec l'inhibiteur de la p38MAPK, son rôle dans l'inflammation induite par le palmitate et l'influence des  $\omega$ 3 dans ce contexte.

## 2. Etudes *in vivo*

### 2.1. Animaux

Des souris de souche C57BL/6, connues pour leur susceptibilité à une diète hypercalorique, ont été utilisées pour étudier l'effet des  $\omega$ 3 sur le développement de l'obésité et du SM au cours d'un régime HF-HS. Nous avons réalisé une étude sur souris de type sauvage complétée par une expérimentation sur les souris *ob/ob* qui présente une hyperphagie due à une déficience de sécrétion en leptine, normalement impliquée dans la régulation de l'appétit dans le système nerveux central. Les souris *ob/ob* ont pour avantage de développer une obésité marquée en un temps relativement court comparativement aux souris sauvages.

Avant la mise sous régime, les souris mâles âgés de 5 semaines ont été placées en cage collective (n=5/cage) pour les souris sauvages (n=100) ou en cage individuelle pour les souris *ob/ob* (n=40). Après une semaine d'acclimatation, les souris ont été soumises à



**2 expériences distinctes** sur  
souris mâles (âgées de 5  
semaines)  
**C57BL/6 sauvages**  
**ou *ob/ob***

Adaptation  
1 semaine

Mise sous régime

Mesure de poids et de consommation

Low Fat,  
Contrôle

High Fat  
+ Huile de tournesol oléique  
+ ALA  
+ EPA  
+ DHA

Pendant 16 semaines pour les souris sauvages  
**Pendant 5 semaines pour les souris *ob/ob***

Avant abattage  
ITT/GTT  
Composition corporelle

Sacrifice

A jeun ou après injection à l'insuline  
Récupération :  
Foie  
Muscle  
Tissu adipeux épидидymal

**Figure 24 : Protocoles expérimentaux chez la souris**

différents régimes alimentaires. Ces deux modèles ont ainsi permis d'étudier la phase dynamique de la prise de poids et un stade d'obésité sévère.

## 2.2. Régimes alimentaires

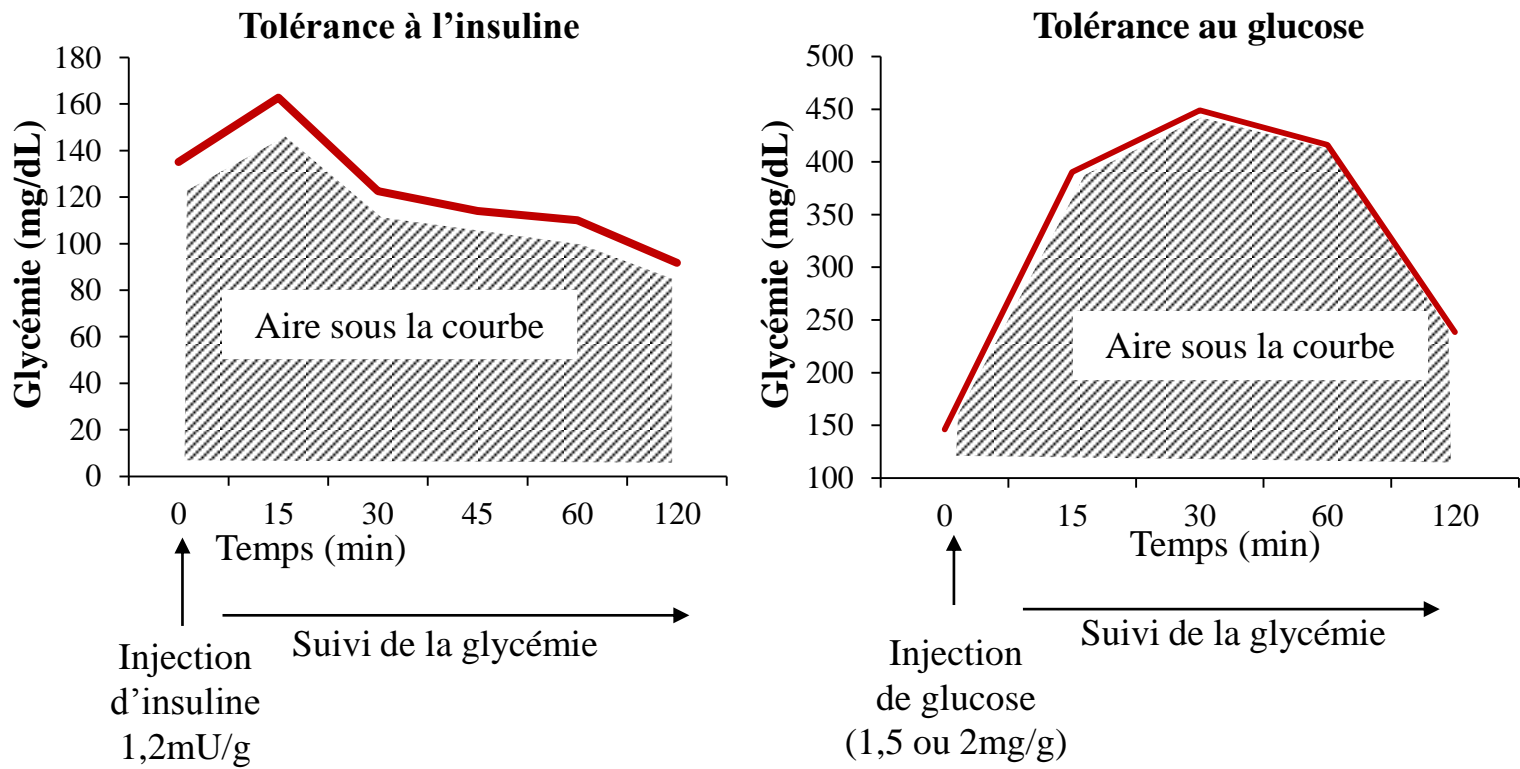
Les régimes alimentaires ont été fabriqués à façon, sur une base provenant de Research Diet et ont été les mêmes pour les deux expérimentations (*cf.* **Figure 23**). Le régime témoin est un régime Research Diet (12450H), non modifié, contenant 10% de l'AET sous forme de lipides et 17% de l'AET sous forme de sucrose. Les régimes HF sont tous basés sur le régime Research Diet (12451) dont 45% de l'AET sont sous forme de lipides et 17% de l'AET sous forme de sucrose. A cette base a été ajoutée un mélange de 4 acides gras (OLE, PAL, STE, LA à 50, 25, 15, 10% respectivement), de l'ALA, de l'EPA ou du DHA sous forme d'AGNE à hauteur de 1% du poids du régime (soit environ 2% de l'AET). Basée sur la formule de calcul proposée par Reagan-Shaw (Reagan-Shaw *et al.* 2008), la dose journalière équivalente chez l'Homme serait de 4 à 5g.j<sup>-1</sup> pour une adulte de 60kg (soit 66 à 83mg.kg<sup>-1</sup>). Une consistance semi-solide a été obtenue du fait de l'apport en huile, empêchant la fabrication de croquette. La nourriture a donc dû être mise à disposition dans des mangeoires prévues pour ce type de nourriture.

## 2.3. Protocoles expérimentaux

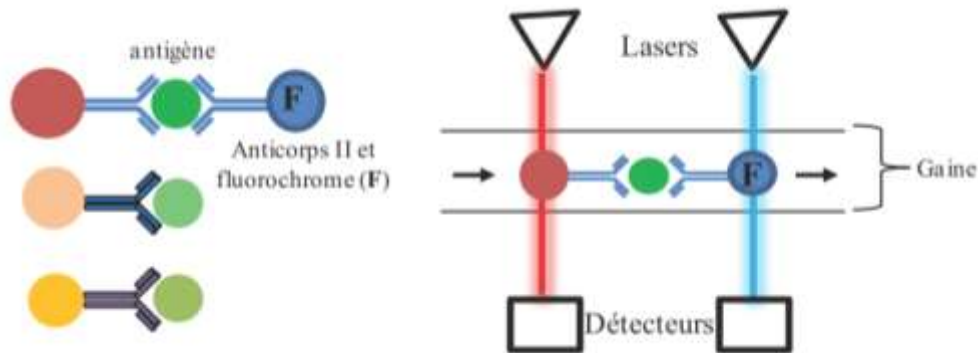
Les souris C57BL/6 sauvages et *ob/ob* ont été soumises aux différents régimes pendant 16 et 5 semaines respectivement (*cf.* **Figure 24**). Le poids et la consommation des souris ont été suivis pendant toute la durée du régime. Avant abattage, la moitié de l'effectif des souris sauvages a été soumise à un test de tolérance au glucose, l'autre moitié à un test de tolérance à l'insuline tandis que les souris *ob/ob* ont toutes été soumises aux deux tests avec une période de 3 jours séparant les deux évaluations. A la fin de l'expérimentation, 40 souris sauvages et toutes les souris *ob/ob* ont été soumises à une injection d'insuline 30 minutes avant l'anesthésie et sacrifiées pour la récupération du foie, du muscle, du TA et du plasma pour les différentes analyses présentées ci-après. Les 60 souris sauvages restantes n'ont pas été injectées pour pouvoir effectuer des analyses sur les différents tissus à jeun.

## 2.4. Tests de tolérance à l'insuline et au glucose

Ces tests ont été réalisés à la 16<sup>ème</sup> semaine de régime. Afin d'étudier la sensibilité à l'insuline et au glucose (*insulin tolerance test*, ITT ; *glucose tolerance test*, GTT), les souris



**Figure 25 : Suivi et calcul de la tolérance à l'insuline et au glucose**



**Figure 26 : Principe du dosage multiplex**

Le multiplex est un système de lecture sophistiqué permettant la quantification de plusieurs composés en simultanée grâce à l'utilisation de billes colorées couplées à des anticorps. Les billes sont identifiables les unes des autres par leur fluorescence. Après incubation des billes avec les antigènes et les anticorps couplés aux fluorochromes, les complexes formés sont analysés par deux lasers, l'un identifiant le type de bille et l'autre vérifiant la fixation ou non de l'antigène.



ont été sevrées pendant 6 heures avant l'injection en intra-péritonéal (ip) d'insuline (1,2mU/g) ou de glucose (2mg/g pour les souris sauvages, 1,5mg/g pour les souris *ob/ob*) (cf. **Figure 25**). La glycémie a ensuite été suivie pendant 2 heures. La dose de glucose a été modifiée pour les souris *ob/ob* afin d'éviter de passer au-dessus du seuil de détection du glucomètre (600mg/dL), ces souris étant plus intolérantes au glucose que les souris sauvages. Les données ont ensuite été exprimées en pourcentage de la glycémie basale puis utilisées pour le calcul d'air sous la courbe, permettant de comparer les réponses des animaux sur la durée totale de mesure de la glycémie. Lors de l'ITT, une augmentation de la glycémie a été observée à 15 minutes après l'injection, certainement due au stress induit par l'injection d'insuline avant même que l'insuline puisse agir sur la glycémie. Ces 15 premières minutes n'ont donc pas été prises en compte pour le calcul de l'air sous la courbe.

## 2.5. Oxydation *ex vivo* de palmitate marqué au <sup>14</sup>C

Lors de l'abattage des animaux, un homogénat de foie ou de muscle a été utilisé afin de réaliser des analyses d'oxydation du palmitate. Cette technique est basée sur le même principe que celle utilisée *in vitro* (cf. **III.1.3.**), consistant à incuber les homogénats avec du palmitate marqué dans une fiole fermée hermétiquement en présence d'un piègeur de CO<sub>2</sub>. Une fois l'incubation terminée, le CO<sub>2</sub> et le milieu contenant les corps acido-solubles sont récupérés et le comptage de la radioactivité par scintillation est effectué. Ceci permet le calcul de l'oxydation totale (CO<sub>2</sub> formé), partielle (quantité de corps acido-solubles) et la somme des deux.

## 2.6. Analyses plasmatiques

Trois types d'analyses ont été réalisées afin d'explorer les concentrations plasmatiques de molécules d'intérêt. Une analyse à l'aide d'un automate a permis la quantification du glycérol, du cholestérol total, de la glycémie, des AGNE et des TG plasmatiques. L'insulinémie et l'adiponectinémie ont été mesurée à l'aide de kits *enzyme-linked immunosorbant assay* (ELISA). La leptinémie a été mesurée lors d'une analyse au « multiplexe » permettant la quantification de nombreux composés sur un même échantillon. Cette analyse est basée sur la méthode ELISA mais un couplage avec des billes permet l'analyse de plusieurs composés dans un même échantillon (cf. **Figure 26**). Les concentrations en ghréline, glucagon, *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) ont également été quantifiées par cette méthode pour vérifier que la

régulation hormonale de l'appétit n'avait pas été affectée par les régimes. Aucune différence intergroupe n'a d'ailleurs été observée.

## 2.7. Profils en lipides des tissus, des hématies et du plasma

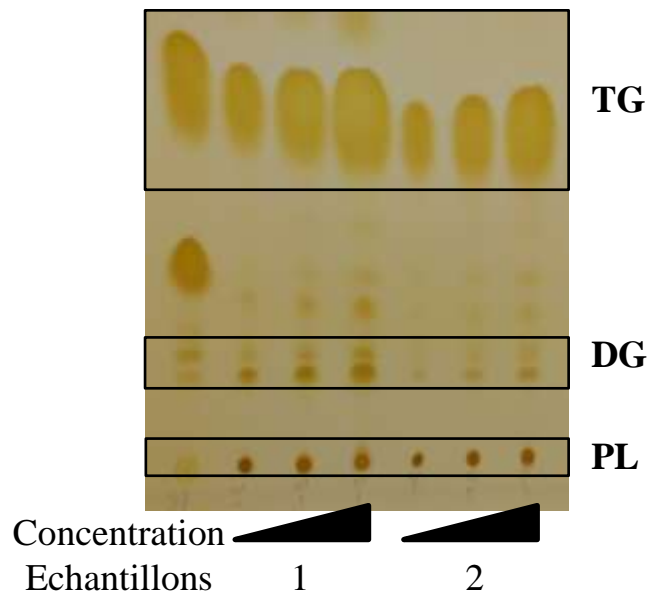
Les profils en lipides nous renseignent sur l'efficacité des régimes alimentaires à modifier l'incorporation des AG ou encore à déterminer si le régime considéré est capable d'induire un changement dans le rapport  $\omega 6/\omega 3$  dans un tissu plutôt qu'un autre. Le contenu en  $\omega 3$  des PL a été mesuré dans le foie, le muscle, le TA, les hématies et le plasma. Ces données ont été obtenues par extraction des AG par la méthode de Folch. Une séparation sur colonne des lipides neutres (DG, TG) et des PL a été réalisée dans les tissus et le plasma mais pas dans les hématies, leur quantité étant trop faible pour pouvoir les séparer. Ces extraits ont ensuite été soumis à une méthylation par réaction chimique à chaud avec du BF<sub>3</sub>. Ceci permet de modifier les AG afin de pouvoir les détecter en CPG et de connaître ainsi la composition exacte des extraits lipidiques en AG. Les chromatogrammes obtenus servent ensuite à quantifier de manière relative le pourcentage des différents AG par rapport à la quantité totale d'AG de l'échantillon.

## 2.8. Cellularité du TA

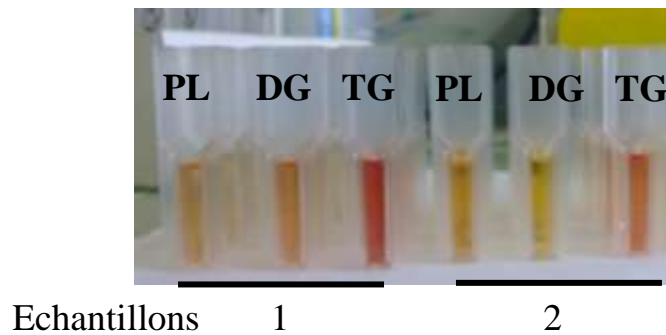
Nous avons émis l'hypothèse que l'hypertrophie et l'hyperplasie pourrait être modulée différemment selon la composition en AG du régime alimentaire des souris. Afin de vérifier cela, nous avons extrait les ADN totaux des cellules lors d'une co-extraction des ARN et des ADN du TA. Les ARN ont été, dans un premier temps, élués dans la phase aqueuse du TRIzol® après centrifugation. Les ADN présents dans l'autre phase ont été extraits à l'aide de *back extraction buffer* (BEB) qui permet d'obtenir deux autres phases, dont la phase aqueuse qui contient les ADN. Ceux-ci ont ensuite été quantifiés à l'aide d'un Nanodrop® facilitant le dosage par densité optique à 260nm et 280 nm. La quantité en ng/ml a été rapportée au poids du tissu avant extraction afin d'avoir une idée précise de la relation entre la quantité de cellules (proportionnelle à la quantité d'ADN) et le poids total du tissu. Ainsi, plus la valeur est élevée et plus le tissu est hyperplasique.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet la co-extraction ARN/ADN et l'utilisation de ces deux sources d'informations. L'inconvénient est qu'elle est moins précise que d'autres techniques telles que l'histologie pour le calcul du diamètre cellulaire, notamment du fait que le tissu considéré n'est pas exempt d'autres types cellulaires

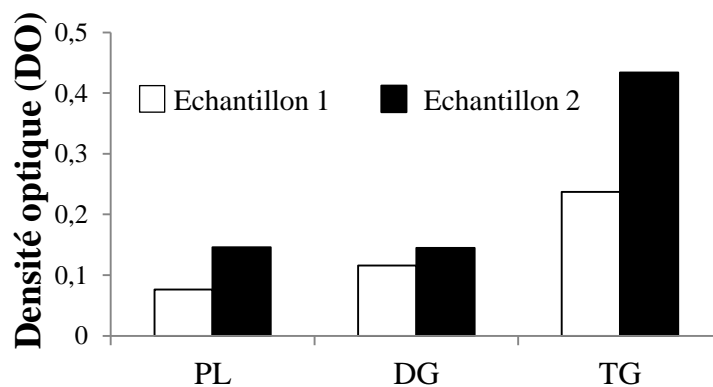
### 1- dépôt et migration en CCM



### 2- extraction des spot et dosage colorimétrique



### 3- densité optique au spectrophotomètre



**Bonne linéarité de la DO en fonction de la dose déposée et de la taille du spot**

**Figure 27 : Dosage des diglycérides et triglycérides hépatiques**

(macrophages, préadipocytes, cellules endothéliales) et que l'ADN quantifié provient également de ces cellules. N'ayant pas prévu d'histologie avant l'abattage des animaux, nous n'étions pas en mesure d'effectuer une telle analyse, les tissus devant être déshydratés et mis en paraffine pour pouvoir être coupés finement et être colorés. La tentative de partir de tissus congelés n'a pas fonctionné, le TA étant un tissu particulièrement mou.

## 2.9. Dosage des DG et TG hépatiques

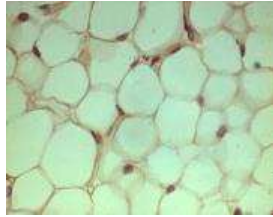
Une partie des extraits de lipides a été conservée avant la méthylation (nécessaire à la CPG) pour faire des analyses complémentaires sur la quantité de TG et DG présents dans les cellules du foie (*cf.* **Figure 27**). Les extraits ont été déposés sur des plaques de silices afin de séparer les différentes classes de lipides par migration à l'aide d'une phase mobile composée d'hexane, de diéthyléther et d'acide acétique. Une fois séparées, les différentes classes sont éluées à l'aide d'acétone et dosées par colorimétrie. Ceci fait intervenir un kit enzymatique qui dégradent les DG et les TG afin d'obtenir du glycérol libre, qui est ensuite dégradé par une enzyme pour donner un composé coloré. Ce dernier est donc proportionnel à la quantité de DG ou de TG présents dans l'échantillon. La densité optique mesurée au spectrophotomètre a bien été proportionnelle à la quantité de lipides déposée en CCM.

## 2.10. Autres techniques

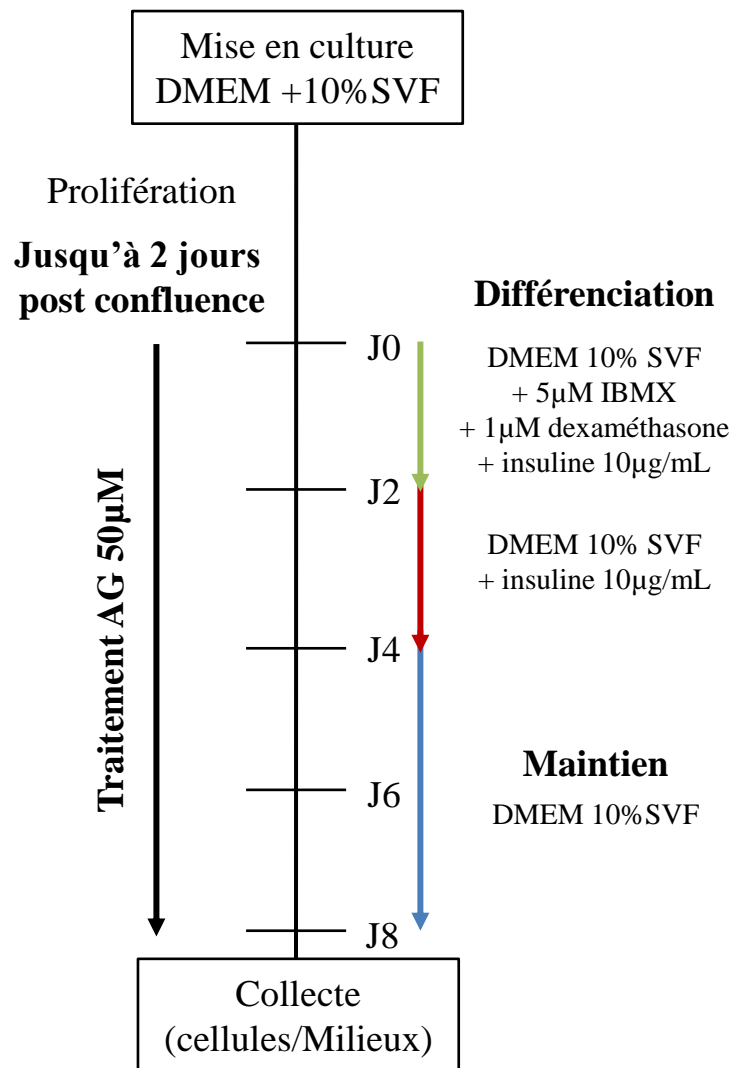
Dans le but de répondre à la question de la sensibilité à l'insuline des animaux, des Western blots ont été réalisés afin d'explorer la sensibilité à l'insuline du muscle, du TA et du foie. Pour cela nous avons évalué la phosphorylation de la protéine kinase AKT sur son résidu ser473. Elle a ensuite été rapportée à l'expression totale de la protéine AKT. La vérification des dépôts a été réalisée en quantifiant la GAPDH, très largement utilisée comme protéine de ménage.

Des analyses en cartes microfluidiques utilisant la technologie TaqMan® ont également été réalisées sur le muscle et le foie afin de passer en revue un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides. Pour cela des extraits d'ARN ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires puis soumis à l'analyse. Pour avoir des informations similaires dans le TA, des RT-qPCR ont été réalisées.

En complément des données sur le TA *in vivo*, nous avons également réalisé une étude *in vitro* sur les adipocytes 3T3-L1 afin d'explorer la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (*cf.* **Figure 28**). Ces cellules ont été mises en prolifération dans un



### Adipocytes 3T3-L1



DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine  
SVF: Serum de veau foetal

**Figure 28 : Protocole expérimentale des cellules 3T3-L1**

milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. La différenciation a été réalisée en présence de *3-isobutyl-1-methylxanthine* (IBMX), d'insuline et de dexaméthasone pour induire la différenciation, et en présence d'OLE, de PAL, d'ALA, d'EPA ou de DHA à 50µM pour étudier leurs effets lors de la différenciation cellulaire. Durant les 8 jours nécessaires à la différenciation complète des préadipocytes en adipocytes, des extractions d'ARN ont été réalisées tous les deux jours afin de suivre la cinétique d'induction des gènes de la différenciation cellulaires.

# Résultats

## IV. Résultats

### 1. Etudes *in vitro*

#### 1.1. Oméga-3 et insulino-résistance des cellules musculaires C2C12

IMPACT DES ACIDES GRAS POLYINSATURES OMEGA-3 SUR LE  
METABOLISME DU PALMITATE ET L'INSULINO-RESISTANCE DANS  
UN MODELE DE CELLULES MUSCULAIRES C2C12

Article accepté dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta –Molecular and Cellular  
Biology of Lipids.*



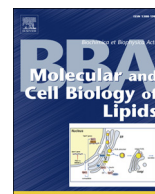
## LES ACIDES GRAS OMEGA-3 A LONGUE CHAÎNE REDUISENT LA LIPOTOXICITE INDUITE PAR LE PALMITATE EN MODIFIANT SON METABOLISME ET SON STOCKAGE DANS LA CELLULE MUSCULAIRE C2C12.

**Introduction :** Depuis plusieurs décennies, l'obésité et le diabète de type 2 sont au centre des politiques de santé publique. L'excès d'apport énergétique induit une surcharge cellulaire notamment dans le muscle en composés lipotoxiques (céramides, diglycérides) dérivés du palmitate, un acide gras saturé. La lipotoxicité engendrée participe à l'apparition d'une insulino-résistance, particulièrement fréquente dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2. Une supplémentation en acides gras oméga-3 pourrait être favorable à une baisse de la lipotoxicité et de l'insulino-résistance (IR). Nous avons posé l'hypothèse que selon l'oméga-3 utilisé, des effets spécifiques sur le métabolisme du palmitate dans le muscle squelettique seront observables.

**Matériel et méthodes:** Des myotubes de la lignée C2C12 ont été traités avec 500 $\mu$ M de palmitate, sans ou avec 50 $\mu$ M d'acide alpha-linoléique (ALA), éicosapentaénoïque (EPA) ou docosahexaénoïque (DHA) pendant 16h et collectées pour des mesures de fluidité membranaire, de concentration en céramides, de phosphorylation insulino-dépendante de la protéine AKT et de captation de glucose (deux paramètres indicateurs d'IR). En outre, l'exploration du métabolisme du palmitate et son incorporation dans les différentes fractions lipidiques (triglycérides, diglycérides, phospholipides) a été menée après traitement pendant 3h au palmitate radioactif ([1-<sup>14</sup>C] palmitate).

**Résultats :** L'activation d'AKT, réduite par le palmitate, a été restaurée par les suppléments en EPA et en DHA mais pas par l'ALA. Cependant, l'absorption de glucose induite par l'insuline a été significativement restaurée par les trois oméga-3. Cet effet ne semble pas lié à une modification de l'expression des récepteurs GLUT1 et 4 par les différents traitements. L'oxydation (partielle et complète) du palmitate par les myotubes a été restaurée par l'EPA et le DHA, tandis que l'ALA n'améliore que partiellement ce paramètre. Cette amélioration est associée à une élévation de l'expression du gène de la CPT1a impliquée dans l'oxydation mitochondriale suite au traitement à l'EPA et au DHA. L'accumulation de céramides et de DG induite par le palmitate et réprimant l'insulino-sensibilité, a été significativement réduite par les trois  $\omega$ 3, avec une efficacité supérieure de l'EPA. En revanche, l'incorporation du palmitate dans les DG n'a été significativement diminuée que par la supplémentation en EPA et en DHA. Dans le même temps, la protéine kinase C  $\theta$  inhibitrice de la voie de l'insuline reste activée avec l'ALA, tandis que l'EPA et le DHA inhibent son activation. L'ALA a amélioré partiellement, et l'EPA et le DHA significativement, la fluidité membranaire comparés au palmitate seul. L'évaluation de l'incorporation de ces AG dans les myotubes traités a reflété cette modulation de fluidité, montrant une accumulation nette d'ALA, mais surtout d'EPA et de DHA dans les cellules exposées à ces AG.

**Conclusion:** Contrairement à l'ALA, les traitements à l'EPA et au DHA restaurent l'activation d'AKT, alors que l'absorption du glucose est améliorée par ces trois AG. Ces effets différentiels restent à explorer puisque les 3 AG limitent l'accumulation de dérivés lipotoxiques, mais seuls l'EPA et le DHA affectent vraiment l'orientation du palmitate. L'activation de l'oxydation mitochondriale, l'inhibition de l'activité de la PKC $\theta$  par l'EPA et le DHA apparaissent ainsi cruciales pour l'amélioration du statut cellulaire, démontrant ainsi que les  $\omega$ 3 ont des effets différentiels sur le métabolisme lipidique des cellules musculaires C2C12.



## N – 3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells



Alexandre Pinel<sup>a</sup>, Jean-Paul Rigaudière<sup>a</sup>, Brigitte Laillet<sup>a</sup>, Corinne Pouyet<sup>b</sup>, Corinne Malpuech-Brugère<sup>a</sup>, Carina Prip-Buus<sup>c</sup>, Béatrice Morio<sup>a,d</sup>, Frédéric Capel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1019 Nutrition Humaine, Laboratoire de Nutrition Humaine, Université d'Auvergne, CRNH, 58 rue Montalembert BP321, 63009 Clermont Ferrand CEDEX 1, France

<sup>b</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1019 Nutrition Humaine, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

<sup>c</sup> Institut Cochin, Département d'Endocrinologie, Métabolisme and Diabète, U1016 Inserm/UMR8104 CNRS/UMR-S8104, bâtiment Faculté, 3<sup>ème</sup> étage, Salle 3012A, 24 rue du faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

<sup>d</sup> INRA, UMR 1397, Laboratoire CarMeN, Université Lyon 1, INSERM U1060, INSA de Lyon, Université Lyon-Sud Rockefeller et Charles Merieux, Lyon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 May 2015

Received in revised form 2 October 2015

Accepted 14 October 2015

Available online 22 October 2015

#### Keywords:

Omega-3 fatty acids

EPA

DHA

Palmitate

Fatty acid metabolism

Insulin resistance

### ABSTRACT

Excessive energy intake leads to fat overload and the formation of lipotoxic compounds mainly derived from the saturated fatty acid palmitate (PAL), thus promoting insulin resistance (IR) in skeletal muscle. N – 3 polyunsaturated fatty acids (n – 3PUFA) may prevent lipotoxicity and IR. The purpose of this study was to examine the differential effects of n – 3PUFA on fatty acid metabolism and insulin sensitivity in muscle cells. C2C12 myotubes were treated with 500  $\mu$ M of PAL without or with 50  $\mu$ M of alpha-linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) or docosahexaenoic acid (DHA) for 16h. PAL decreased insulin-dependent AKT activation and glucose uptake and increased the synthesis of ceramides and diglycerides (DG) derivatives, leading to protein kinase C $\theta$  activation. EPA and DHA, but not ALA, prevented PAL-decreased AKT activation but glucose uptake was restored to control values by all n – 3PUFA vs. PAL. Total DG and ceramide contents were decreased by all n – 3PUFA, but only EPA and DHA increased PAL  $\beta$ -oxidation, decreased PAL incorporation into DG and reduced protein kinase C $\theta$  activation. EPA and DHA emerge as better candidates than ALA to improve fatty acid metabolism in skeletal muscle cells, notably via their ability to increase mitochondrial  $\beta$ -oxidation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Impaired muscle insulin sensitivity in obesity and metabolic syndrome (MetS) may be caused by excess dietary intake of saturated fatty acids (SFA) [1]. Palmitate (PAL, C16:0) is the most common SFA

in western diet, and it plays a major role in muscle insulin resistance (IR). An 8 h-exposure to 600  $\mu$ M of PAL has been shown to reduce fatty acid (FA) beta-oxidation ( $\beta$ -oxidation) in L6 skeletal muscle cells by 50% [2], thus favoring lipid accumulation. Chavez *et al.* [3] demonstrated that PAL treatment increased the formation of lipotoxic compounds such as diglycerides (DG) and ceramides in C2C12 muscle cells, leading to impaired insulin signaling. DG and ceramides are able to inhibit insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and AKT phosphorylation via the activation of protein kinases C (PKC) [4,5] and tribbles 3 (TRB3), a negative regulator of insulin signaling induced by high-fat diet or PAL in skeletal muscle [6]. Limiting lipid uptake or storage in lipotoxic fractions and enhancing FA  $\beta$ -oxidation are two potential strategies to restore muscle insulin sensitivity [7]. In this context, increasing n – 3 polyunsaturated fatty acids (n – 3PUFA) intake is proposed to reduce lipotoxicity and IR [8,9]. The major dietary n – 3PUFA are the precursor alpha-linolenic acid (ALA, C18:3n – 3) from plant sources and its two main very-long-chain derivatives eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n – 3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n – 3) from marine sources. A combination of EPA and DHA has been shown to improve glucose metabolism and mitochondrial  $\beta$ -oxidation in human skeletal muscle cells by increasing insulin-dependent glucose transporter 4 (GLUT4) and peroxisome proliferator-activated receptor co-activator

**Abbreviations:** 2-NBDG, fluorescent glucose analog; ALA, alpha-linolenic acid; AMPK, AMP-activated protein kinase; AS160, AKT substrate of 160 kDa; cpt1, carnitine palmitoyltransferase 1; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; DHA, docosahexaenoic acid; DPH, diphenyl-hexatriene; ECL, enhanced chemiluminescence; EPA, eicosapentaenoic acid; EtOH, ethanol; FAT, fatty acid transporter; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLUT, glucose transporter; hppt, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IR, insulin resistance; IRS-1, insulin receptor substrate-1; metS, metabolic syndrome; PAL, palmitate; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase; PGC1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor co-activator 1 alpha; PKC, protein kinase C; PL, phospholipid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RIPA, radioimmunoprecipitation assay buffer; TRB3, tribbles homolog 3.

\* Corresponding author at: Institut National de la Recherche Agronomique Laboratoire de Nutrition Humaine, 58 rue Montalembert BP321, 63009 Clermont Ferrand CEDEX 1, France.

E-mail addresses: alexandre.pinel@clermont.inra.fr (A. Pinel), jean-paul.rigaudiere@clermont.inra.fr (J.-P. Rigaudière), brigitte.laillet@clermont.inra.fr (B. Laillet), corinne.pouyet@clermont.inra.fr (C. Pouyet), corinne.malpuech-brugere@udamail.fr (C. Malpuech-Brugère), carina.prip-buus@inserm.fr (C. Prip-Buus), beatrice.morio@clermont.inra.fr (B. Morio), frederic.capel@clermont.inra.fr (F. Capel).

1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) expression and mitochondrial content [10]. EPA alone was able to increase triglyceride (TG) and phospholipid (PL) esterification and lipid uptake in human skeletal muscle cells while also stimulating glucose uptake and oxidation [11]. DHA alone increased the mRNA content of AMP-activated protein kinase (AMPK $\alpha$ 2) in L6 myotubes, which was associated with the stimulation of FA  $\beta$ -oxidation [12]. This same study [12] also found that DHA reduced PAL-induced DG accumulation and enhanced TG synthesis and storage. Very few studies have investigated the effects of ALA on obesity and associated metabolic disorders. However, ALA reduced PAL-induced lipotoxicity and apoptosis in primary rat hepatocytes [13], whereas a recent study described ALA as a non-sufficient therapy for high-fat-diet-induced obesity [14]. Here we tested the hypothesis that ALA, EPA and DHA could exert distinct effects to reduce lipotoxicity during PAL-induced IR in C2C12 muscle cells. Modulation of PAL partitioning in the different lipid fractions could be one of the mechanisms involved in improving skeletal muscle metabolism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), phosphatase inhibitor cocktail, palmitate, diphenyl-hexatriene (DPH, cat. number D208000), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, cat. number G9545) primary antibodies, chloroform, methanol, diethyl ether, acetic acid and L-carnitine (cat. number C0283) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Fatty acid-free bovine serum albumin (FA-free BSA, cat. number K31-002), fetal bovine serum (FBS), horse serum, phosphate buffered saline (PBS) and penicillin/streptomycin mix were from PAA (Velizy-Villacoublay, France). N-3PUFA (ALA, EPA and DHA, cat. number 90210, 90110 and 90310 respectively) and glucose uptake assay kit (cat. number 10009582) were from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Radio-immunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer), phosphor Ser473- (cat. number 9271) and phosphor Thr308-AKT (cat. number 9275), total AKT (cat. number 9272), GLUT4 (cat. number 2213), phospho Thr642 AKT substrate of 160 kDa (AS160, cat. number 4488) and phospho Thr538-PKC theta (cat. number 9377) primary antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Leiden, Netherlands). Rabbit and mouse secondary antibodies were from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) and DAKO (Les Ulis, France) respectively. GLUT1 primary antibody (cat. number PA1-46152), enhance chemiluminescence (ECL) and Pierce™ BCA protein assay kit were purchased from THERMO SCIENTIFIC (Villebon sur Yvette, France). BioRad Protein assay was from BioRad (Marnes-la-Coquette, France). The [1-<sup>14</sup>C] palmitate (cat. number NEC075H001MC) was from PERKIN ELMER (Courtaboeuf, France). TG, DG and PL quantification kit was from Diasys (Condom, France, cat. number 157109910021).

### 2.2. Cell culture and differentiation

C2C12 myoblasts were purchased from ATCC. Cells were seeded in 60 mm dishes in enriched DMEM containing 4.5 g/L glucose, 2.4 g/L sodium bicarbonate, 10% FBS and 1% of 100 $\times$  Penicillin and Streptomycin mix (100 UI/mL and 100  $\mu$ g/mL respectively). Cells were kept in a humidified, 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Medium was changed every 48 h to ensure growth until reaching 80–90% confluence. Then, proliferation medium was replaced by differentiation medium (2% horse serum instead of 10% FBS) for 5 days before cell treatment.

### 2.3. BSA-bound PAL solution for cell treatment with fatty acids

PAL was dissolved in EtOH at 50 mM and was filtrated. Two percent FA-free BSA and 1% Penicillin/Streptomycin 100 $\times$  were dissolved in

100 mL enriched DMEM. Six hundred microliters of PAL was then added to 14.4 mL supplemented DMEM to reach a 2 mM concentration, sonicated 4 min and heated for 15 min at 55 °C.

### 2.4. Cell treatment

The BSA-bound PAL solution was diluted 4 times with BSA-enriched DMEM. In separate tubes, the solution prepared was supplemented with ALA, EPA or DHA at 50  $\mu$ M final and were warmed up at 37 °C to ensure BSA-binding before treatment. Control treatment was a FA-free BSA-enriched (2%) DMEM containing the same rate of EtOH (2%), without FA. After differentiation, C2C12 cells were washed 3 times with PBS and treated with (1) BSA-bound PAL solution at 0.5 mM (PAL) (2) BSA-bound PAL solution and 50  $\mu$ M ALA (ALA), EPA (EPA) or DHA supplementation (DHA) for 16 h.

### 2.5. Immunoblotting

After cell treatment with FA, cells were treated with 100 nM insulin for 15 min, washed twice with cold PBS and lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM sodium chloride, 10 mM EDTA, 10 mM NaPPI, 25 mM beta-glycerophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10% Glycerol, 1% sodium orthovanadate, 1% Triton X-100 and 0.5% phosphatase inhibitors cocktail). Protein concentration was determined using BCA protein assay to ensure twenty micrograms of proteins loaded for separation by SDS-PAGE electrophoresis. Proteins were transferred on PVDF membranes which were then immunoblotted. Antibody binding was detected using enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting substrate and visualized by chemiluminescence imaging system (MF ChemiBIS 2020, Israel). Bands obtained were quantified using MultiGauge V3.2 software.

### 2.6. Glucose uptake assay

The 2-NBDG was used as a deoxyglucose-analog probe to evaluate glucose uptake by C2C12 myotubes using the Cayman glucose uptake assay kit. After 16 h of treatment with FA, cells were washed in PBS and starved in DMEM containing 1 g/L glucose, 2% (w/v) FA-free BSA during 3 h. Cells were then stimulated with 100 nM insulin for 1 h. Cells were washed in Krebs buffer containing 0.5% BSA and incubated with 2-NBDG (150  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37 °C. After a second wash with Krebs buffer, cell-based assay buffer (Cayman) supplemented with 0.5% Triton X-100 was added to cells. The amount of 2-NBDG incorporated into cells was quantified in cell lysates by fluorescence (excitation/emission = 485/585 nm) using a Safas Xenius XML (SAFAS, Monaco) plate reader. Fluorescence emission was normalized to protein content in cell lysate.

### 2.7. Membrane fluidity assay

After the 16 h-treatment, cells were collected using trypsin-EDTA, washed and kept in cold PBS. Diphenylhexatriene (DPH) which is incorporated in the double layer of membrane phospholipids was used as fluorescence probe to follow membrane fluidity. Membrane fluidization increases mobility of the dye and decreases the intensity of the emitted parallel component which was measured using Xenius® SAFAS XC spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco). DPH was used at 4  $\mu$ M final concentration and added to a constant cell number (evaluated by BCA protein assay) in 1 mL final volume.

### 2.8. Cellular lipid profiles

C2C12 cells were harvested using trypsin and collected by centrifugation. After 2 washes in PBS, cell pellets were flushed under nitrogen and stored at –80 °C until analysis. Lipid extracts were prepared using the Folch method [15]. The lipid fraction was dried under nitrogen



and use for methylation in the presence of toluene and boron trifluoride-methanol for 1 h at 90 °C. After cooling at room temperature, a saturated solution of sodium bicarbonate and hexane were added to extract methyl esters. After mixing and centrifugation, the hexane layer was analyzed for fatty acid methyl ester (FAME) composition by gas chromatography (GC Trace Thermo Electron Corporation; Waltham, MA) using a flame ionization detector. Helium was used as carrier gas. FAMES were analyzed using a silica CP-Sil 88 capillary column (100 m/0.25 mm internal diameter/0.20 µm film thickness, Varian; Palo Alto, CA).

### 2.9. Intracellular flux of PAL

C2C12 cells were seeded in 12.5 cm<sup>2</sup> flasks with vented caps, differentiated and treated for 16 h as described in the cell treatment section. All the groups were then incubated for 3 h at 37 °C 5% CO<sub>2</sub> in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 0.38 mM fatty acid-free BSA, 1 mM L-carnitine, and 0.5 mM PAL of which 20 µM was [1-<sup>14</sup>C] PAL (2 µCi/mL). ALA, EPA or DHA at 50 µM were added along the incubation in the corresponding group. CO<sub>2</sub> trapping was performed using benzethonium hydroxide at room temperature for 45 min, on media collected and treated with perchloric acid at 40% (vol/vol). Cell homogenates were scrapped and lysed in order to realize lipid extraction. Lipid extraction was done according to the Folch method [15]. Thin layer chromatography (TLC) was performed on lipid extracts to separate the different classes of lipids (PL, TG and DG). TLC on silica gel plates was done in duplicate using hexane:diethylether:acetic acid (74:25:1) as the mobile phase. Lipid spots were visualized with iodine for excision. Radioactivity and total quantification was quantified in each spot by liquid scintillation and enzymatic kits respectively (Diasys, ref.157109910021 for PL, TG and DG). All values obtained with liquid scintillation were reported to specific activity of the [1-<sup>14</sup>C] PAL treatment and normalized to protein levels evaluated by BioRad Protein assay.

### 2.10. Ceramides content analysis

After the 16-h treatment with FA, cells were washed three times with PBS and harvested using trypsin for 5 min before centrifugation. Supernatant was removed and cells were washed twice and flushed under nitrogen. Cells were kept at –80 °C until lipid extraction using the Bligh and Dyer method [16]. Ceramide quantification was performed in acetonitrile:methanol (1:1) as mobile phase using LC-MS/MS (alliance 2695 Waters/TSQ Quantum Ultra Thermo Electron).

### 2.11. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNA extraction was performed using TRIzol® (Invitrogen, 1 mL/10 cm<sup>2</sup>) according to the manufacturer's instructions. Chloroform was added (0.2 mL/mL of TRIzol®) and samples were mixed and centrifuged 15 min at 12,000 g and 4 °C. Aqueous phase containing ribonucleic acid (RNA) was collected, mixed with isopropanol to precipitate RNA and centrifuged (12,000 g, 4 °C, 15 min). After centrifugation, the pellet was washed with ethanol 70% (vol/vol), dried and suspended in water. RNA quantification and integrity were verified by measuring the ratio of optical density at 260 nm and 280 nm and by agarose gel migration, respectively. Two micrograms of total RNA was used to realize reverse transcription. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to evaluate gene expression using specific primers and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q system (Qiagen). Messenger RNA (mRNA) quantification was assayed with Rotor-Gene software, using standard curve of native cDNA and serial dilutions. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (hprt) gene was used as housekeeping gene. The sequences of the sense and antisense primers used for amplification were as described: Cpt1a, 5' GATGACGGCTATGGTGTTCCTAC3' and 5'TCCCAAAGCGGTGTGAGTCTG3'; Cpt1b, 5'TGGGACTGGTCGATTGCATC3' and 5'TCAGGGTTTGTCCG

AAGAAGAA3'; Fat/cd36, 5'TTGACTACTATCTGGCTAAATGAGA3' and 5'CTTGTTTTGAACATTTCTGCTT3'; hprt, 5'TGCTGACCTGCTGGATTAC3' and 5'AGTTGAGAGATCATCTCCAC3'; hsl, 5'GTACCACCCTGCAGTCTC3' and 5'AATGGTCTCTGCCTCTGTC3'; pgc1a 5'GAAGTGGTGTAGCGACCAATC3' and 5'AATGAGGGCAATCCGCTTCA3'; pparg 5'CAAGAA TACCAAAGTGCATCAA3' and 5'GAGCTGGTCTTTTCAGAATAATAAG3'.

### 2.12. Statistical analysis

All data are presented as mean ± standard error about the mean (SEM). To avoid bias between replicates of experiments on intracellular flux of PAL, membrane fluidity and qRT-PCR, data were normalized to the control of the same experiment. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare each treatment. If significant (p value <0.05), one-way ANOVA was followed by Fischer's Least Significant Difference post hoc test. All statistical analyses were performed using StatView version 5.0 (SAS Institute Inc.).

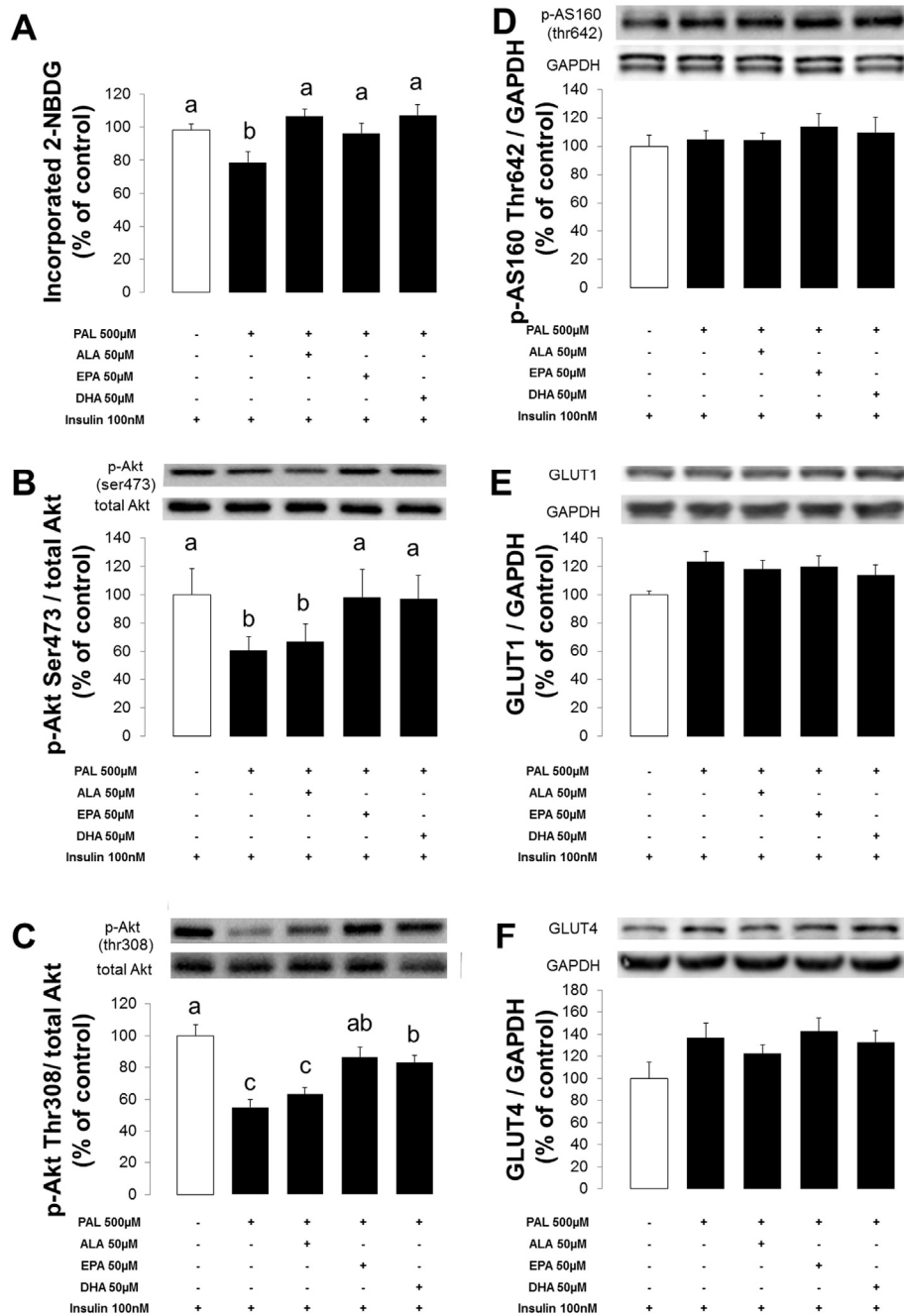
## 3. Results

### 3.1. PAL-induced impairment of glucose uptake was reversed by n – 3PUFA

We first evaluated the effect of the different fatty acid treatments on myotube glucose uptake using a fluorescent deoxyglucose analog (Fig. 1A). Insulin-stimulated glucose uptake was significantly decreased in myotubes exposed to PAL compared to controls (p < 0.05), whereas it was restored to control values with ALA, EPA and DHA supplementations (p < 0.001, p < 0.05 and p < 0.001 vs. PAL, respectively). As AKT plays a central role in insulin response, AKT phosphorylation on serine 473 and threonine 308 was used as a marker of insulin sensitivity (Fig. 1B and C). PAL significantly decreased AKT phosphorylation on both residues compared to control (p < 0.0001). EPA and DHA (p < 0.0001) similarly restored serine and threonine phosphorylation of AKT compared to PAL alone (p < 0.0001), whereas ALA had no effect (p = 0.17). However, the phosphorylation of AKT substrate (AS160, Fig. 1D), involved in GLUT4 translocation to the membrane, was not modulated by treatments. Furthermore, no differences between groups were observed on protein expression of glucose transporters GLUT1 (Fig. 1E) and GLUT4 (Fig. 1F).

### 3.2. Membrane fluidity was improved by EPA and DHA

The phosphorylation cascade involved in insulin signaling requires protein-protein interactions and could be influenced by membrane fluidity. Treatment with PAL did not significantly modulate the membrane fluidity of C2C12 myotubes compared to controls (Fig. 2). However, EPA and DHA supplementations led to a significant decrease in anisotropy indicating a greater membrane fluidity compared to PAL alone (p < 0.02 and p < 0.005 vs. PAL, respectively). ALA supplementation only partially improved membrane fluidity vs. PAL (p = 0.086). To further understand how EPA and DHA improved membrane fluidity and could modulate intracellular insulin signaling events, cellular lipid profiles were analyzed by gas chromatography (Table 1). PAL enrichment was increased in all PAL-treated conditions with or without supplementations compared to the control (p < 0.01). ALA supplementation only slightly increased its incorporation into cellular lipids (2%), whereas EPA and DHA incorporation increased by 14% in the corresponding treatment compared to PAL alone (p < 0.001). The enrichment in docosapentaenoic acid (DPA, C22:5 n – 3), an intermediate in DHA formation from EPA was not significantly modulated by any of the treatments (p = 0.1), but tended to be increased in myotubes exposed to EPA supplementation. Other quantified fatty acids are provided in the Supplementary table.



**Fig. 1.** Glucose uptake and signaling proteins in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h. (A) Cells were starved for 3 h before insulin stimulation and the measurement of deoxyglucose analog uptake (n = 26 obtained after six independent experiments). (B–D) Cells were stimulated with 100 nM insulin for 15 min and lysed in RIPA buffer supplemented with phosphatase inhibitors cocktail. Proteins were separated and transferred on PVDF membranes for immunoblotting of serine 473 (B) and threonine 308 (C) phosphorylation of AKT, phosphorylation of AKT substrate of 160 kDa (AS160) on the threonine 642 residue (D), and glucose transporters GLUT1 (E), GLUT4 (F) (n = 6 obtained after three independent experiments). Data are presented as mean ± SEM. Means with different letters were significantly different (p < 0.05) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups. ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.

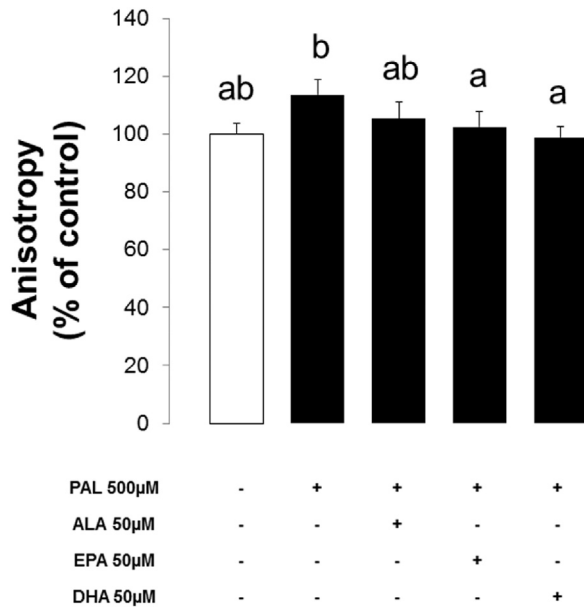
### 3.3. PAL beta-oxidation was improved by EPA and DHA

To study the impact of n – 3PUFA on PAL channeling in skeletal muscle, we treated C2C12 myotubes with [1-<sup>14</sup>C] PAL to study its partial (acid-soluble products, ASP) and total (CO<sub>2</sub>) β-oxidation. Complete β-oxidation of [1-<sup>14</sup>C] PAL was comparable between groups (Fig. 3A) whereas fewer ASP were produced in the presence of PAL alone (Fig. 3B, p < 0.05 vs. control). Adding ALA did not modulate the effect of PAL, whereas EPA partially restored (p = 0.15 vs. PAL) and DHA significantly normalized the production of ASP to control levels (p < 0.01

vs. PAL). Thus, total β-oxidation (Fig. 3C, CO<sub>2</sub> + ASM) was significantly decreased with PAL treatment (p < 0.01 vs. control) and fully restored in EPA and DHA groups vs. control (p < 0.05 vs. PAL). In contrast, PAL β-oxidation in the ALA-supplemented treatment only tended to be increased vs. PAL treatment (Fig. 3C, p = 0.08).

### 3.4. PAL-induced lipotoxicity was modulated by EPA and DHA

[1-<sup>14</sup>C] PAL incorporation into PL and TG fractions was not differentially affected by FA treatment of C2C12 myotubes (Fig. 3D and E).



**Fig. 2.** Membrane fluidity in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h. Myotubes were submitted to anisotropy analysis, inversely correlated to membrane fluidity ( $n = 8$  obtained after five independent experiments). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups. ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.

However, ALA, EPA or DHA treatments significantly decreased [ $1-^{14}C$ ] PAL incorporation into the DG fraction compared to PAL (Fig. 3F,  $p < 0.05$ ). We also quantified total PL, TG, and DG content in myotubes. Total PL content did not differ between groups (Fig. 4A). Total TG content was significantly decreased with EPA and DHA treatments vs. controls and PAL treatment ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively), whereas the effect of ALA was only significant when compared to PAL alone (Fig. 4B,  $p < 0.05$ ). ALA, EPA or DHA treatments significantly decreased total DG level compared to PAL alone (Fig. 4C,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). Finally, total ceramide content strongly increased in myotubes exposed to PAL but was restored to control levels in all  $n-3$  PUFA treatments (Fig. 4D,  $p < 0.05$  vs. PAL).

### 3.5. PAL-induced PKC $\theta$ phosphorylation was reversed by EPA and DHA

As  $n-3$  PUFA supplementation led to decreased DG and ceramide contents, these improvements were expected to modulate PKC $\theta$  activation and insulin signaling. PKC $\theta$  activation on threonine 538 residue was markedly increased by PAL treatment compared to control (Fig. 5A,  $p < 0.0001$ ). Among  $n-3$  PUFA treatments, EPA and DHA were able to

inhibit PKC $\theta$  phosphorylation ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$  vs. PAL) whereas ALA had no effect.

### 3.6. PAL-induced *trb3* gene expression was reversed by EPA and DHA

To evaluate whether the modifications in insulin signaling were related to TRB3, we evaluated *trb3* gene expression in C2C12 myotubes exposed to FA treatments. We found that *trb3* mRNA levels were increased in PAL and ALA conditions compared to controls (Fig. 5B,  $p < 0.0001$ ). In agreement with the variation in AKT activation, both EPA and DHA supplementations restored *trb3* mRNA levels to control values ( $p < 0.0001$  vs. PAL).

### 3.7. $n-3$ PUFA modulated gene expression of mitochondrial $\beta$ -oxidation and lipid metabolism markers

To further decipher the differential effects of  $n-3$  PUFA, we investigated the gene expression profiles of key proteins involved in mitochondrial biogenesis and  $\beta$ -oxidative capacity (Fig. 6A, B and C). The mRNA levels of carnitine palmitoyl transferase 1a (*cpt1a*) were similar in PAL and ALA conditions vs. control (Fig. 6A). A strong increase of *cpt1a* gene expression was observed in EPA and DHA-supplemented conditions ( $p < 0.001$  vs. PAL,  $p < 0.0001$  vs. PAL respectively). Carnitine palmitoyl transferase 1b (*cpt1b*) gene expression was significantly increased in PAL, ALA and DHA treatments ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  vs. control respectively) but not in EPA treatment ( $p = 0.118$  vs. control) (Fig. 6B). Gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a (*pgc1a*) was decreased in all PAL conditions vs. control, with or without  $n-3$  PUFA supplementation (Fig. 6C).

Fig. 6 (panels D–F) illustrates the effect of FA treatments on mRNA levels of proteins involved in lipid transport (fatty acid transporter, fat/cd36), lipolysis (hormone sensitive lipase, hsl) and lipogenesis (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, pparg). Gene expression of fat/cd36 was decreased in PAL, ALA and EPA conditions (Fig. 6D,  $p < 0.001$  vs. control). DHA supplementation of PAL-treated cells totally restored fat/cd36 gene expression compared to PAL treatment ( $p < 0.01$  vs. PAL). Hsl mRNA level was only modulated in DHA-supplemented myotubes, inducing a significant increase compared to other conditions (Fig. 6E). Messenger RNA level of pparg was not differentially regulated between treatments (Fig. 6F).

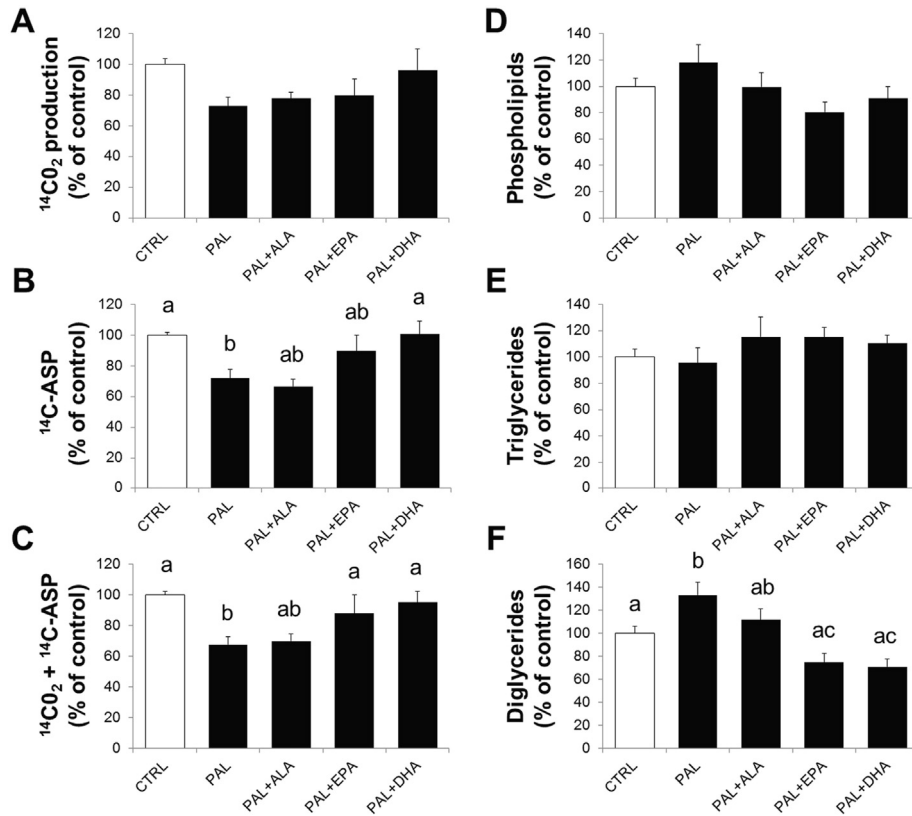
## 4. Discussion

The PAL-mediated inhibition of insulin signaling in skeletal muscle has been extensively described. It is well known that PAL represses insulin response in C2C12 muscle cells [17,18]. There is growing evidence pointing to the beneficial effects of  $n-3$  PUFA on insulin sensitivity in animals and humans [19], but the specific effects of the main  $n-3$  PUFA, i.e. ALA, EPA and DHA, remain unknown. Here we show almost complete restoration of AKT activation and fatty acid metabolism in

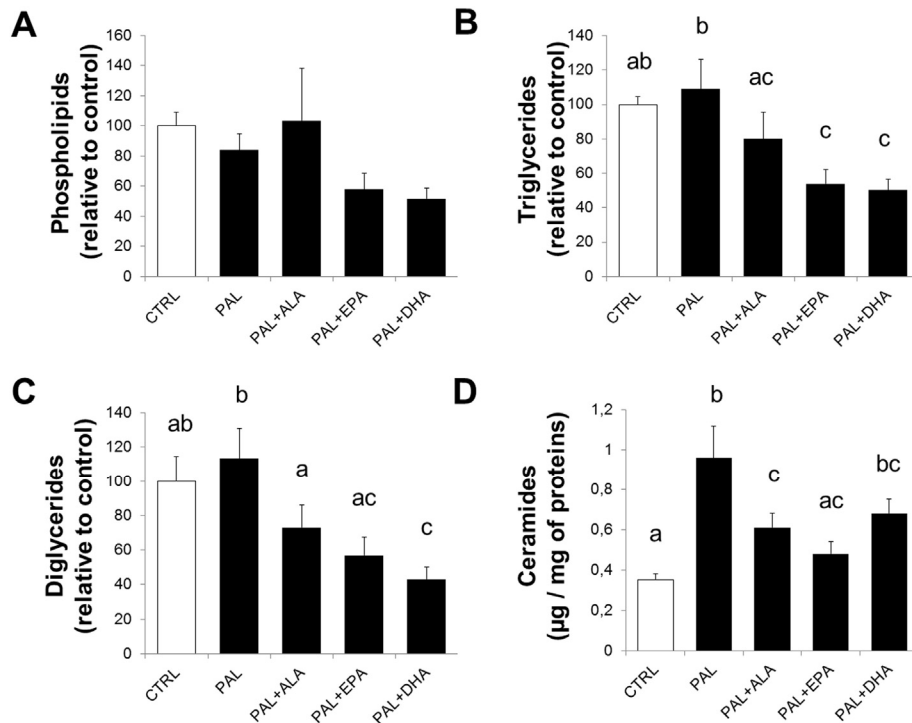
**Table 1**  
Cellular content of PAL and  $n-3$  PUFA in C2C12 treated cells. C2C12 cells were harvested using trypsin and collected by centrifugation. Lipid extracts were methylated and purified before gas chromatography analysis. Results were expressed as a percentage of total fatty acids detected. ND stands for not detectable fatty acid. ( $n = 3$  obtained after two independent experiments). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups. ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.

	CTRL	PAL	PAL + ALA	PAL + EPA	PAL + DHA
% of total fatty acids					
C16:0	13.9 $\pm$ 2.04 b	42.94 $\pm$ 0.95 a	36.72 $\pm$ 6.12 a	35.25 $\pm$ 2.43 a	33.08 $\pm$ 2.66 a
C18:3n-3	ND	<1% b	2.96 $\pm$ 0.34 a	<1% b	<1% b
C20:5n-3	0.49 $\pm$ 0.06 b	0.40 $\pm$ 0.03 b	0.75 $\pm$ 0.03 b	15.18 $\pm$ 1.33 a	0.40 $\pm$ 0.15 b
C22:5n-3	1.33 $\pm$ 0.28 ab	0.86 $\pm$ 0.14 b	1.33 $\pm$ 0.33 ab	1.96 $\pm$ 0.21 a	0.96 $\pm$ 0.35 b
C22:6n-3	1.39 $\pm$ 0.39 b	0.67 $\pm$ 0.10 b	0.80 $\pm$ 0.07 b	0.54 $\pm$ 0.04 b	14.69 $\pm$ 1.04 a

<1%, mostly undetectable.

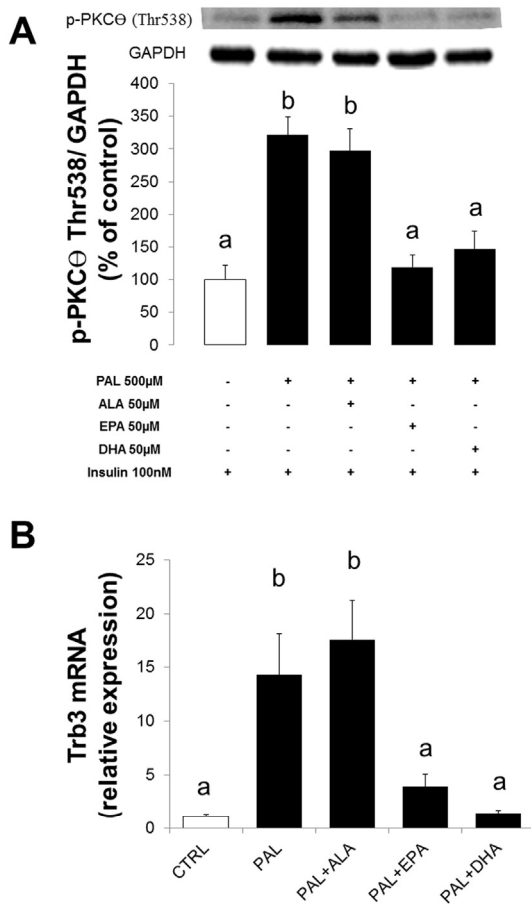


**Fig. 3.** [<sup>1-14</sup>C] PAL β-oxidation and incorporation in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h, followed by a 3-h incubation with [<sup>1-14</sup>C] PAL. (A) <sup>14</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (B) <sup>14</sup>C-acid soluble products (<sup>14</sup>C-ASP) were counted by liquid scintillation to evaluate complete, partial β-oxidation and (C) the sum (<sup>14</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + <sup>14</sup>C-ASP), respectively. Lipids were extracted and submitted to TLC for PAL incorporation analysis in (D) <sup>14</sup>C-phospholipid, (E) <sup>14</sup>C-triglyceride and (F) <sup>14</sup>C-diglyceride fractions. Means with different letters were significantly different (*p* < 0.05) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups (*n* = 10 obtained after five independent experiments). ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.



**Fig. 4.** Quantification of lipid fractions in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h. (A–C) Lipid extracts were separated by TLC. (A) Phospholipids, (B) triglycerides, (C) diglycerides were scrapped, eluted from silica gel and quantified using a kit (*n* = 8 obtained after four independent experiments). (D) Ceramides were quantified by LC-MS/MS (*n* = 6 obtained after three independent experiments). Means with different letters were significantly different (*p* < 0.05) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups. ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.





**Fig. 5.** PKC phosphorylation and Trb3 gene expression in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h. (A) Cells were then stimulated with 100 nM insulin for 15 min and lysed in RIPA buffer supplemented with phosphatase inhibitors cocktail. Proteins were separated and transferred on PVDF membranes for immunoblotting to detect phosphorylation of protein kinase C theta (PKC $\theta$ ) on threonine 538 residue ( $n = 6$  obtained after three independent experiments). (B) Cells were then lysed in TRIzol $^{\circledR}$  before RNA extraction and reverse transcription. Quantitative PCR were then performed to study gene expression of Trb3 ( $n = 6$  obtained after four independent experiments). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups. ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.

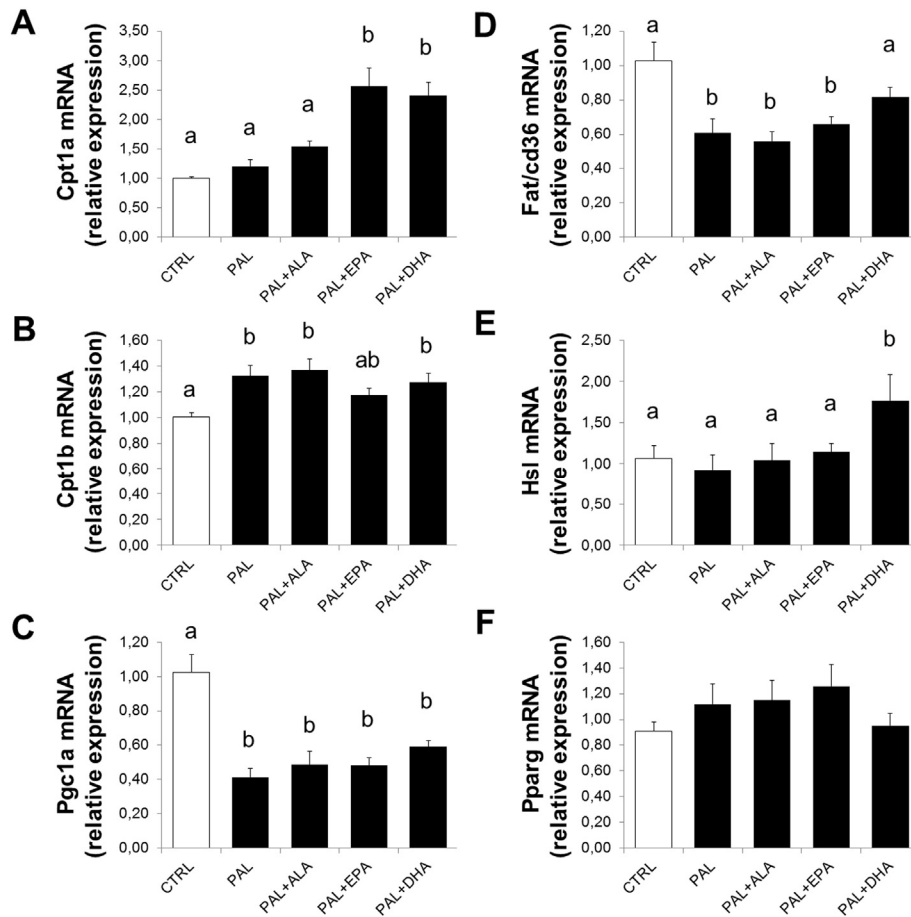
C2C12 myotubes exposed to PAL in the presence of added EPA and DHA. Only DHA was previously studied at physiological doses, showing protective effect against insulin resistance in C2C12 myotubes [20]. Surprisingly, we found that despite no improvement in insulin-induced AKT activation, ALA nevertheless improved C2C12 glucose uptake. However, neither GLUT1 protein expression which is involved in basal glucose uptake [21], nor downstream targets of AKT, *i.e.* AS160 phosphorylation and GLUT4 protein expression which are functionally connected [22], were differentially regulated between fatty acid treatments, even in the PAL-treated group compared to the control group. It has been demonstrated in AKT2-null mice that AKT2 mediated glucose uptake [23] whereas AKT1 was implicated in protein synthesis [24]. Here we investigated the pan-AKT and we cannot dissociate the alteration of one or another isoform. We cannot rule out the hypothesis that AKT1 phosphorylation was more affected than the phosphorylation of AKT2 during PAL treatment. Furthermore, AS160 could be phosphorylated by an AKT-independent mechanism, involving the activation of PKCzeta by phosphoinositide-dependent kinase (PDK1) [25,26]. However, phosphorylation of PDK1 and PKCzeta on their activation sites (serine 241 and threonine 410, respectively) were not modulated

in our experiment (*data not shown*). In addition to the PI3-K/AKT pathway, insulin is also involved in the activation of the Rac1/TC10 pathway which has been demonstrated to favor tethering of GLUT4 vesicle to the plasma membrane before fusion [27]. This pathway was found to be impaired by ceramides [28] which were decreased by all  $n-3$ PUFA treatments of C2C12 myotubes in the present study. As investigation of this pathway was not performed in this study, we can only hypothesize its involvement in the alteration of glucose uptake and a beneficial effect of ALA, EPA and DHA on its regulation. Furthermore, previous studies have highlighted the importance of membrane fluidity in the regulation of the insulin signaling pathway [29]. As EPA and DHA improved membrane fluidity and ALA tended to improve it in comparison to PAL treatment, these results could partially explain the improvement in glucose uptake with all  $n-3$ PUFA. Finally, Alkhatieb *et al.* demonstrated in soleus muscle of male Sprague-Dawley rats that PAL could deteriorate muscle glucose uptake through two distinct pathways [30]. The first one was acute and involved an impaired AS160 phosphorylation and an impaired GLUT4 translocation to the membrane [30]. The second one occurred after 12 h of treatment and was associated with a markedly reduced intrinsic activity of GLUT4 thus further participating to a decreased glucose uptake [30]. Therefore, a specific impact of  $n-3$ PUFA on the intrinsic activity of GLUT4 cannot be ruled out. Although ALA restored glucose uptake in isolated muscle cells, *in vivo* experimentations argue that ALA has a weaker protective effect against insulin resistance than EPA and DHA. Indeed, Andersen *et al.* [31] demonstrated in rats that EPA and DHA had similar effects on whole-body insulin sensitivity whereas ALA had no significant effect. Robbez Masson *et al.* [32] also found no beneficial effects of ALA during insulin tolerance tests on fructose-fed rats.

To explain the differential effects of  $n-3$ PUFA on insulin sensitivity, we raised the hypothesis that  $n-3$ PUFA could alter PAL metabolism and thus modulate its lipotoxic effects. Our data showed that partial and total  $\beta$ -oxidation were decreased during PAL treatment. These data are in agreement with previous studies showing decreased FA  $\beta$ -oxidation in L6 myotubes exposed to 200–800  $\mu$ M of PAL during 8 h [2]. Decreased PAL  $\beta$ -oxidation has also been observed in cultured human myotubes from patients with type 2 diabetes [33]. Interestingly, we found that low doses of EPA and DHA were able to restore PAL  $\beta$ -oxidation. Preventive effects of DHA [12], EPA [34] or a 1:2.5-ratio combination of DHA plus EPA [10] have been observed on  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle cells after a 24-h treatment. Here we also demonstrated a specific enhancement of *cpt1a* gene expression in the presence of similar doses of EPA and DHA within 16 h which could at least partially explain the failure of ALA supplementation to restore PAL  $\beta$ -oxidation. DHA was previously found to increase *cpt1a* mRNA levels at lower doses in C2C12 myotubes and using a nutritional supplementation in mice [20]. The expression of *Cpt1b* and *pgc1a* genes was not modulated by  $n-3$ PUFA in PAL-exposed myotubes, confirming previous observations in the gastrocnemius muscle from obese mice fed a high-fat diet [35].

Besides alterations in its  $\beta$ -oxidative rate, PAL treatment induced PAL incorporation into DG compared to control cells and also significantly increased total DG and ceramide contents. Interestingly, we showed for the first time that even a low dose of  $n-3$ PUFA (50  $\mu$ M) was able to reduce PAL incorporation into DG and decrease total DG and ceramide content. Similarly, Coll *et al.* (16) demonstrated that PAL incorporation into DG was higher with PAL alone compared to oleate and that the combination of 500  $\mu$ M PAL to 300  $\mu$ M oleate alone promoted TG accumulation at the expense of DG vs. PAL [17]. Thus monounsaturated fatty acids inhibit the production of lipotoxic derivatives by increasing the storage of PAL into TG. Likewise, EPA and DHA decreased PAL incorporation into DG or ceramides by preferentially addressing the FA to mitochondrial  $\beta$ -oxidation. The decrease in myotube DG content in the presence of DHA could also be related to the increase in *hsl* gene expression. Furthermore, in agreement with previous results obtained with very high doses (600  $\mu$ M) of  $n-3$ PUFA [11], the increase





**Fig. 6.** Gene expression of markers involved in lipid metabolism in C2C12 treated cells. Cells were treated with PAL without or with ALA, EPA or DHA for 16 h. Cells were then harvested and lysed in TRIzol® before RNA extraction and reverse transcription. Quantitative PCR were then performed to study gene expression of (A) carnitine palmitoyl-transferase 1a (cpt1a), (B) carnitine palmitoyl-transferase 1b (cpt1b), (C) peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a (pgc1a), (D) fatty acid transporter (fat/cd36), (E) hormone sensitive lipase (hsl) and (F) peroxisome proliferator-activated receptor gamma (pparg). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Means with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by ANOVA and Fischer PLSD post-hoc test between groups ( $n = 8$  obtained after four independent experiments). ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, PAL: palmitate.

in fat/cd36 mRNA levels in DHA-treated cells compared to PAL alone suggested increased lipid uptake by C2C12 muscle cells to facilitate fatty acid oxidation. Lanza *et al.* also observed that supplementation with fish oil containing both EPA and DHA reduced ceramide content in muscles from mice fed a high-fat diet [36]. The present study suggests that the impact of EPA and DHA on DG and ceramide contents prevented PKC activation and thus PAL-induced AKT inhibition [18, 37]. In contrast, despite a reduction in DG and ceramide contents, ALA supplementation still had a weaker effect on PAL oxidation compared to EPA and DHA and failed to prevent PAL incorporation into DG, which is consistent with the fact that ALA did not reduce PAL-induced PKC activation or PAL-induced AKT inhibition.

Furthermore, TRB3 gene expression was higher in PAL and PAL + ALA conditions, mimicking the pattern of PKC $\theta$  activation. Ding *et al.* demonstrated that TRB3 protein expression was partially activated by PKC zeta isoform in hepatic HepG2 cells [38]. The signaling pathways that activate TRB3 are not yet fully understood, and therefore other PKC isoforms might modulate TRB3 expression and regulate insulin signaling pathways in muscle cells.

In summary, PAL-induced IR is differentially modulated by  $n-3$ PUFA in muscle cells. EPA and DHA improve PAL metabolism by enhancing PAL  $\beta$ -oxidation and decreasing PAL incorporation into lipotoxic compounds. These effects could be due to the modulation of key genes involved in fatty acid metabolism, especially those involved in  $\beta$ -oxidation. The effects of ALA on PAL metabolism were limited and probably not sufficient to reduce the deleterious impacts

of PAL on C2C12 muscle cells, despite the observed improvement of glucose uptake. Since ALA, DHA and EPA had differential effects on lipid metabolism but similar effects on glucose uptake, the modulation of lipotoxicity in myotubes and glucose uptake are then probably unrelated. Only the alterations in PKC $\theta$  activation and Trb3 gene expression could link the effects of DHA and EPA on lipid metabolism to the restoration of AKT phosphorylation by insulin. EPA and DHA emerge as better candidates than ALA to improve fatty acid metabolism in skeletal muscle cells, notably *via* their ability to increase mitochondrial  $\beta$ -oxidation. These results are in total agreement with the recommendation for the intake of both ALA and its derivatives DHA and EPA in humans. Despite the observation that ALA could exert specific effects on insulin signaling, without any significant conversion to EPA and DHA, only a marked incorporation of these two last fatty acids increased muscle oxidative capacities. Further studies are still necessary to determine if nutritional supply of ALA could be effective to maintain adequate EPA and DHA tissue content and beneficial metabolic effects.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2015.10.003>.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest. They were completely free to write and to elaborate the content of the present study.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from Avril (23000596) for the PhD thesis of A. Pinel and our research. We also thank Lesieur for their scientific support.

## References

- [1] G. Riccardi, R. Giacco, A.A. Rivellese, Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome, *Clin. Nutr.* 23 (2004) 447–456.
- [2] A.S. Pimenta, M.P. Gaidhu, S. Habib, M. So, S. Fediuc, M. Mirpourian, M. Musheev, R. Curi, R.B. Ceddia, Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells, *J. Cell. Physiol.* 217 (2008) 478–485.
- [3] J.A. Chavez, T.A. Knotts, L.P. Wang, G. Li, R.T. Dobrowsky, G.L. Florant, S.A. Summers, A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10297–10303.
- [4] C. Yu, Y. Chen, G.W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J.K. Kim, S.W. Cushman, G.J. Cooney, B. Atcheson, M.F. White, E.W. Kraegen, G.I. Shulman, Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50230–50236.
- [5] T.E. Fox, K.L. Houck, S.M. O'Neill, M. Nagarajan, T.C. Stover, P.T. Pomianowski, O. Unal, J.K. Yun, S.J. Naides, M. Kester, Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12450–12457.
- [6] H.J. Koh, T. Toyoda, M.M. Didesch, M.Y. Lee, M.W. Sleeman, R.N. Kulkarni, N. Musi, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1871.
- [7] L. Zhang, W. Keung, V. Samokhvalov, W. Wang, G.D. Lopaschuk, Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1–22.
- [8] M. Taouis, C. Dagou, C. Ster, G. Durand, M. Pinault, J. Delarue, N–3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2002) 664–671.
- [9] B.M. Jucker, G.W. Cline, N. Barucci, G.I. Shulman, Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: a <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study, *Diabetes* 48 (1999) 134–140.
- [10] R.A. Vaughan, R. Garcia-Smith, M. Bisoffi, C.A. Conn, K.A. Trujillo, Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells, *Lipids Health Dis.* 11 (2012) 142.
- [11] V. Aas, M.H. Rokling-Andersen, E.T. Kase, G.H. Thoresen, A.C. Rustan, Eicosapentaenoic acid (20:5 n–3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 366–374.
- [12] Y.Y. Lam, G. Hatzinikolas, J.M. Weir, A. Janovska, A.J. McAinch, P. Game, P.J. Meikle, G.A. Wittert, Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n–3 and n–6 polyunsaturated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) 468–475.
- [13] Y. Zhang, X. Yang, H. Shi, L. Dong, J. Bai, Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes, *Lipids Health Dis.* 10 (2011) 122.
- [14] R.T. Enos, K.T. Velazquez, J.L. McClellan, T.L. Cranford, M.D. Walla, E.A. Murphy, Reducing the dietary omega-6:omega-3 utilizing alpha-linolenic acid; not a sufficient therapy for attenuating high-fat-diet-induced obesity development nor related detrimental metabolic and adipose tissue inflammatory outcomes, *PLoS One* 9 (2014), e94897.
- [15] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [16] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [17] T. Coll, E. Eyre, R. Rodriguez-Calvo, X. Palomer, R.M. Sanchez, M. Merlos, J.C. Laguna, M. Vazquez-Carrera, Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11107–11116.
- [18] J.A. Chavez, S.A. Summers, Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 101–109.
- [19] D. Fedor, D.S. Kelley, Prevention of insulin resistance by n–3 polyunsaturated fatty acids, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 12 (2009) 138–146.
- [20] F. Capel, C. Acquaviva, E. Pitois, B. Laillet, J.P. Rigaudiere, C. Jouve, C. Pouyet, C. Gladine, B. Comte, C. Vianey Saban, B. Morio, DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation, *J. Nutr. Biochem.* (2015).
- [21] A.L. Olson, J.E. Pessin, Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family, *Annu. Rev. Nutr.* 16 (1996) 235–256.
- [22] H.F. Kramer, C.A. Witzcak, E.B. Taylor, N. Fujii, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 31478–31485.
- [23] R.S. Garofalo, S.J. Orena, K. Rafidi, A.J. Torchia, J.L. Stock, A.L. Hildebrandt, T. Coskran, S.C. Black, D.J. Brees, J.R. Wicks, J.D. McNeish, K.G. Coleman, Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 197–208.
- [24] H. Cho, J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, M.J. Birnbaum, Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38349–38352.
- [25] M.M. Chou, W. Hou, J. Johnson, L.K. Graham, M.H. Lee, C.S. Chen, A.C. Newton, B.S. Schaffhausen, A. Toker, Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1, *Curr. Biol.* 8 (1998) 1069–1077.
- [26] G. Bandyopadhyay, M.L. Standaert, L. Galloway, J. Moscat, R.V. Farese, Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes, *Endocrinology* 138 (1997) 4721–4731.
- [27] S. Ueda, S. Kitazawa, K. Ishida, Y. Nishikawa, M. Matsui, H. Matsumoto, T. Aoki, S. Nozaki, T. Takeda, Y. Tamori, A. Aiba, C.R. Kahn, T. Kataoka, T. Satoh, Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma, *FASEB J.* 24 (2010) 2254–2261.
- [28] L. JeBailey, O. Wanono, W. Niu, J. Roessler, A. Rudich, A. Klip, Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells, *Diabetes* 56 (2007) 394–403.
- [29] J.S. Elmendorf, Fluidity of insulin action, *Mol. Biotechnol.* 27 (2004) 127–138.
- [30] H. Alkhatieb, A. Chabowski, J.F. Glatz, J.F. Luiken, A. Bonen, Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007), E783–793.
- [31] G. Andersen, K. Harnack, H.F. Erbersdobler, V. Somoza, Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats, *Ann. Nutr. Metab.* 52 (2008) 250–256.
- [32] V. Robbez Masson, A. Lucas, A.M. Gueugneau, J.P. Macaire, J.L. Paul, A. Grynberg, D. Rousseau, Long-chain (n–3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats, *J. Nutr.* 138 (2008) 1915–1922.
- [33] M. Gaster, A.C. Rustan, H. Beck-Nielsen, Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes, *Diabetes* 54 (2005) 648–656.
- [34] S.S. Bakke, C. Moro, N. Nikolic, N.P. Hessvik, P.M. Badin, L. Lauvhaug, K. Fredriksson, M.K. Hesselink, M.V. Boekschoten, S. Kersten, M. Gaster, G.H. Thoresen, A.C. Rustan, Palmitic acid follows a different metabolic pathway than oleic acid in human skeletal muscle cells; lower lipolysis rate despite an increased level of adipose triglyceride lipase, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 1323–1333.
- [35] O. Horakova, D. Medrikova, E.M. van Schothorst, A. Bunschoten, P. Flachs, V. Kus, O. Kuda, K. Bardova, P. Janovska, M. Hensler, M. Rossmesl, R. Wang-Sattler, C. Prehn, J. Adamski, T. Illig, J. Keijer, J. Kopecky, Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n–3 PUFA and rosiglitazone in dietary obese mice, *PLoS One* 7 (2012), e43764.
- [36] I.R. Lanza, A. Blachnio-Zabielska, M.L. Johnson, J.M. Schimke, D.R. Jakaitis, N.K. Lebrasseur, M.D. Jensen, K. Sreekumaran Nair, P. Zabielski, Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304 (2013), E1391–1403.
- [37] C. Schmitz-Peiffer, D.L. Craig, T.J. Biden, Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24202–24210.
- [38] J. Ding, S. Kato, K. Du, PI3K activates negative and positive signals to regulate TRB3 expression in hepatic cells, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 1566–1574.

## 1.2. Oméga-3 et inflammation des cellules musculaires C2C12

ROLE DE LA p38MAPK DANS L'INFLAMMATION INDUITE PAR LE  
PALMITATE ET EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES ACIDES GRAS  
POLYINSATURES OMEGA-3

## **ROLE DE LA p38MAPK DANS L'INFLAMMATION INDUITE PAR LE PALMITATE ET EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES OMEGA-3**

**Introduction :** L'obésité est fréquemment associée à une insulino-résistance (IR). Le palmitate (PAL) est un acide gras saturé pouvant induire une IR au niveau musculaire. Il a également été démontré qu'il a la capacité d'induire une inflammation *via* le récepteur au lipopolysaccharide (LPS) (*toll-like receptor 4*, TLR4) et l'activation du facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B). Il induirait ensuite l'expression des gènes de l'interleukine-6 (IL-6), du *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) et de la cyclooxygénase 2 (COX-2) impliqués dans l'inflammation. La diminution de la réponse à l'insuline dans le muscle squelettique pourrait donc être influencée par le statut inflammatoire du tissu. En outre, une activation de la voie inflammatoire p38 *mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) a également été observée après un traitement de cellules musculaires au PAL ou au LPS et pourrait ainsi expliquer la relation entre inflammation et IR. En effet, le DHA permet d'inhiber l'IR, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la p38MAPK. Dans cette étude, nous avons exploré le rôle de la p38MAPK dans l'inflammation induite par le PAL et la capacité de l'ALA, de l'EPA et du DHA à l'inhiber.

**Matériels et méthodes :** Des cellules musculaires C2C12 ont été exposées à 500 $\mu$ M de PAL en présence ou absence d'un inhibiteur de la voie p38MAPK (10 $\mu$ M SB203580, SB) durant 16 heures. Après incubation, les protéines ou les ARN ont été extraits afin de quantifier la phosphorylation de la p38MAPK, la phosphorylation de la kinase AKT, et l'expression des gènes d'IL-6, TNF- $\alpha$  et COX-2.

**Résultats :** Après 16h d'incubation, une activation de la p38MAPK a été induite par les traitements au PAL. Alors qu'une co-incubation en présence d'ALA n'a pas eu d'effet sur cette activation, l'ajout d'EPA ou de DHA a totalement inhibé l'activation de la protéine p38MAPK. L'implication de cette kinase dans l'induction de l'inflammation par le PAL a été démontrée par l'inhibition de l'induction de l'expression des gènes IL-6, TNF- $\alpha$  et COX-2 après 16h d'incubation au PAL par l'utilisation de SB. L'EPA et le DHA réduisent aussi significativement cette induction. Quant à l'ALA, il n'a permis qu'une inhibition partielle de l'expression de ces gènes induits par le PAL. Après 16h de traitement et une stimulation à l'insuline (100nM), nous avons confirmé que l'activation d'AKT a été restaurée par l'EPA et le DHA. Toutefois l'ajout de SB durant le traitement n'a pas permis de restaurer son activation dans les groupes PAL et PAL + ALA et n'a pas eu d'effet additif dans les groupes EPA et DHA.

**Conclusion :** Les expérimentations menées suggèrent que l'activation de la p38MAPK est cruciale dans le statut inflammatoire des cellules musculaires C2C12 traitées au PAL. Toutefois cette voie ne semblerait pas impliquée dans l'IR des cellules musculaires. Les AGPI n-3 EPA et DHA ont démontré un effet anti-inflammatoire important qui semble être lié à l'activation de cette kinase. A l'inverse et en accord avec les résultats sur l'insulino-sensibilité, l'ALA semble moins efficace pour réduire l'inflammation induite par le PAL dans le muscle squelettique.

## Introduction

L'obésité est associée à un risque accru de développer une insulino-résistance (IR) et une inflammation de bas-grade, conduisant au syndrome métabolique et au diabète de type 2. L'acide gras saturé (AGS) palmitique (PAL), est capable d'induire une IR en inhibant la phosphorylation de la protéine AKT sur son résidu ser473 (Chavez *et al.* 2003). Le PAL est aussi capable d'induire une inflammation dans les cellules musculaires. Ainsi, le PAL induit l'activation du *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) en favorisant la dégradation de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules musculaires C2C12 (Jove *et al.* 2005; Jove *et al.* 2006). Le PAL induit également l'activation des kinases de la famille des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) p38MAPK et *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) qui peuvent également participer à l'inflammation musculaire (Pillon *et al.* 2012). L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par le PAL serait partiellement due à son action *via* le récepteur *toll-like receptor 4* (TLR4) qui est également le récepteur du *lipopolysaccharide* (LPS) (Radin *et al.* 2008). De plus, le LPS et le PAL ont des effets similaires sur l'inflammation dans les cellules musculaires C2C12 (Capel *et al.* 2015). Après 16 heures d'incubation avec du PAL ou du LPS, ces cellules musculaires présentaient une augmentation de l'activation de la p38MAPK et de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires *interleukine-6* (IL-6) et *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) ainsi que de la cyclooxygénase 2 (COX-2) impliquée dans la synthèse de prostaglandines (Capel *et al.* 2015). Les acides gras polyinsaturés oméga-3 ( $\omega$ 3) pourraient contrecarrer l'effet du PAL de par leur propriété anti-inflammatoire (Wall *et al.* 2010). En effet, nous avons démontré que 30 $\mu$ M d'acide docosahexaénoïque (DHA) réduisait l'activation de la p38MAPK et l'expression des cytokines après 16 heures d'incubation avec du PAL ou du LPS (Capel *et al.* 2015). Les acides alpha-linolénique (ALA) et éicosapentaénoïque (EPA) pourraient avoir des effets similaires ou différents sur l'inflammation et l'IR en comparaison avec le DHA.

Dans cette partie de résultats, les effets communs et spécifiques des  $\omega$ 3 ALA, EPA et DHA sur l'inflammation induite par le PAL dans les cellules musculaires ont été recherchés. L'utilisation d'un inhibiteur de la p38MAPK, le SB203580, nous a permis d'étudier l'importance de cette kinase et de comparer ses effets à ceux obtenus avec les  $\omega$ 3.

## Matériels et méthodes

### *Réactifs et produits*

Le milieu *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), le cocktail d'inhibiteurs de phosphatases, le PAL, le LPS d'*Escherichia coli* 0111:B4, les anticorps primaires anti-*glyceraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), anti-p38MAPK diphosphorylée (Thr180 et Tyr182) et anti-p38MAPK totale ont été commandés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'albumine bovine exempte d'acide gras (BSA), le sérum de veau fœtal (SVF), le sérum de cheval, la solution tamponnée *phosphate-buffered saline* (PBS) et le mélange pénicilline/streptomycine proviennent de chez PAA (Velizy-Villacoublay, France). Les acides gras oméga-3 (ALA, EPA et DHA) ont été achetés chez Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Le tampon *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA), les anticorps primaires anti-AKT phosphorylée (Ser473), anti-AKT totale et le SB203580 ont été commandés chez Cell Signaling (Leiden, Netherlands). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris proviennent de chez Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) et DAKO (Les Ulis, France), respectivement. L'*enhance chemiluminescence* (ECL), le TRIzol® et le kit de dosage protéique Pierce™ ont été achetés chez Thermo-Scientific (Villebon sur Yvette, France).

### *Culture cellulaire et différenciation*

Les myoblastes de la lignée cellulaire C2C12 ont été commandés chez ATCC (Molsheim, France). Ils ont étéensemencés avec du DMEM enrichi contenant 4,5g/L de glucose, 2,4g/L de bicarbonate de sodium, 10% de SVF et 1% de pénicilline et streptomycine 100X (100UI/mL et 100µg/mL respectivement, P/S). Les cellules ont été gardées dans un environnement humide à 37°C et avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été changé toutes les 48 heures pour assurer une croissance cellulaire optimale jusqu'à 80-90% de confluence. Alors, le milieu de prolifération a été remplacé par du DMEM supplémenté avec 2% de sérum de cheval à la place des 10% de SVF pour assurer la différenciation cellulaire pendant 5 jours avant le traitement des myotubes.

### *Liaison PAL-BSA*

Le PAL a été dissout en éthanol à une concentration de 50mM et a été filtré. Deux pourcents de BSA et 1% de P/S ont été dissouts dans 100mL de DMEM enrichi. Six cent microlitres de

PAL ont ensuite été ajoutés à 14,4mL du milieu préparé (2% BSA, 1% P/S). Le mélange est ensuite soniqué 4 minutes et chauffé pendant 10min à 55°C.

#### *Traitement des cellules*

La solution liée de PAL-BSA a été diluée 4 fois avec le DMEM enrichi en BSA. Le groupe témoin a été traité avec le même DMEM et un pourcentage d'éthanol équivalent (1%) sans acides gras. Après différenciation, les cellules C2C12 ont été lavées trois fois en PBS et traitées pendant une heure avec (1) le milieu témoin (CTRL), (2) la solution liée de PAL-BSA à 500µM (PAL), (3) la solution liée de PAL-BSA avec 1µg/mL de LPS, avec ou sans l'inhibiteur SB203580. Un traitement de 16h a également été réalisé avec (1) le milieu témoin (CTRL), (2) la solution liée de PAL-BSA, (3) la solution liée de PAL-BSA à 500µM et 50µM d'ALA (PAL+ALA), d'EPA (PAL+EPA), ou de DHA (PAL+DHA). Ces conditions ont aussi été réalisées en présence de SB203580 à 10µM.

#### *Western Blot*

Après traitement, les cellules ont été lavées 2 fois en PBS et lysées en tampon de lyse (50mM d'HEPES, 150mM de chlorure de sodium, 10mM d'EDTA, 10mM de NaPPi, 25mM de β-glycerophosphate, 100mM de fluorure de sodium, 10% de glycérol, 1% d'orthovanadate de sodium, 1% de Triton X-100 et 0.5% de cocktail inhibiteur de phosphatases). La concentration protéique des lysats a été déterminée à l'aide du kit de dosage BCA pour garantir un dépôt de 20µg de protéines pour la migration et la séparation en électrophorèse *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF). Après l'incubation des anticorps primaires et secondaires, la fixation a été détectée en utilisant l'ECL, substrat de l'enzyme couplée aux anticorps secondaires. La chimiluminescence a été enregistrée grâce au système d'imagerie MF ChemiBIS 2020 (DNR Bio-Imaging Systems, Israël). Les bandes obtenues ont été quantifiées avec le logiciel MultiGauge V3.2 (Fujifilm, Asnières, France).

#### *Inhibition de la voie p38MAPK pendant la stimulation à l'insuline*

Durant le traitement aux acides gras, 10µM de SB203580 ont été ajoutés au milieu de traitement. Les cellules ont ensuite été traitées avec de l'insuline à 100nM pendant 15 minutes. Elles ont été lysées en tampon de lyse et un western blot a été réalisé comme indiqué

ci-dessus pour la détection de la phosphorylation d'AKT sur le résidu Ser473, de la forme totale d'AKT ainsi que de la phosphorylation de la p38MAPK (Thr180 et Tyr182) et de sa forme totale.

#### *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Les acides ribonucléiques (ARN) ont été extraits en utilisant le TRIzol® (Invitrogen, 1ml/10cm<sup>2</sup>) conformément aux indications du fabricant. Du chloroforme a ensuite été ajouté (0,2mL/mL de TRIzol®) et les échantillons ont été mélangés et centrifugés pendant 15 minutes à 12000g et 4°C. La phase aqueuse contenant les ARN a été collectée et mélangée avec de l'isopropanol pour faire précipiter les ARN avant centrifugation pendant 15 minutes à 12000g et 4°C. Après centrifugation, les culots ont été lavés avec de l'éthanol à 70% (volume/volume), séchés et resuspendus dans de l'eau. La quantification des ARN et leur intégrité ont été vérifiées par la mesure du ratio optique à 260nm et 280nm et par migration sur gel d'agarose, respectivement. Deux microgrammes d'ARN totaux ont été utilisés pour réaliser la transcription inverse des ARN en acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc). Une PCR en temps réel a ensuite été réalisée pour évaluer l'expression génique en utilisant des amorces spécifiques et le réactif « SYBR Green » dans un système Rotor-Gene Q system (Qiagen, Courtabœuf, France). Les ARN messagers ont été quantifiés en utilisant une gamme étalon d'ADNc à l'aide du logiciel Rotor-Gene version 1.7 (Qiagen, Courtabœuf, France). Le gène de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (hprt) a été utilisé comme gène de ménage. Les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification étaient les suivantes : IL-6, 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT-3' et 5'-GAAGTAGGGAAGGCCGTGG-3'; TNF-- $\alpha$ , 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTA-3' et 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'; pgs2 (COX-2), 5'-CATTCTTTGCCAGCACTTC-3' et 5'-GGCGCAGTTTATGTTGTCTG-3'.

#### *Analyses statistiques*

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Une analyse de variance (ANOVA) à une voie a été utilisée pour comparer les traitements entre eux. Si celle-ci était significative ( $p < 0,05$ ), l'ANOVA a été suivie d'un test post-hoc de Fisher. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statview version 5.0 (SAS Institute Inc., Brie Comte Robert, France).



## Résultats

*L'EPA et le DHA réduisent la phosphorylation de la p38MAPK induite par le PAL.*

Le traitement de 16h au PAL a induit une augmentation significative de l'activation de la kinase p38MAPK comparativement au groupe témoin ( $p < 0.01$ ) (Figure 1). La supplémentation en EPA et DHA a inhibé cet effet ( $p < 0,001$  vs. PAL) tandis que l'ALA n'a pas eu d'effet.

*L'EPA et le DHA inhibent l'induction par le PAL de l'expression des gènes de l'inflammation.*

Le traitement des cellules C2C12 avec 500 $\mu$ M de PAL a fortement augmenté l'expression des gènes d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de COX-2 par rapport à celle observée dans le groupe CTRL ( $p < 0,001$  pour chaque gène vs. CTRL) (Figure 2). La supplémentation avec 50 $\mu$ M d'EPA et de DHA restaure complètement les niveaux d'expression de ces gènes ( $p < 0,001$  vs. PAL). L'ALA n'a réduit que partiellement l'induction de l'expression des gènes par le PAL (IL-6 :  $p < 0.001$ , TNF- $\alpha$  :  $p < 0.01$  et COX-2 :  $p < 0.05$  vs. PAL). De manière intéressante, l'utilisation de l'inhibiteur SB203580 réduit significativement l'expression des gènes IL-6 et COX-2 dans les groupes PAL et PAL+ALA comparés aux conditions sans l'inhibiteur. Le SB203580 ne permet pas de diminution supplémentaire de l'expression des gènes dans les cellules supplémentées en EPA et DHA et de l'expression du gène TNF- $\alpha$  lors de la supplémentation avec l'ALA.

*L'inhibition de la p38MAPK ne permet pas une réduction de l'insulino-résistance induite par le PAL.*

La sensibilité à l'insuline des myotubes a été étudiée par l'exploration de la phosphorylation de la protéine AKT sur son site activateur Ser473 (Figure 3). Après 16 heures d'incubation, le traitement au PAL a diminué l'activation de la protéine AKT comparé à celle observée dans le groupe CTRL ( $p < 0,001$  vs. CTRL). La supplémentation en EPA ou DHA a restauré l'activation d'AKT ( $p < 0,001$  vs. PAL) tandis que l'ALA n'a pas d'effet significatif en comparaison avec le PAL seul ( $p = 0.17$  vs. PAL). Dans les myotubes incubés en présence de SB203580, aucune amélioration n'a été observée comparativement aux conditions sans SB203580.

## Discussion

Pour résumer, nous avons exploré l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et nous avons observés que l'effet anti-inflammatoire des  $\omega 3$  serait, au moins partiellement, dépendant de l'inhibition qu'ils exercent sur la p38MAPK des myotubes C2C12. Comme il a été démontré dans la littérature, la p38MAPK est activée par le LPS et le PAL, et pourrait être impliquée dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. L'activation de TLR4 après un traitement au PAL a été rapportée par Radin *et al.* dans des cellules musculaires de rats L6 (Radin *et al.* 2008). Dans des myotubes issus de patients insulino-résistants, le TLR4 a aussi été activé (Reyna *et al.* 2008), démontrant que l'inflammation induite par le PAL est au moins partiellement dépendant de l'activation du TLR4. En utilisant l'inhibiteur de la p38MAPK, il a été clairement démontré qu'un traitement au PAL pendant 16 heures à 500 $\mu$ M (Jove *et al.* 2006) ou pendant 24 heures à 200 $\mu$ M (Pillon *et al.* 2012) induisait une augmentation de la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules C2C12 et L6 respectivement, démontrant une activation de la voie NF- $\kappa$ B. Une activation concomitante de la p38MAPK a également été observée en traitant les cellules C2C12 avec 500 $\mu$ M de PAL pendant 16 heures (Jove *et al.* 2006), comme nous l'avons également démontré. La p38MAPK pourrait donc jouer un rôle important dans l'inflammation musculaire et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons émis l'hypothèse que les  $\omega 3$  ALA, EPA et DHA pourraient être bénéfique dans ce contexte. L'expression des gènes de l'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de COX-2 est augmentée par le traitement au PAL et la supplémentation en  $\omega 3$  a permis de réduire cet effet, avec toutefois un effet plus modéré de la supplémentation en ALA. Ceci pourrait être dû au fait que l'ALA n'a pas la capacité de réduire l'activation de la p38MAPK par le PAL ou qu'une concentration plus importante doit être utilisée. L'EPA et le DHA ont quant à eux inhibés l'induction de l'expression des gènes de l'inflammation et l'activation de la p38MAPK. Chez l'Homme, Brown *et al.* ont récemment démontré que la p38MAPK pouvait activer les voies de l'inflammation dans les cellules musculaires squelettiques issus de patients insulino-résistants et diabétiques (Brown *et al.* 2015).

Concernant l'IR, les traitements au PAL et PAL+ALA ont diminué la phosphorylation d'AKT alors que les supplémentations en EPA et DHA ont permis de restaurer le niveau d'activation observé dans le groupe CTRL. Pour étudier l'implication de la p38MAPK dans l'IR, nous avons évalué la phosphorylation de la protéine Akt dans les cellules exposées aux différentes combinaisons d'AG en présence de SB203580. Le profil de réponse à l'insuline a été identique à celui observé en l'absence de SB203580, indiquant que la p38MAPK ne serait

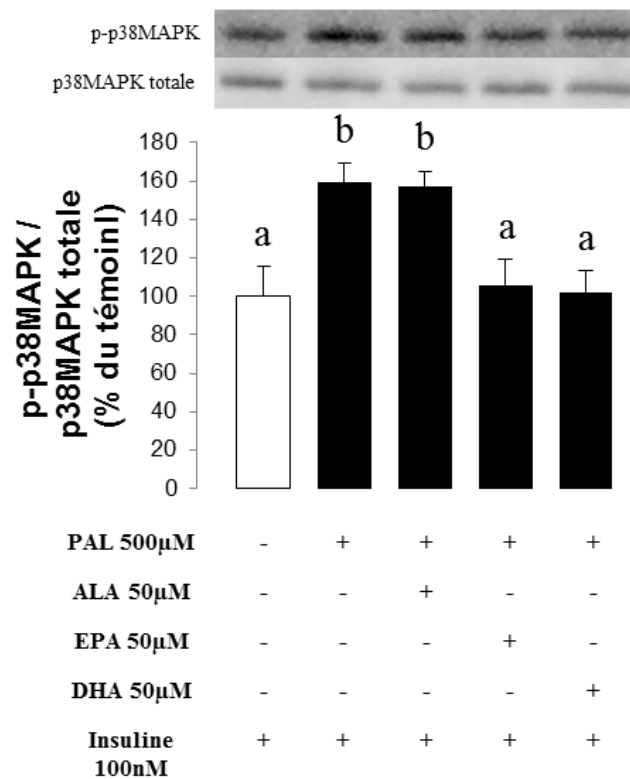
pas impliquée dans l'IR induite par le PAL. Ceci est en accord avec un article de Fujishiro *et al.* (Fujishiro *et al.* 2001) qui a démontré qu'un dominant négatif de la p38MAPK ne permettait pas de moduler l'absorption du glucose induit par l'insuline dans les cellules 3T3-L1. Kayali *et al.* ont confirmé cet effet (Kayali *et al.* 2000). En revanche, des études ont rapporté que la p38MAPK pourrait induire une baisse de la signalisation de l'insuline par inhibition de l'activation du substrat du récepteur à l'insuline (*insulin receptor substrate-1*, IRS-1) (Diamond-Stanic *et al.* 2011), ou par activation de PTEN conduisant à l'inhibition de la phosphorylation d'AKT (Shen *et al.* 2006) dans des cellules C2C12 et des cellules endothéliales humaines respectivement. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé d'activation de PTEN après stimulation à l'insuline (Figure 4). De plus amples investigations seront nécessaires pour déterminer l'implication de la p38MAPK dans l'IR.

Les expérimentations menées suggèrent que l'activation de la p38MAPK est cruciale dans le statut inflammatoire des cellules musculaires C2C12 traitées au PAL. Toutefois cette voie ne semblerait pas impliquée dans l'IR des cellules musculaires. Les  $\omega$ 3 EPA et DHA ont démontré un effet anti-inflammatoire important tandis que l'ALA semble moins efficace pour réduire l'inflammation induite par le PAL.

Ce travail apporte des éléments nouveaux sur la modulation nutritionnelle des relations entre IR et inflammation au niveau musculaire. Il nécessite encore des investigations supplémentaires afin d'envisager une soumission pour publication à un journal scientifique. Le PAL pouvant activer la voie NF- $\kappa$ B de la même manière que le LPS, nous avons initié une exploration à court terme de l'effet du PAL sur cette activation. En effet, nous n'avons pas observé d'activation à long terme de la voie NF- $\kappa$ B en mesurant la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  après 5 ou 16 heures d'incubation avec du LPS à 1 $\mu$ g/mL ou avec du PAL à 500 $\mu$ M. Toutefois, cette dégradation a bien été observée sur des temps d'incubation courts de 30 minutes avec le LPS. Nous souhaitons donc maintenant montrer que le PAL active la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  à court terme pour prouver une implication de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, le PAL ayant la capacité d'activer la p38MAPK et la voie NF- $\kappa$ B (d'après les informations de la littérature), nous avons également envisagé d'utiliser l'inhibiteur SB203580 pour observer son effet sur la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Les résultats préliminaires tendent à démontrer que le PAL active bien la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et que le SB203580 en co-incubation est bien capable d'inhiber cet effet.

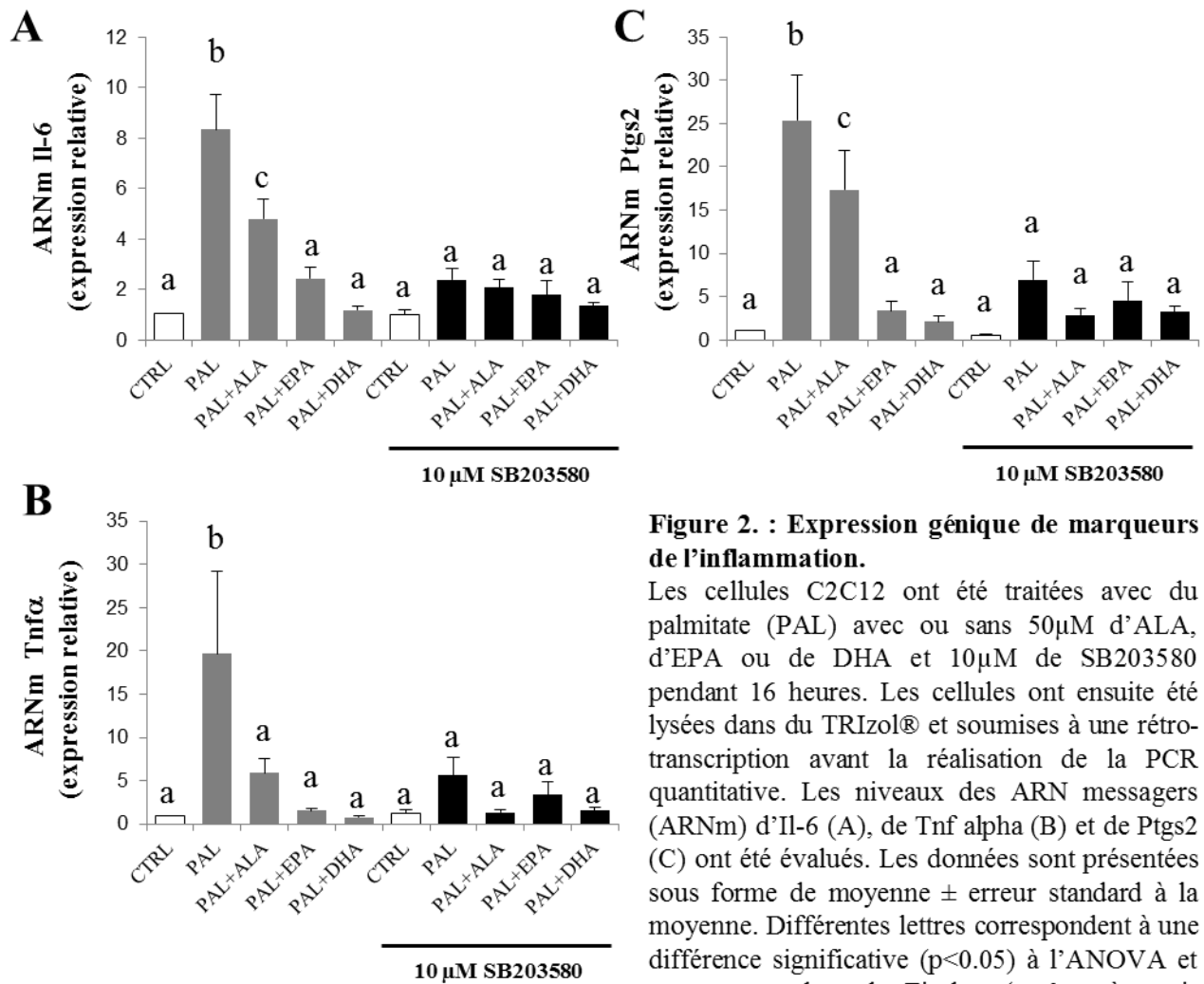
La p38MAPK possède 4 isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , mais l'isoforme  $\gamma$  serait la plus abondante dans le muscle (Cuenda and Cohen 1999). Or, l'inhibiteur que nous avons utilisé (SB203580) est seulement capable d'inhiber les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . L'inhibition de toutes les isoformes pourrait avoir un effet plus important sur la réponse inflammatoire induite par le PAL. Il existe des redondances de fonctions entre les isoformes mais certaines ont des effets spécifiques (Cuenda and Rousseau 2007). Ainsi, la p38 $\alpha$  est indispensable à la différenciation musculaire tandis que la déficience en p38 $\gamma$  n'affecte que partiellement le processus (Perdiguero *et al.* 2007). Pour aller plus loin, il serait donc intéressant d'utiliser un second inhibiteur, le BIRB0796 dans les mêmes conditions. Cet inhibiteur est capable d'inhiber les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  mais également les isoformes  $\gamma$  et  $\delta$  s'il est utilisé à des concentrations plus élevées (Kuma *et al.* 2005). *In vivo*, le KO complet du gène n'est pas possible car le KO de l'isoforme p38 $\alpha$  est létal durant la phase embryonnaire (Adams *et al.* 2000). Il existe toutefois des KO spécifiques de la p38 $\beta$ , de la p38 $\gamma$  et de la p38 $\delta$  chez la souris qui pourraient être utiles dans la caractérisation du rôle de chaque isoforme dans l'apparition de l'inflammation dans le muscle squelettique au cours de l'obésité induite par un régime HF. La p38 $\gamma$  étant la plus abondante dans les cellules musculaires, nous posons l'hypothèse que son KO serait le plus intéressant dans l'étude de la réponse inflammatoire musculaire au cours de l'obésité.

## Figures



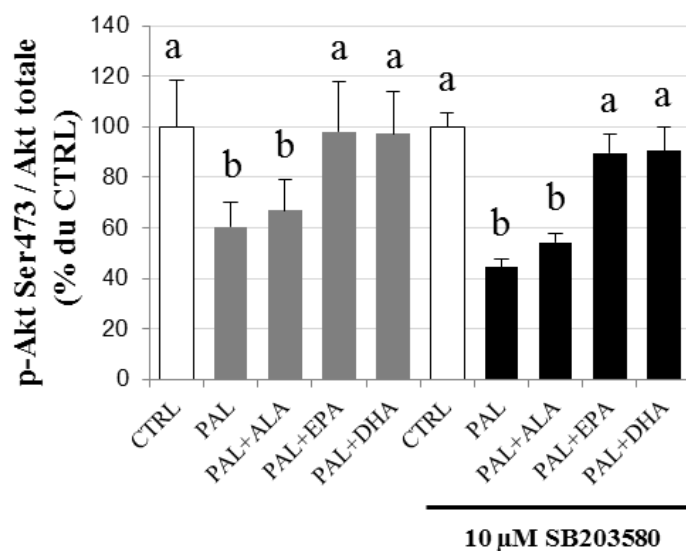
**Figure 1. : Activation de la p38MAPK.**

Les cellules C2C12 ont été traitées avec du palmitate (PAL) avec ou sans 50µM d'ALA, d'EPA ou de DHA. Elles ont ensuite été soumises à 100nM d'insuline pendant 15min et lysées en tampon de lyse supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de phosphatases. Les protéines ont été séparées et transférées sur des membranes PVDF pour détection antigénique de la phosphorylation de la p38MAPK. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne. Différentes lettres correspondent à une différence significative ( $p < 0.05$ ) à l'ANOVA et au test post-hoc de Fischer ( $n=6$  obtenus après trois expériences indépendantes). *ALA* : acide alpha linoléinique acid, *EPA* : acide éicosapentaénoïque, *DHA* : acide docosahexaénoïque, *PAL* : palmitate.



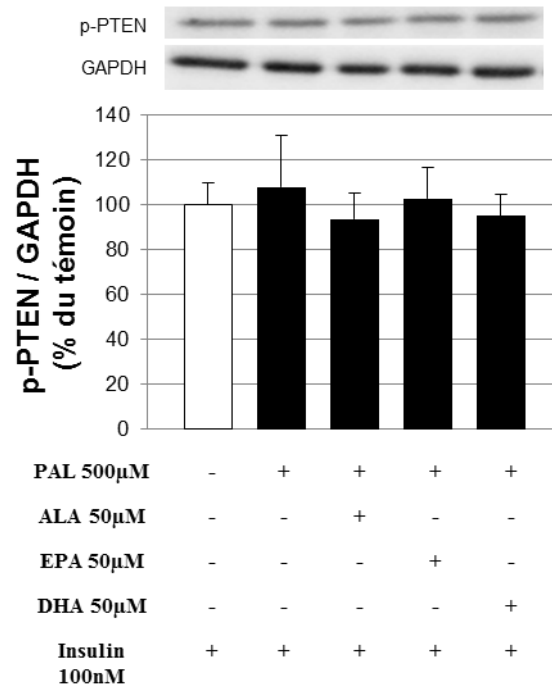
**Figure 2. : Expression génique de marqueurs de l'inflammation.**

Les cellules C2C12 ont été traitées avec du palmitate (PAL) avec ou sans 50 $\mu$ M d'ALA, d'EPA ou de DHA et 10 $\mu$ M de SB203580 pendant 16 heures. Les cellules ont ensuite été lysées dans du TRIzol® et soumises à une rétro-transcription avant la réalisation de la PCR quantitative. Les niveaux des ARN messagers (ARNm) d'Il-6 (A), de Tnf alpha (B) et de Ptg2 (C) ont été évalués. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Différentes lettres correspondent à une différence significative ( $p < 0.05$ ) à l'ANOVA et au test post-hoc de Fischer ( $n = 6$  après trois expériences indépendantes).



**Figure 3. : Effet de l'inhibition de la p38MAPK sur la signalisation de l'insuline.**

Les cellules C2C12 ont été traitées avec du palmitate (PAL) avec ou sans 50μM d'ALA, d'EPA ou de DHA et 10μM de SB203580 pendant 16 heures. Elles ont ensuite été soumises à 100nM d'insuline pendant 15min et lysées en tampon de lyse supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de phosphatases. Les protéines ont été séparées et transférées sur des membranes PVDF pour détection antigénique de la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne. Différentes lettres correspondent à une différence significative ( $p < 0.05$ ) à l'ANOVA et au test post-hoc de Fischer ( $n=6$  obtenus après trois expériences indépendantes). *ALA* : acide *alpha* linoléinique acid, *EPA* : acide éicosapentaénoïque, *DHA* : acide docosahexaénoïque, *PAL* : palmitate.



**Figure 4. : Phosphorylation de la phosphatase PTEN.**

Les cellules C2C12 ont été traitées avec du palmitate (PAL) avec ou sans 50µM d'ALA, d'EPA ou de DHA. Elles ont ensuite été soumises à 100nM d'insuline pendant 15min et lysées en tampon de lyse supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de phosphatases. Les protéines ont été séparées et transférées sur des membranes PVDF pour détection antigénique de la phosphorylation de la phosphatase PTEN. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Différentes lettres correspondent à une différence significative ( $p < 0.05$ ) à l'ANOVA et au test post-hoc de Fischer ( $n=6$  obtenus après trois expériences indépendantes). *ALA* : acide alpha linoléinique acid, *EPA* : acide éicosapentaénoïque, *DHA* : acide docosahexaénoïque, *PAL* : palmitate.



## 2. Etudes *in vivo*

### 2.1. Oméga-3, homéostasie glucidique et expansion du tissu adipeux

L'EPA PREVIENT L'INSULINO-RESISTANCE, LA TOLERANCE AU  
GLUCOSE ET L'EXPANSION DU TISSU ADIPEUX CHEZ LES SOURIS  
C57BL/6 NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE ET  
HYPERSUCRE

Article soumis au **Journal of Lipid Research**

## L'EPA PREVIENT L'INSULINO-RESISTANCE, LA TOLERANCE AU GLUCOSE ET L'EXPANSION DU TISSU ADIPEUX CHEZ LES SOURIS C57BL/6 NOURRIES AVEC UN REGIME HYPERLIPIDIQUE ET HYPERSUCRE

**Introduction :** L'obésité est un facteur majeur du développement de l'insulino-résistance (IR) et du syndrome métabolique (SM). L'IR résulte d'un dépassement des capacités du TA à stocker les lipides et d'un dépôt ectopique de lipides altérant le métabolisme des tissus insulino-sensibles que sont le muscle et le foie. Dans ce contexte, des études menées dans des conditions variées ont montré une amélioration du métabolisme du TA, du muscle et du foie lors de régimes nutritionnels enrichis en oméga-3. La dose d'oméga-3 utilisée est souvent très élevée et les mécanismes impliqués restent largement inconnus. L'objectif de ce travail a été de déterminer les effets propres de chaque oméga-3, à dose modérée, sur l'IR et les perturbations métaboliques induites par une diète hyperlipidique et hypersucrée.

**Matériels et méthodes :** Des souris C57BL/6 de type sauvage ou *ob/ob* ont été nourries avec un régime hypercalorique à 45% et 17% de l'énergie sous forme de lipides et de sucrose pendant 16 ou 6 semaines, respectivement. Le régime a été enrichi en ALA, EPA ou DHA à hauteur de 2% de l'AET. Le poids et la consommation des animaux ont été mesurés tous les 15 jours. Nous avons déterminé la composition corporelle des animaux par EchoMRI en fin de protocole. L'IR et la tolérance au glucose ont été évaluées 1 semaine avant le sacrifice par l'injection intrapéritonéale d'insuline ou de glucose et le suivi de la glycémie pendant deux heures. L'activation de la voie de l'insuline a été explorée par la mesure de la phosphorylation de la protéine AKT par western blots dans le muscle, le foie et le tissu adipeux épидidymal. Des analyses complémentaires ont uniquement pu être réalisées chez les souris C57BL/6 : la composition en acides gras des tissus a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, un bilan lipidique et hormonal a été effectué dans le plasma. Le métabolisme énergétique a été exploré par l'évaluation de la dépense énergétique, de l'activité spontanée en cages calorimétriques et la capacité d'oxydation du palmitate *ex vivo* dans le foie et le muscle. Des analyses d'expression génique ont complété ces mesures. Enfin, la cellularité du tissu adipeux a été analysée par quantification de l'ADN rapportée au poids du tissu.

**Résultats :** Les oméga-3 n'ont pas affecté le poids et l'apport énergétique des animaux sous régime hypercalorique. Nous avons validé l'élévation de leur incorporation dans les globules rouges, le plasma, les lipides neutres ou phospholipides hépatiques et musculaires, ainsi que dans les TG du tissu adipeux des souris C57BL/6. Le DHA a induit une hypertrophie du tissu adipeux. L'EPA a réduit significativement la masse adipeuse et a augmenté légèrement la dépense énergétique des souris. Sur le plan métabolique, les concentrations plasmatiques en acides gras non-estérifiés et en cholestérol total ont été significativement réduites par la supplémentation en EPA. Dans les 2 modèles de souris, l'EPA a également induit une amélioration significative de l'IR au niveau corps entier ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose. La supplémentation avec les 3 AG n'a pas permis de restaurer la concentration plasmatique en adiponectine au niveau de celle des animaux témoins. Cependant, le DHA a augmenté de manière importante la concentration en leptine et l'EPA a induit une baisse significative de la leptinémie par rapport aux autres groupes sous régime HF. Le ratio adiponectine/leptine a donc été amélioré significativement par le régime supplémenté en EPA. *In vitro*, l'étude de l'expression des gènes des cellules 3T3-L1 en cours de différenciation a confirmé l'effet différentiel de l'EPA et du DHA sur l'induction du gène de la leptine et sur l'expression des adipocytes complètement différenciés.

### **Conclusion :**

Les acides gras oméga-3 ont des effets distincts sur l'IR et le développement du tissu adipeux. Contrairement à l'ALA et au DHA, l'EPA a des effets protecteurs vis-à-vis des paramètres clés du syndrome métabolique, à savoir l'IR et les perturbations du métabolisme du tissu adipeux.

## **EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a Western Diet**

Pinel Alexandre<sup>1</sup>, Pitois Elodie<sup>1</sup>, Rigaudiere Jean-Paul<sup>1</sup>, Jouve Chrystele<sup>1</sup>, De Saint-Vincent Sarah<sup>1</sup>, Laillet Brigitte<sup>1</sup>, Montaurier Christophe<sup>1</sup>, Huertas Alain<sup>2</sup>, Morio Beatrice<sup>1,3</sup> and Capel Frederic<sup>1\*</sup>.

1: UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA, Université d'Auvergne, CRNH, Clermont-Ferrand, France.

2 : Lesieur-Groupe Avril, Asnieres-sur-seine Cedex, France

3 : INRA, UMR 1397, laboratoire carmen, université Lyon 1, INSERM U1060, INSA de Lyon, Universités Rockefeller et Charles Merieux Lyon-sud, Lyon, France

\* : Corresponding author : Frederic Capel, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA, Université d'Auvergne, CRNH, Clermont-Ferrand, France, [frederic.capel@clermont.inra.fr](mailto:frederic.capel@clermont.inra.fr), Tel : +33473608262, Fax : +33473608255

Running Title : Protective effect of EPA during a Western Diet in mice

### **Abbreviations**

ALA: Alpha Linolenic Acid; AT: Adipose Tissue; BW: Body Weight; DHA: Docosahexaenoic Acid; DNA: Deoxyribonucleic Acid; EE: Energy Expenditure; EPA: Eicosapentaenoic Acid; eWAT: epididymal White Adipose Tissue; FA: Fatty Acids; GTT: Glucose Tolerance Test; IR: Insulin Resistance ; ITT: Insulin Tolerance Test; MetS: Metabolic Syndrome; PL: Phospholipids; n-3 PUFA: n-3 Polyunsaturated Fatty Acids; RBC: Red Blood Cells; RNA: Ribonucleic Acid; RT-qPCR: Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction; WT: Wild Type.

## **Abstract**

Impact of ALA, EPA and DHA on obesity and metabolic complications were studied in mice fed a high-fat high-sucrose diet (HF). HF diets were supplemented with ALA, EPA or DHA (1% w/w) and given to C57BL/6J mice for 16 weeks and to Ob/Ob mice for 6 weeks. In C57BL/6J mice, EPA reduced plasma cholesterol (-20%), limited fat mass accumulation (-23%), adipose cell hypertrophy (-50%), and reduced plasma leptin concentration (-60%), compared to HF fed mice. Furthermore, mice supplemented with EPA exhibited a higher insulin sensitivity (+24%) and glucose tolerance (+20%) compared to HF fed mice. Similar effects were observed in EPA supplemented Ob/Ob mice, although fat mass accumulation was not prevented. By contrast, DHA induced visceral adipose tissue hyperplasia and hypertrophy in C57BL/6J mice compared to those which received EPA, and did not improve glucose homeostasis in comparison to HF fed mice in C57BL/6J and Ob/Ob mice. In 3T3-L1 adipocytes, DHA stimulated leptin expression whereas EPA induced adiponectin expression, suggesting that adiponectin could contribute to the protective effect of EPA. In conclusion, supplementation with EPA, but not ALA and DHA, could preserve glucose homeostasis in an obesogenic environment and limit fat mass accumulation in the early stage of weight gain.

**Keywords:** Omega 3 PUFA; Insulin resistance, Obesity; Adipose tissue

## **EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a Western Diet**

Pinel Alexandre<sup>1</sup>, Pitois Elodie<sup>1</sup>, Rigaudiere Jean-Paul<sup>1</sup>, Jouve Chrystele<sup>1</sup>, De Saint-Vincent Sarah<sup>1</sup>, Laillet Brigitte<sup>1</sup>, Montaurier Christophe<sup>1</sup>, Huertas Alain<sup>2</sup>, Morio Beatrice<sup>1,3</sup> and Capel Frederic<sup>1\*</sup>.

1: UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA, Université d'Auvergne, CRNH, Clermont-Ferrand, France.

2 : Lesieur-Groupe Avril, Asnieres-sur-seine Cedex, France

3 : INRA, UMR 1397, laboratoire carmen, université Lyon 1, INSERM U1060, INSA de Lyon, Universités Rockefeller et Charles Merieux Lyon-sud, Lyon, France

\* : Corresponding author : Frederic Capel, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA, Université d'Auvergne, CRNH, Clermont-Ferrand, France, [frederic.capel@clermont.inra.fr](mailto:frederic.capel@clermont.inra.fr), Tel : +33473608262, Fax : +33473608255

Running Title : Protective effect of EPA during a Western Diet in mice

### **Abbreviations**

ALA: Alpha Linolenic Acid; AT: Adipose Tissue; BW: Body Weight; DHA: Docosahexaenoic Acid; DNA: Deoxyribonucleic Acid; EE: Energy Expenditure; EPA: Eicosapentaenoic Acid; eWAT: epididymal White Adipose Tissue; FA: Fatty Acids; GTT: Glucose Tolerance Test; IR: Insulin Resistance ; ITT: Insulin Tolerance Test; MetS: Metabolic Syndrome; PL: Phospholipids; n-3 PUFA: n-3 Polyunsaturated Fatty Acids; RBC: Red Blood Cells; RNA: Ribonucleic Acid; RT-qPCR: Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction; WT: Wild Type.

## **Abstract**

Impact of ALA, EPA and DHA on obesity and metabolic complications were studied in mice fed a high-fat high-sucrose diet (HF). HF diets were supplemented with ALA, EPA or DHA (1%w/w) and given to C57BL/6J mice for 16 weeks and to Ob/Ob mice for 6 weeks. In C57BL/6J mice, EPA reduced plasma cholesterol (-20%), limited fat mass accumulation (-23%), adipose cell hypertrophy (-50%), and reduced plasma leptin concentration (-60%), compared to HF fed mice. Furthermore, mice supplemented with EPA exhibited a higher insulin sensitivity (+24%) and glucose tolerance (+20%) compared to HF fed mice. Similar effects were observed in EPA supplemented Ob/Ob mice, although fat mass accumulation was not prevented. By contrast, DHA induced visceral adipose tissue hyperplasia and hypertrophy in C57BL/6J mice compared to those which received EPA, and did not improve glucose homeostasis in comparison to HF fed mice in C57BL/6J and Ob/Ob mice. In 3T3-L1 adipocytes, DHA stimulated leptin expression whereas EPA induced adiponectin expression, suggesting that adiponectin could contribute to the protective effect of EPA. In conclusion, supplementation with EPA, but not ALA and DHA, could preserve glucose homeostasis in an obesogenic environment and limit fat mass accumulation in the early stage of weight gain.

**Keywords:** Omega 3 PUFA; Insulin resistance, Obesity; Adipose tissue

## Introduction

Obesity is a complex disorder involving an excessive amount of body fat. It has several health consequences which are frequently linked to metabolic syndrome (MetS). MetS is defined as a cluster of several risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular diseases (1, 2) and its development is related to the progression of insulin resistance (IR) and the accumulation of fat mass, notably in the visceral area (2). The alteration in the cross-talk between key metabolic tissues, such as the liver, adipose tissue (AT), skeletal muscle and intrinsic dysfunctions in these organs represent probably a key step in the progression of MetS (3, 4). The impairment of lipid storage capacity in subcutaneous AT has been related to alteration in the endocrine function of the tissue, to an increased free fatty acid release in the circulation, to visceral fat accumulation (5), and to deposition of ectopic fat in other organs contributing to IR (6). Lifestyle changes are recommended for the prevention and the management of MetS. Several reports from the literature have suggested that metabolic abnormalities and alterations of AT biology could be prevented by increasing the intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) (7). N-3 PUFA, especially those of marine origin *i.e.* eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) were identified as potent positive regulator of insulin sensitivity *in vitro* (Pinel BBA minor revision 2015) and in animal models (8). However, epidemiological studies aiming at determining the beneficial effects of those n-3 PUFA and their common precursor linolenic acid (C18:3n-3, ALA), led to inconclusive results (9). This may be mainly due to the fact that different experimental protocols were used. Furthermore, most of the interventional studies in humans or animal models examined the impact of a mixture of EPA and DHA on IR (10, 11) and the impact of ALA has been poorly investigated. Finally, the specific roles of each n-3 PUFA on IR during obesity still remain poorly known. One study examined the impact of EPA, ALA or DHA enriched oils in rats fed with a high fat-high carbohydrate diet for 8 weeks (12). This study suggested that EPA and DHA, but not ALA, could partially protect animals from whole body IR and limit abdominal adiposity, but without any exploration in adipose tissue. Therefore the present study aimed at analyzing the specific effects of supplementing the diet with pure ALA, EPA or DHA preparations on adipose tissue biology, whole body and tissue IR in a murine model of diet-induced obesity.

## **Materials and methods**

### *Chemicals.*

Diets: Diet preparations were purchased as powder form from Brogaarden (Denmark). Free FA were used for dietary supplementation, ALA, DHA were purchased from Nu-Chek-Prep, Inc. (Mn, USA), EPA and a mixture of Oleic acid, Palmitic acid, stearic acid and linoleic acid (50/25/15/10) were purchased from Larodan (Malmö, Sweden). Primary antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Leiden, Netherlands) and Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Secondary antibodies were from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA), enhance chemiluminescence (ECL) and Pierce™ BCA protein assay kit were purchased from THERMO SCIENTIFIC (Villebon sur Yvette, France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Calf and fetal Bovine serum, free bovine serum albumin (FA-free BSA) phosphate buffered saline (PBS) and penicillin/streptomycin mix were from PAA (Velizy-Villacoublay, France). ). For cell culture experiments, ALA, EPA and DHA, cat. number 90210, 90110 and 90310 respectively) were from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). The [1-<sup>14</sup>C] palmitate (cat. number NEC075H001MC) was from PERKIN ELMER (Courtaboeuf, France). When not specified, chemicals were from Sigma Aldrich.

### *Animals.*

Five week-old wild-type (WT) male C57BL/6J mice and Ob/Ob male mice were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). WT and Ob/Ob mice were housed 4/5 and 1 per cage respectively, in a room maintained at 22-24°C with an alternating 12-hour light/dark cycle with free access to food and water. Mice were weighed and food consumption was measured every two weeks. Body composition of WT mice was measured during the 16<sup>th</sup> week of dietary experiment and during the 6<sup>th</sup> week for Ob/Ob mice, using EchoMRI™ (EchoMRI®, Houston, TX, USA). All protocols followed Animal Care guidelines of the European Union and were approved by the local research ethics committee (CEMEAA, CE91-12 and 00845.02).



### ***Diets.***

After one week acclimation, 5 groups of WT mice and Ob/Ob mice of similar body weight (BW) were randomly constituted. Animals were then assigned to receive 5 diets as follow: (1) CTRL: Low fat diet (Research Diet D12450H), (2) HF: High-fat and high sucrose diet (Research diet D12451, providing 45 kcal% and 17 kcal% from fat and sucrose respectively) supplemented with 1% w/w of a FA mixture of the 4 main FA in plasma triglycerides (oleic acid, palmitic acid, stearic acid, and linoleic acid; 50/25/15/10 % respectively), (3) HF-A: High-fat and high sucrose diet supplemented with 1% w/w ALA, (4) HF-E: High-fat and high sucrose diet supplemented with 1% w/w EPA, (5) HF-D: High-fat and high sucrose diet supplemented with 1% w/w DHA. Each FA and FA mix were dissolved in a minimal volume of high oleic sunflower oil before incorporation in diet powder. Diets were stored at -20°C and provided fresh every 2 days for 16 weeks (WT mice) or 6 weeks (Ob/Ob mice). Food intake per cage was evaluated every 2 weeks, averaged and expressed as g/mouse/day or kJ/mouse/day.

### ***Indirect calorimetry***

Dioxygen consumption (VO<sub>2</sub>), carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>) and activity of mice were measured during 24 hours using a four-cage TSE System Pheno-Master/LabMaster (Bad Homburg, Germany). Energy expenditure was calculated using Weir's equation (13). The RQ was calculated as the ratio of VCO<sub>2</sub> to VO<sub>2</sub>. Spontaneous activity was measured using a three dimensions meshing of light beams. Ambient temperature was maintained at 22°C and the light was on from 08am to 08pm and mice had free access to food and water. Data were collected after 24 hours of acclimation and the O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> analysers were calibrated before each measurement period.

### ***Intraperitoneal insulin and glucose tolerance tests.***

Insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT) were performed on 10 WT mice per group during the 16<sup>th</sup> week of diet. All Ob/Ob mice were submitted to ITT and GTT, with a 3-day

recovery between them. After 6 hours of fasting, animals received an intraperitoneal injection of insulin (1.2mUI/g) or glucose (2mg/g for WT and 1.5mg/g for Ob/Ob mice) and blood samples were collected from the tail vein 0, 15, 30, 45, 60 and 120 minutes later. Blood glucose levels were determined using a commercial glucometer (One Touch®Vita®, Issy les Moulineaux, France) for the calculation of the Area Under the Curve (AUC).

### ***Sacrifice and sampling.***

Sixteen-hour fasted mice were anesthetized by intraperitoneal administration of ketamine:xylazine mix (20mg/kg:4mg/kg). To explore insulin sensitivity, 8 WT mice per group and all Ob/Ob mice were subjected to insulin injection (1,2mUI/g) 30min before anaesthesia. Cardiac puncture was performed to collect blood samples and cervical dislocation was then done to sacrifice mice. Blood was sampled in EDTA-coated tubes to avoid coagulation and were processed for plasma collection. Red blood cells (RBC) were separately collected from WT mice for FA composition analyses. Blood samples, heart, epididymal white adipose tissue (eWAT), gastrocnemius and quadriceps were removed, weighted and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses.

### ***Lipid profiles.***

Lipid extracts from RBC or other tissues were prepared using 4mL chloroform:methanol (2:1, vol: vol, Sigma Aldrich) and 1mL 0,9%NaCl. Extracts were centrifuge to separate lipid phase to aqueous phase. Methylation was then performed before FA methyl ester separation by gas chromatography (GC) as previously described (14).

### ***Quantification of protein content by Western-Blot.***

One hundred to 150mg of gastrocnemius, liver or eWAT were ground three times in a mini bead beater in presence of 0.7mL lysis buffer (50mM HEPES, 150mM sodium chloride, 10mM EDTA, 10mM sodium pyrophosphate tetrabasic anhydrous, 25mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100mM sodium

fluoride, 10% glycerol anhydrous) supplemented with phosphatase inhibitors cocktail (Sigma Aldrich) respecting 2 minutes timeout between each session. Successive centrifugations were done to collect supernatant. Protein quantification was performed using a BCA protein assay kit (Pierce). Bovine serum albumin (BSA) standard curve and sample preparation and analysis were realised according to manufacturer's instructions. For protein immunoblotting, 20 micrograms of proteins loaded for separation by SDS-PAGE electrophoresis. Proteins were transferred on PVDF membranes. These membranes were then immunoblotted with the appropriate antibody to detect glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), serine 473 phosphorylated AKT, total AKT. Antibody binding was detected using HRP-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). Immunoblots were visualized by chemiluminescence imaging system (MF ChemiBIS 2020, DNR bio imaging systems, Jerusalem, Israel) and quantified using MultiGauge V3.2 software.

#### ***Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA).***

ELISA on plasma samples were performed according to manufacturer's instructions (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Leptin, insulin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), resistin and hormones of appetite (ghrelin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), gastric inhibitory polypeptide (GIP), glucagon) were quantified using the luminex® technology (Bioplex® 200, BioRad). Adiponectin was quantified using an ELISA assay (Eurobio, Courtaboeuf, France).

#### ***Glucose level and lipid profile in plasma.***

Plasma levels of glucose, non-esterified fatty acids, glycerol, triglyceride and total cholesterol were measured using Konelab™ 20 analyzer (Thermo Electron SA, Cergy-Pontoise, France), according to manufacturer's instruction of each assay.

### ***Gene expression.***

For tissue or cell culture gene expression assays, RNA extraction was performed using TRIzol® (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Chloroform was added (0,2mL/mL of TRIzol®) and samples were mixed and centrifuged 15min at 12000g and 4°C. Aqueous phase containing ribonucleic acid (RNA) was collected, mixed with isopropanol to precipitate RNA and centrifuged (12000g, 4°C, 15min). After centrifugation, the pellet was washed with ethanol 70% (vol/vol), dried and suspended in water. RNA quantification and integrity were verified by measuring the ratio of optical density at 260nm and 280nm and by agarose gel migration, respectively. Two micrograms of total RNA was used to realise reverse transcription. The products of reverse transcription were used for Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to evaluate gene expression. Taqman Low density array were used for liver and skeletal muscle samples using 384 well format plates on a 7900HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). AT gene expression was performed using specific primers (sequences available on request) and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Courtaboeuf, France). Messenger RNA (mRNA) quantification was assayed using the ddCT method (Liver and Skeletal muscle) or the standard curve of native cDNA and serial dilutions when the SYBR Green technology was used (AT). Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (hppt) or Non-POU-domain containing octamer binding protein (NoNo), gene were used as housekeeping gene in the liver/skeletal muscle and AT respectively.

### ***DNA extraction and cellularity.***

DNA were extracted using TRIzol® after separation of aqueous phase containing RNA and organic phase. Five hundred microliters of back extraction buffer (guanidine thiocyanate 4M, sodium citrate 50 mM and Tris base 1M) were added to the organic phase before centrifugation at 16000g for 30min. Superior phase was then used for DNA precipitation by addition 400µL of isopropanol (Sigma Aldrich) and centrifugation at 16000g for 15min. DNA pellet was then washed twice with ethanol 75% (vol/vol) and dissolved in DNA RNA-free water. DNA content was quantified by measuring the

ratio of optical density at 260nm and 280nm. Ratio between total DNA content and tissue sample weight was used to calculate cellularity, as DNA content is proportional to the number of cells.

### ***Adipocyte cell culture***

3T3-L1 cells were purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France) and used grown in DMEM supplemented with 10% calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin in 5% CO<sub>2</sub>/humidified atmosphere at 37°C. Differentiation to adipocytes was induced 2 days post confluency (day 0) by incubating the cells in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, 0.5 mM IBMX, 1µM dexamethasone and 10 µg/ml insulin for 48 h. Cells were maintained in the same medium without IBMX and dexamethasone for additional 48h. Insulin was removed and cells were maintained until day 8 (medium was replaced at day 6). FA were added to cell culture medium at 50µM from day 0 to 8. Stock solutions of FA were prepared in ethanol and further diluted at 1:1000 in DMEM containing 2% of FA-free BSA. Control cells were also exposed to 0.1% of ethanol. Cells were harvested every 2 days from day 0 (undifferentiated-untreated and confluent cells) up to day 8. Before RNA isolation and purification, cells were washed in ice cold PBS and harvested by scrapping in TRIzol®.

### ***Statistical analysis.***

All data are presented as mean ± standard error about the mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare each treatment. If significant (p value < 0.05), one-way ANOVA was followed by Fischer's Least Significant Difference post hoc test with the Benjamini–Hochberg multiple testing correction. All statistical analyses were performed using R (Bioconductor). In some cases, a student t test was performed.

## Results

### *EPA reduces fat mass accumulation in C57BL/6J mice after a high fat high sucrose challenge*

Food intake was similar in the four groups receiving a HF diet, i.e. HF, HF-A, HF-E and HF-D during the first 8 weeks of the intervention. Thereafter, mice consuming the HF-D diet ate significantly less food (expressed in g/day) during the last weeks of the dietary intervention, from week 8 to 14 (Figure 1), compared to all other groups. Unsurprisingly and because of a lower caloric density of the diet, mice fed with the control diet ate more food than mice receiving the 4 HF diets without or with n-3 PUFA. When food consumption was expressed in energy units, daily energy intake was not statistically different between groups (ANOVA,  $p = ns$  from week 1 to 14, Figure 1). However, energy intake tended to be lower in mice consuming the HF-D diet compared to HF-A or HF-E diets at week 10 (ANOVA,  $p < 0.1$ ; post hoc analysis showed a significant difference between HF-D vs. LF, HF-A and HF-E groups at  $p < 0.05$ ).

At the end of the dietary intervention, animals fed with the HF diet gained significantly more weight than control mice. Final BW of HF, HF-A, HF-E and HF-D mice was not statistically different. Body composition analysis using EchoMRI showed that supplementation with EPA significantly limited fat mass accumulation compared to HF and HF-D diets, whereas fat mass accumulation was not significantly different between HF-E and HF-A animals (Table 1). Lean body mass was higher in HF-E mice compared to the other HF groups and was similar to control group (Table 1). By contrast, lean body mass was significantly lower in the HF, HF-A and HF-D groups compared to controls (Table 1).

As expected, respiratory quotient of HF, HF-A, HF-E and HF-D mice was lower than in LF group ( $p < 0.05$ , Table 1). Energy Expenditure adjusted for differences in BW (BW-EE) was lower in HF-D mice compared to control and HF-E mice ( $p < 0.05$  and  $p = 0.06$  respectively, Table 1). BW-EE in HF and HF-A mice was lower, but not significantly different compared to control mice ( $p = 0.17$ ). In agreement with these observations, the locomotor activity of HF-E mice was higher compared to HF-D and HF-A animals ( $p < 0.05$ , student t test).

***Effect of the dietary interventions on the fatty acid profile of erythrocyte phospholipids from C57BL/6J mice***

The FA composition of erythrocyte phospholipids (PL) was used to validate n-3 PUFA dietary supplementations. Consumption of the HF-A, HF-E and HF-D diets induced a significant enrichment of the corresponding FA in erythrocyte PL (Table 2) compared to the HF diet. Mice consuming the HF-E diet presented the highest percentage of n-3 PUFA incorporated into erythrocyte PL ( $p < 0.05$  vs. the other groups), notably due a high accumulation of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3). Supplementation with ALA and EPA similarly increased the percentage of DHA incorporation. As a consequence, the proportion of C18, C22, C20:4 n-6, C22:4 n-6 and C22:5 n-6 FA in erythrocyte PL was reduced in mice fed the HF-E and HF-D diets compared to both HF and control diets. Only EPA supplementation significantly decreased n-6 PUFA content compared to the HF diet ( $p < 0.05$ , Table 2). The n-6 to n-3 ratio was improved in the two diets HF-E and HF-D (-72 and 63% respectively,  $p < 0.05$ ) and, to a lesser extent in the HF-A diet -35%,  $p < 0.05$ ) compared to HF diet (Table 2). A significant increase in EPA percentage in HF-D mice was detected compared to HF mice in erythrocyte PL. FA profiling in skeletal muscle and liver PL extracts showed very similar effects with some exceptions, regarding n-6 to n-3 ratio and DHA retroconversion which were respectively lower and inexistent in skeletal muscle compared to the liver (Supplementary Tables 1 & 2). The percentage of DHA in muscle PL was high in control and HF mice. The DHA percentage was further increased by EPA and DHA supplementations. Then, the total amount of n-3 PUFA in muscle PL was strongly increased (+56% and +86% respectively) following EPA and DHA supplementation compared to mice receiving the HF diet alone leading to a marked change in the relative content of n-3 and n-6 PUFA in muscle PL liver (Supplementary Tables 1).

***EPA improved fasting metabolic parameters in C57BL/6J mice***

Plasma cholesterol was significantly lower in HF-E and HF-D mice compared to HF animals. By contrast, HF-A and HF-D feeding induced significantly higher plasma non esterified FA

concentrations compared to HF-E (Table 3). Fasting plasma insulin was similar between groups. Yet, fasting plasma insulin tended to be lower in HF-E mice compared to HF group ( $p < 0.1$ , Table 3). In direct line with the observed changes in fat mass accumulation, plasma leptin was greater in HF-D mice compared to all other groups. Although HF and HF-A mice exhibited a significant accumulation of fat mass (Table 1), these animals had similar plasma leptin compared to control mice. EPA supplementation reduced plasma leptin level compared to the other HF groups ( $P < 0.05$ , Table 3). By contrast, plasma adiponectin was similar between the four HF groups and lower compared to controls ( $p < 0.05$ , Table 3). Thus the adiponectin to leptin ratio was significantly higher following EPA supplementation compared to other HF groups.

#### ***Effect of the dietary intervention on glucose tolerance and insulin resistance in C57BL/6J mice***

Glucose tolerance was significantly lower in mice fed the HF and HF-A diets compared to those fed the control diet (Figure 2A, 2B). By contrast, glucose homeostasis was significantly improved in mice receiving the HF-E diet compared to the HF and HF-A diets, notably due to a lower increase in glycaemia in the first 30 minutes of the glucose tolerance test (Figure 2A). Glucose tolerance of HF-E mice was similar to controls. DHA only slightly improved glucose tolerance by decreasing the glycemia two hours post-glucose injection to control and HF-E values.

Insulin sensitivity was similar between HF-E mice and controls, and significantly higher compared to the other HF groups (Figure 2C, 2D). Insulin sensitivity was further investigated by quantifying Akt protein phosphorylation in AT, skeletal muscle and liver. Akt phosphorylation was not affected by the different diets in skeletal muscle and AT (*data not shown*). In the liver, the result of the ANOVA did not reach the significance level ( $p=0.18$ ) probably because we administered a physiological dose of insulin (1.2mUI/g). However interestingly, we observed a lower Akt protein phosphorylation in HF-D animals compared to controls ( $p < 0.05$ ) and a tendency in HF animals compared to controls ( $P=0.06$ , Figure 3). Expression analyses of genes related to glucose homeostasis were performed in the liver and skeletal muscle of C57BL/6J mice (Supplementary Table 3A, B). G6pc mRNA level was decreased in the liver of HF-D, HF-A and HF-E mice ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$  and  $p = 0.13$  vs. HF respectively,



supplementary Table 3A). *Pck1* mRNA level was increased in HF and HF-E mice compared to control ( $p < 0.05$ ). Hepatic *Pdk4* mRNA levels was decreased in all HF groups compared to control mice ( $p < 0.05$ , supplementary Table 3A). In skeletal muscle, *Pck1* mRNA were decreased in HF-A, HF-E and HF-D mice. Glycerol kinase (*Gyk*) mRNA level was elevated in skeletal muscle of HF and HF-D mice compared to controls ( $p < 0.05$ , Supplementary Table 3B). *Pdk4* expression remained unchanged in skeletal muscle (Supplementary Table 3B). We also evaluated gene expression level of *Trb3*, a protein involved in insulin response. *Trb3* mRNA level was significantly higher in skeletal muscle from HF mice compared to controls and other HF groups (Figure 4,  $p < 0.05$ ), but unchanged in the liver (Figure 4).

### ***Effect of the dietary intervention on adipose tissue metabolism***

In epididymal white adipose tissue (eWAT), significant accumulation of ALA, EPA and DHA was observed following the consumption of HF-A, HF-E and HF-D diets respectively (Supplementary Table 4). The n-6 to n-3 ratio in eWAT was elevated in mice consuming the HF diet compared to control diet ( $32.7 \pm 2.3$  vs.  $18.3 \pm 0.6$  in HF and control group respectively,  $p < 0.05$ ). Supplementation with n-3 PUFA significantly reduced this ratio in HF-A, HF-D and HF-E mice compared to HF mice ( $10.1 \pm 0.5$ ,  $14.0 \pm 0.9$  and  $17.3 \pm 0.6$  vs.  $32.71 \pm 0.6$  respectively, all significant at  $p < 0.05$ ). The percentage of ALA in adipose tissue following supplementation with this FA was higher compared to the observation in hepatic or skeletal muscle PL. The presence of DPA was detectable in HF-A, HF-E and HF-D mice and was significantly higher in HF-E group compared to the two others (+ 200%,  $p < 0.05$ , Supplementary Table 4). DNA content per mg of eWAT of HF-E mice was similar to controls and significantly higher compared to other HF animals, notably from HF and HF-D groups (Figure 5A), suggesting that adipose cell size was lower in HF-E mice compared to other HF mice. On the contrary, DNA content per mg of eWAT of animals receiving the HF-D diet was the lowest of the HF groups (Figure 5A), and DNA total amount was higher (Figure 5B), suggesting adipose cell hyperplasia and hypertrophy in HF-D mice. Transcriptomic analyses performed on eWAT to explore the modulation of AT inflammation did not show significant differences in *Il6*, *mcp1*, *leptin* and *adiponectin* gene expression between the five conditions. By contrast, significant differences were

observed in gene expression of main lipolytic enzymes. Indeed eWAT *Lipec* mRNA level was significantly increased in HF-A and HF-E mice compared to HF mice (Figure 6,  $p < 0.05$ ). *Atgl* expression was also higher in HF-A and HF-E mice compared to both control and HF-D mice (Figure 6,  $p < 0.05$ ). Furthermore, *Ucp3* mRNA level was significantly higher in HF-E mice compared to control, HF and HF-A groups. Finally, a lower *Ppar gamma* mRNA level was also observed in eWAT of HF-E mice compared to HF animals ( $p < 0.05$ , Figure 6).

#### ***DHA hastened the induction of leptin expression during 3T3-L1 differentiation into adipocytes***

To better characterize the effect of n-3 PUFA on AT development and its secretory function, 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes in the presence of 50 $\mu$ M of ALA or EPA or DHA from day 0 to day 8 to explore the kinetic of adipokine expression. Leptin and adiponectin expression kinetics were analyzed every two days throughout the differentiation process. mRNA levels of *leptin* and *adiponectin* were compared to Day 0 and between treatments at days 2, 4, 6 and 8 (Figure 7). In control cells, adiponectin and leptin expression profiles during adipogenesis were similar. In these cells, 8 days of differentiation were necessary to detect a significant increase of leptin gene expression compared to day 0. Adipocytes exposed to EPA responded similarly to control since the leptin mRNA level differed from baseline only at day 8 (Figure 7A). DHA treatment, but not ALA and EPA, increased leptin expression above control values on day 2, 6 and 8 ( $p < 0.05$ , Figure 7A). In control cells, adiponectin was significantly expressed from day 4 and remained elevated throughout the differentiation process ( $p < 0.05$  vs. D0, Figure 7B). Cells exposed to EPA significantly expressed adiponectin mRNA at day 6 (Figure 7B) and exhibited a higher adiponectin gene expression compared to cells exposed to ALA or DHA at this differentiation stage ( $p < 0.05$ , Figure 7B). By contrast, treatment with ALA and DHA significantly reduced the effect of the differentiation process on adiponectin mRNA levels which was significantly lower than in control cells on day 8 (Figure 7B).

#### ***Prevention of glucose intolerance by EPA during severe obesity***

After the identification of the differential effect of n-3 PUFA on metabolic disturbances during the dynamic phase of the development of obesity in C57BL/6J mice, we examined whether these effects

were similar in Ob/Ob mice. These mice are hyperphagic because of the lack of leptin secretion and develop obesity and metabolic disorders more rapidly than C57BL/6J mice. As expected after 5 weeks under each experimental diets (control, HF, HF-A, HF-E and HF-D), BW and fat mass percentage were significantly higher in Ob/Ob mice fed with the HF, HF-A, HF-E and HF-D diets compared to Ob/Ob mice fed with the control diet (Table 4). Ob/Ob mice fed with the control diet ate 17% more calories than C57BL/6J WT mice fed the same diet ( $58.5 \pm 1.9$  vs.  $47.8 \pm 1.0$  j/day evaluated 2 weeks before sacrifice respectively,  $p < 0.05$ ) leading to a higher fat mass gain (Table 4) compared to C57BL/6J (Table 1). When consuming the HF diet, Ob/Ob mice ate more calories than animals fed with the control diet (Table 4) and gained significantly more weight, but body composition (in %BW) was not modified (Table 4). Supplementation with ALA, EPA or DHA did not affect food intake expressed in g or Joule per day (Table 4) compared to the HF diet. No differences in BW, fat mass and lean mass were detectable between the four HF groups. Despite this, HF-E diet significantly improved IR and glucose tolerance compared to other HF groups ( $p < 0.05$ , Figure 8) but were still significantly lower compared to control group ( $p < 0.05$ , Figure 8). On the contrary, supplementation of the HF diet with ALA and DHA did not prevent the decrease in glucose tolerance or insulin sensitivity induced by the HF diet (Figure 8). As described for C57BL/6J mice; peripheral insulin sensitivity was evaluated in the liver, skeletal muscle, and eWAT after administration of a physiological dose of insulin. Akt protein phosphorylation following insulin injection was higher in the liver from HF-E fed animals compared to control, HF and HF-D groups (Figure 9A). In skeletal muscle, consumption of the HF diet tended to increase Akt phosphorylation compared to the control diet (Figure 9B). Supplementation with ALA, EPA and DHA further increased Akt phosphorylation, leading to a significant improvement compared to controls in this tissue. Measurement of insulin-dependent Akt phosphorylation in the AT showed a decrease in all groups of Ob/Ob mice fed the HF diets compared to the control group (Figure 9C). Finally, adiponectin gene expression was determined in eWAT from these mice, its mRNA content was significantly higher in eWAT of mice supplemented with EPA compared to HF mice ( $p < 0.05$ , Figure 10). It was intermediary in the eWAT of mice supplemented with DHA compared to HF mice ( $p = 0.09$  vs. HF, Figure 10).

## Discussion

The roles of dietary n-3 PUFA against MetS and cardiovascular diseases were investigated in numerous studies, leading frequently to controversial results (7, 10). Furthermore, the specific effects of the 3 most important n-3 PUFA retrieved in food products (ALA, EPA and DHA) remain partially characterized. We compared here the effect of these FA, given at a nutritional dose (1% w/w of the diet) in the prevention of metabolic syndrome and AT expansion in C57BL/6J mice fed with a high fat and high sucrose diet. The composition of the experimental diet (236 and 200 g/kg of fat and sucrose respectively) mimics a typical western diet which is rich in sugars and fat. C57BL/6J mice are frequently used as a relevant model for the study of metabolic disorders (15). These mice could develop obesity and insulin resistance within 16-20 weeks under a high-fat high-sucrose diet, but cautions should be taken regarding housing to limit the interindividual variability in terms of BW gain (16, 17). Each n-3 PUFA-supplemented diet allowed a significant incorporation of the corresponding FA in different tissues. ALA, EPA and DHA relative amounts were increased in erythrocyte, liver and muscle phospholipids following the HF-A, HF-E and HF-D diets respectively. The total amount of n-3 PUFA incorporated into erythrocyte phospholipids was higher in mice receiving the EPA and DHA compared to ALA. These observations confirm the good incorporation of n-3 PUFA as observed in rat tissues after the consumption of n-3 PUFA-enriched oils (12). The percentage of ALA and EPA in the different tissues were very similar in control and HF mice, but their respective increases following dietary supplementation were clearly better for EPA. ALA storage probably preferentially occurred in neutral lipids since absolute percentages of ALA were higher in adipose tissue and also in hepatic neutral lipids (Supplementary Table 5) compared to PL fractions. In neutral lipids, we also detected significant percentages of EPA, DPA and DHA in adipose tissue and the liver, suggesting that longer chain n-3 PUFA could also be stored in neutral lipids from these tissues. Nutritional supplementation with ALA was not sufficient to induce long chain n-3 PUFA accumulation, probably because of its high rate of beta-oxidation (18) or a reduced ability for elongation and desaturation (19). As expected, we observed that EPA supplementation led to a significant accumulation of DPA in different tissue's PL. It confirms that the final conversion of DPA into DHA is rate limiting (19) but suggests that DPA

may participate to the beneficial effects of EPA supplementation on fat mass and glucose homeostasis. Supporting this and despite an increased EPA content in different tissues from mice receiving DHA due to the retroconversion of DHA into EPA, mice receiving DHA did not exhibited the same phenotype than HF-E mice.

We demonstrated that adding 1% of EPA in the diet could prevent AT expansion, glucose intolerance and IR, and reduce plasma total cholesterol concentration. Mice receiving EPA exhibited also increased energy expenditure. On the contrary mice fed with a western diet enriched with DHA had a decreased locomotor activity which may be the consequence of the increase in body fat mass. Furthermore, in mice receiving EPA, the increase in AT DNA concentration compared to HF fed mice indicated a lower adipose cell size. On the contrary, our data support that DHA induced fat cell hypertrophy and hyperplasia. Beneficial effects of fish oil supplementation against AT expansion or metabolic disturbances were previously identified under various experimental conditions. Hence, very high dose of DHA and EPA (15 to 40% of n-3 PUFA) prevented BW, fat mass gain and AT hyperplasia or hypertrophy in mice fed a high-fat diet (20). Furthermore, a mixture of n-3 PUFA stimulated lipid mobilization in AT from rats fed a normolipidic diet containing 60% of sucrose (21). EPA and more surprisingly ALA, increased AT *Atgl* and *Lipe* mRNA, suggesting a better capacity for TG mobilization in this tissue. DHA did not modify *Lipe* nor *Atgl* mRNA but reduced adiponectin plasma level. Adiponectin expression or plasma level were positively associated to adipose tissue lipolysis and negatively related to MetS. In agreement with our present results, we can postulate that DHA did not promote lipolytic pathways in eWAT (22, 23). Indeed *in vitro* experiments have previously demonstrated that DHA promoted adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes (24) and that EPA had an opposite effect which could be related to an inhibition of PPAR $\gamma$  and CEBP $\alpha$ , two key transcriptional regulators of adipocyte differentiation (24, 25). The present work also suggests that a negative regulation of PPAR $\gamma$  in AT could occur under EPA supplementation and mediate the observed effects.

Interestingly, plasma leptin concentration was significantly higher in mice fed the HF diet enriched with DHA compared to EPA. Plasma adiponectin to leptin ratio was modified accordingly and was

then increased in HF-E WT mice (26, 27). The analysis of the kinetics of leptin and adiponectin mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes confirmed the differential effects of EPA and DHA on circulating leptin and adiponectin concentrations. EPA stimulated adiponectin expression and DHA increased leptin expression in adipocytes.

Our experiment with Ob/Ob mice support the notion that a preventive role of nutrients against fat mass accumulation could be mostly observed in the initial stage of weight gain. In Ob/Ob mice, EPA supplementation was not able to modulate fat mass gain. Neither ALA, nor EPA or DHA counteracted the effect of overfeeding on body composition. However despite this, EPA was still able to partially protect Ob/Ob mice against glucose intolerance and IR.

These differential effects were related to modifications of the insulin sensitive activation of Akt protein in the liver, but not in skeletal muscle. Insulin-dependent Akt phosphorylation was decreased in C57BL/6J mice receiving the HF and HF-D diets compared to mice fed with the standard diet. On the contrary, supplementation with ALA or EPA had a protective effect. In direct line with these observations, only EPA supplementation increased the phosphorylation of Akt upon insulin stimulation in the liver of Ob/Ob obese mice. ALA had only a limited stimulatory effect which was not significant. No such improvement was reported in the skeletal muscle and AT. Although no significant changes were reported in WT mice, EPA significantly restored adiponectin mRNA level in eWAT from Ob/Ob mice, suggesting that this adipokine could partly mediate the beneficial effect of EPA supplementation on glucose homeostasis.

It was previously identified that Akt activation could be repressed by TRB3 protein in the liver (28). We recently confirmed the hypothesis in C2C12 myotubes which exhibited resistance to insulin dependent Akt phosphorylation and increased *Trb3* expression (Pinel *et al.*, BBA in press). The present study further validated a potential contribution of this protein in IR. Hence, *Trb3* mRNA levels were reduced in skeletal muscle from WT mice receiving n-3 PUFA compared to HF fed animals. However no significant changes were detected in the liver from the same animals. These data are the

first to evidence *in vivo* the impact of n-3 PUFA on *Trb3* gene expression. However, further studies are required to understand the links with muscle insulin response.

Gene expression level of genes involved in glucose homeostasis could not fully explain the differences observed between n-3 supplemented groups. Gene expression of key regulator of hepatic glucose production was not consistently affected among the different n-3 PUFA supplementation. We observed that the mRNA levels of *G6pc* and *Pck1* were reduced in the liver from HF-A and HF-D mice. G6Pc and PCK are involved in hepatic glucose production and unexpectedly, HF-A and HF-D mice exhibited an impaired glucose tolerance compared to control and EPA-supplemented mice. However, it was previously described that *Pck1* was not crucial for hepatic glucose production but its blockage could affect FA  $\beta$ -oxydation (29). Despite our observation that *Pck* genes were not regulated by n-3 PUFA in skeletal muscle, ALA and to a lower extent EPA, reduced glycerol kinase gene expression. It was previously found that FA esterification and glucose production could be affected when *Gyk* activity is diminished (30). Further studies are necessary to decipher the connections between all regulators of glucose metabolism in the presence of increased supply of n-3 PUFA.

In conclusion, EPA dietary supplementation, but not ALA and DHA, could prevent the deterioration of glucose homeostasis and the excessive accumulation of fat mass in an obesogenic environment. EPA has a direct impact on tissue metabolism, inhibiting fat cell hypertrophy in visceral AT, improving the adiponectin to leptin ratio and enhancing the insulin signaling pathway in the liver. By contrast, DHA promoted fat mass accumulation and did not improve glucose homeostasis, or IR. In agreement with a previous study using ALA-rich oils to decrease the omega 6 to omega 3 ratio in the diet (31), ALA did not exhibit beneficial effect on these parameters when used at a dose fitting with the nutritional recommendations.

## Acknowledgment

The authors acknowledge the staff from Auvergne University Experimental Animal Laboratory and Christophe Del'Homme, Philippe Denis, Anne Terisse-Lottier and Alexandre Teynie from the Experimental Animal Facility of the Human Nutrition Unit (INRA of Clermont-Ferrand) for their assistance throughout the animal protocol. We thank Celine Bobby for her help for TaqMan gene expression assays. We gratefully acknowledge financial support and doctoral fellowship (to A.P.) from Lesieur and Avril.

## References

1. Eckel, R. H., S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**: 1415-1428.
2. Reaven, G. M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**: 1595-1607.
3. Cusi, K. 2010. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **10**: 306-315.
4. Argiles, J. M., J. Lopez-Soriano, V. Almendro, S. Busquets, and F. J. Lopez-Soriano. 2005. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Medicinal research reviews* **25**: 49-65.
5. Alligier, M., L. Gabert, E. Meugnier, S. Lambert-Porcheron, E. Chanseau, F. Pilleul, C. Debard, V. Sauvinet, B. Morio, A. Vidal-Puig, H. Vidal, and M. Laville. 2013. Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* **98**: 802-810.
6. Despres, J. P., I. Lemieux, J. Bergeron, P. Pibarot, P. Mathieu, E. Larose, J. Rodes-Cabau, O. F. Bertrand, and P. Poirier. 2008. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1039-1049.
7. Pinel, A., B. Morio-Liondore, and F. Capel. 2014. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: implication for the prevention of type 2 diabetes. *J Physiol Biochem* **70**: 647-658.
8. Storlien, L. H., E. W. Kraegen, D. J. Chisholm, G. L. Ford, D. G. Bruce, and W. S. Pascoe. 1987. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* **237**: 885-888.
9. Wu, J. H., R. Micha, F. Imamura, A. Pan, M. L. Biggs, O. Ajaz, L. Djousse, F. B. Hu, and D. Mozaffarian. 2012. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* **107 Suppl 2**: S214-227.
10. Lorente-Cebrian, S., A. G. Costa, S. Navas-Carretero, M. Zabala, J. A. Martinez, and M. J. Moreno-Aliaga. 2013. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* **69**: 633-651.
11. Fedor, D., and D. S. Kelley. 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **12**: 138-146  
110.1097/MCO.1090b1013e3283218299.



12. Poudyal, H., S. K. Panchal, L. C. Ward, and L. Brown. 2013. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr Biochem* **24**: 1041-1052.
13. Weir, J. B. 1990. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. 1949. *Nutrition* **6**: 213-221.
14. Capel, F., C. Acquaviva, E. Pitois, B. Laillet, J. P. Rigaudiere, C. Jouve, C. Pouyet, C. Gladine, B. Comte, C. Vianey Saban, and B. Morio. 2015. DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation. *J Nutr Biochem* **26**: 949-959.
15. Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, C. Fernandes-Santos, M. B. Aguila, and C. A. Mandarim-de-Lacerda. 2010. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **46**: 212-223.
16. Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis, Jr. 1997. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* **99**: 385-390.
17. Wang, C. Y., and J. K. Liao. 2012. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* **821**: 421-433.
18. Cunnane, S. C., and M. J. Anderson. 1997. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr* **127**: 146-152.
19. Arterburn, L. M., E. B. Hall, and H. Oken. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* **83**: 1467S-1476S.
20. Ruzickova, J., M. Rossmeisl, T. Prazak, P. Flachs, J. Sponarova, M. Veck, E. Tvrzicka, M. Bryhn, and J. Kopecky. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**: 1177-1185.
21. Peyron-Caso, E., A. Quignard-Boulange, M. Laromiguiere, S. Feing-Kwong-Chan, A. Veronese, B. Ardouin, G. Slama, and S. W. Rizkalla. 2003. Dietary fish oil increases lipid mobilization but does not decrease lipid storage-related enzyme activities in adipose tissue of insulin-resistant, sucrose-fed rats. *J Nutr* **133**: 2239-2243.
22. Bullo, M., J. Salas-Salvado, and P. Garcia-Lorda. 2005. Adiponectin expression and adipose tissue lipolytic activity in lean and obese women. *Obesity surgery* **15**: 382-386.
23. You, T., R. Yang, M. F. Lyles, D. Gong, and B. J. Nicklas. 2005. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**: E741-747.
24. Murali, G., C. V. Desouza, M. E. Cleverger, R. Ramalingam, and V. Saraswathi. 2014. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **90**: 13-21.
25. Tanabe, Y., Y. Matsunaga, M. Saito, and K. Nakayama. 2008. Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. *Journal of pharmacological sciences* **106**: 478-484.
26. Inoue, M., M. Yano, M. Yamakado, E. Maehata, and S. Suzuki. 2006. Relationship between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance in subjects without hyperglycemia. *Metabolism* **55**: 1248-1254.
27. Finucane, F. M., J. Luan, N. J. Wareham, S. J. Sharp, S. O'Rahilly, B. Balkau, A. Flyvbjerg, M. Walker, K. Hojlund, J. J. Nolan, and D. B. Savage. 2009. Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* **52**: 2345-2349.
28. Du, K., S. Herzig, R. N. Kulkarni, and M. Montminy. 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* **300**: 1574-1577.
29. Burgess, S. C., N. Hausler, M. Merritt, F. M. Jeffrey, C. Storey, A. Milde, S. Koshy, J. Lindner, M. A. Magnuson, C. R. Malloy, and A. D. Sherry. 2004. Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* **279**: 48941-48949.
30. Watford, M. 2000. Functional glycerol kinase activity and the possibility of a major role for glyceroneogenesis in mammalian skeletal muscle. *Nutrition reviews* **58**: 145-148.

31. Enos, R. T., K. T. Velazquez, J. L. McClellan, T. L. Cranford, M. D. Walla, and E. A. Murphy. 2014. Reducing the Dietary Omega-6:Omega-3 Utilizing alpha-Linolenic Acid; Not a Sufficient Therapy for Attenuating High-Fat-Diet-Induced Obesity Development Nor Related Detrimental Metabolic and Adipose Tissue Inflammatory Outcomes. *PLoS One* **9**: e94897.

## Tables

**Table 1:** Anthropometric and calorimetric parameters of C57BL/6J mice. Five week old C57BL/6J mice were placed on a HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets and compared to mice fed with a standard LF diet for 16 weeks. Body composition, energy expenditure (BW-EE), respiratory quotient (RQ) and locomotor activity were evaluated during weeks 14 and 15. Tissue weights were evaluated at sacrifice after 16 weeks on the diets. Number of animals indicated within parenthesis. Data are means  $\pm$  SEM (n=13-19 and n=4-6 for anthropometric and calorimetric parameters respectively). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA). \* individual comparison vs LF, HF and HF-E found a difference at  $p=0.1$  (t test).

Variable	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
bodymass,g	27.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	29.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	29.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	29.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	29.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Bodyfatmass,%	9.5 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	13.4 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	13.0 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	10.3 $\pm$ 1.1 <sup>bc</sup>	13.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
Bodyleanmass,%	82.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	79.5 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	82.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	79.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
eWATfat,%BW	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Gastrocnemius,%BW	0.49 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01
Liver,%BW	3.85 $\pm$ 0.12	3.52 $\pm$ 0.13	3.65 $\pm$ 0.09	3.63 $\pm$ 0.08	3.41 $\pm$ 0.13
Heart,%BW	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>abc</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

Variable	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
BW-EE (kJ/gram)	1.60 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	1.50 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	1.58 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
locomotor activity	178 $\pm$ 12	174 $\pm$ 19	139 $\pm$ 14	179 $\pm$ 19	119 $\pm$ 18*
RQ	0.95 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.79 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

**Table 2:** Fatty acid composition of erythrocytes from C57BL/6J mice; Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets Data are means  $\pm$  SEM (n=8). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

fatty acid	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
C14.0	0.50 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.05
C15.0	0.36 $\pm$ 0.03	0.4 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.04
C16.0	33.22 $\pm$ 0.69	31.81 $\pm$ 0.94	30.13 $\pm$ 0.65	30.37 $\pm$ 0.46	30.93 $\pm$ 1.13
C16.1n.9	0.75 $\pm$ 0.09	0.89 $\pm$ 0.17	0.74 $\pm$ 0.14	0.70 $\pm$ 0.13	0.58 $\pm$ 0.1
<b>C16.1n.7</b>	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<b>C17.0</b>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.57 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.51 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
<b>C18.0</b>	12.24 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	16.55 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	15.41 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>	14.83 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	14.75 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>
C18.19cis	14.31 $\pm$ 0.30	15.33 $\pm$ 0.57	14.70 $\pm$ 0.23	14.66 $\pm$ 0.19	14.00 $\pm$ 0.38
<b>C18.1n.7</b>	2.69 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.48 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	1.24 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>
<b>C18.2n6cis</b>	9.34 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>	10.97 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>	12.09 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	11.61 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup>	13.59 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>
C20.1n.9	0.42 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01
<b>C18.3n.3</b>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<b>C20.2</b>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.62 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.54 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<b>C22.0</b>	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.41 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
C20.3n.6	1.26 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.10	1.35 $\pm$ 0.48	0.97 $\pm$ 0.12	1.38 $\pm$ 0.37
<b>C20.4n.6</b>	14.49 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	12.00 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	12.42 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	8.80 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	7.99 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>
<b>C20.5n.3</b>	0.90 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	0.93 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	1.08 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	4.92 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.63 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
<b>C22.4n.6</b>	1.45 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	1.14 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
<b>C22.5n.6</b>	0.81 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<b>C22.5n.3</b>	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.40 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.86 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
<b>C22.6n.3</b>	4.74 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	3.11 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>	4.85 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	5.63 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	8.98 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>
<b>total n-3</b>	6.37 $\pm$ 0.47 <sup>cd</sup>	4.59 $\pm$ 0.57 <sup>d</sup>	7.08 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	13.06 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	11.09 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>
<b>total n-6</b>	27.35 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	25.73 $\pm$ 1.43 <sup>ab</sup>	27.25 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	22.04 $\pm$ 0.61 <sup>c</sup>	23.34 $\pm$ 0.68 <sup>bc</sup>
<b>n-6 : n-3</b>	4.43 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	5.98 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	1.70 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	2.22 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>

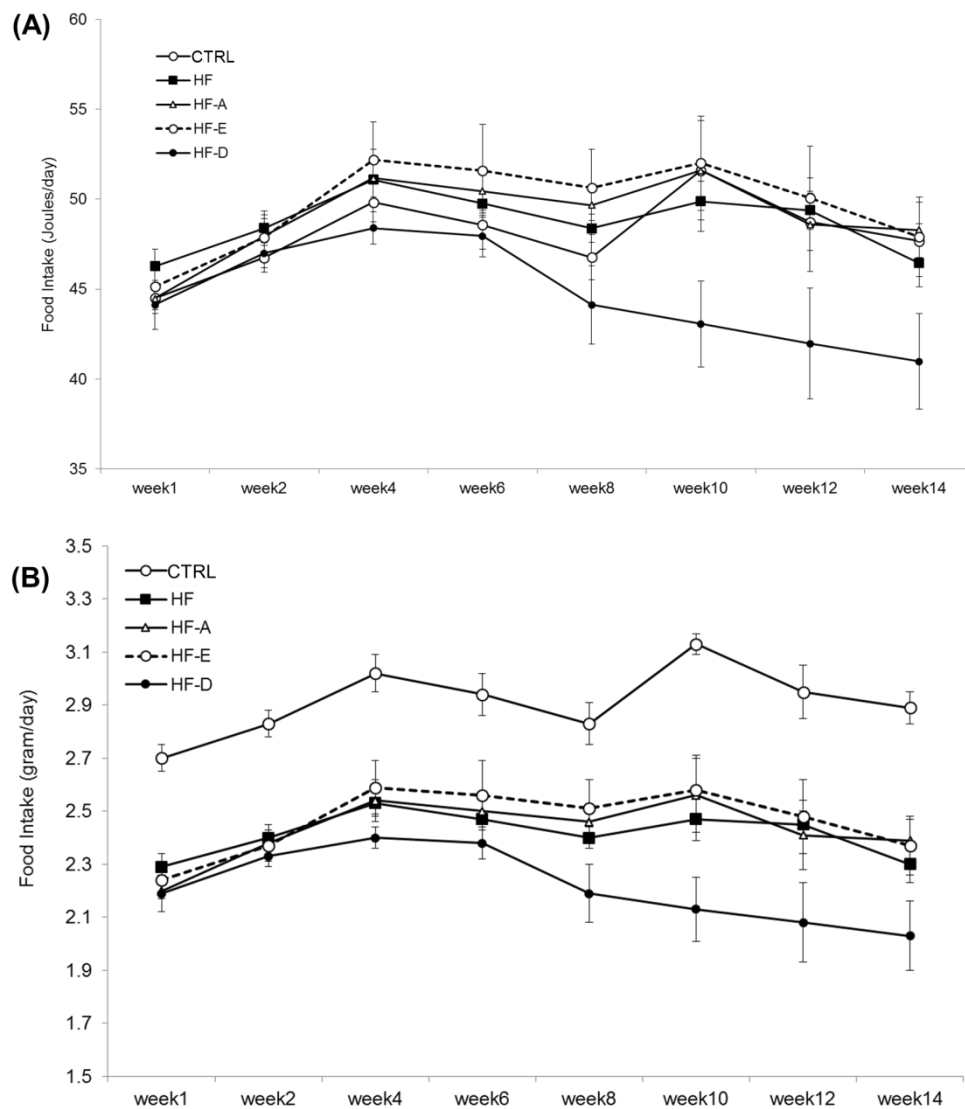
**Table 3:** Plasma parameters in fasted C57BL/6J mice fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Data are means  $\pm$  SEM (n=8-9, excepted leptin & adiponectin, n=8-11). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA). #:  $p < 0.1$  vs HF (ANOVA p value was 0.07).

	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
Plasma concentration of					
Insulin (ng/ml)	5.54 $\pm$ 0.19	7.04 $\pm$ 0.68	5.86 $\pm$ 0.64	4.64 $\pm$ 0.53 <sup>#</sup>	6.69 $\pm$ 0.76
NEFA (mmol/l)	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
Glucose (g/l)	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.50 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Triglyceride (g/l)	0.37 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.03
Glycerol ( $\mu$ mol/l)	231 $\pm$ 16	231 $\pm$ 24	191 $\pm$ 12	183 $\pm$ 7	208 $\pm$ 18
Total cholesterol (g/l)	0.72 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.92 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.73 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.74 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>
Leptin (ng/ml)	2.39 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	2.30 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	1.82 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	5.24 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
Adiponectin ( $\mu$ g/ml)	9.13 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	6.14 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	5.73 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	5.57 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	5.68 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>

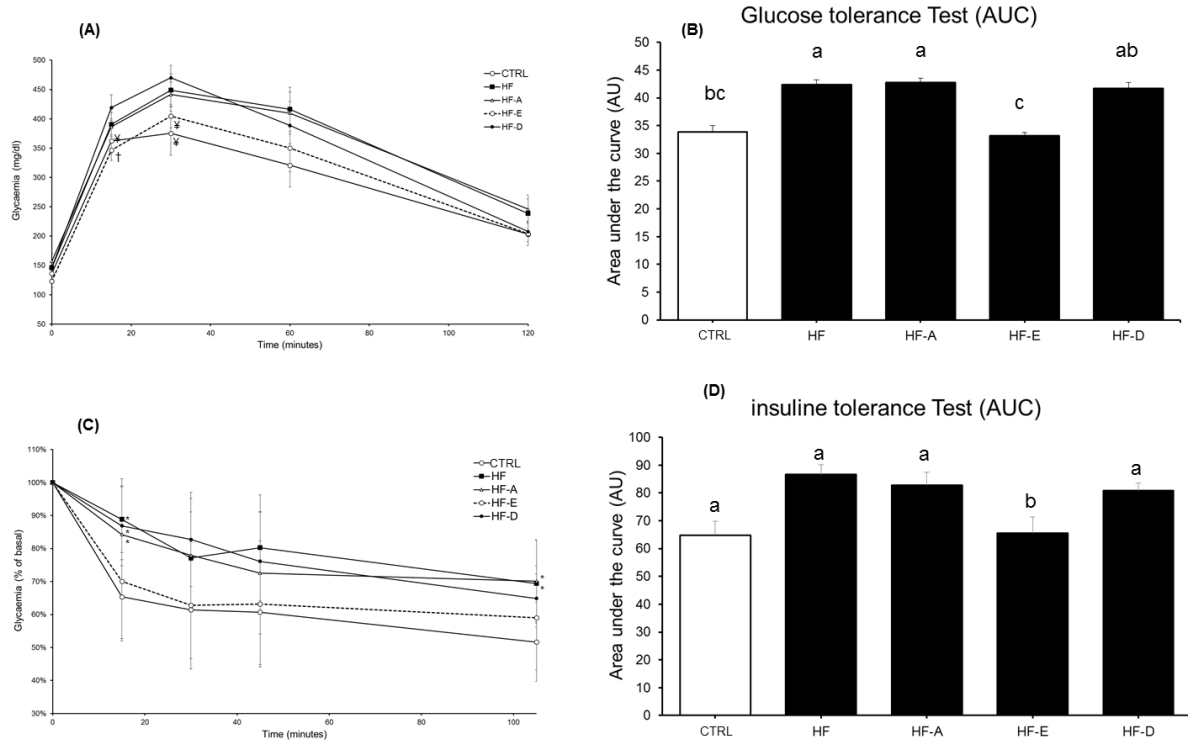
**Table 4:** Anthropometric and food consumption measurements in Ob/Ob mice. Five week old Ob/Ob mice were placed on the same diets as wild type C57BL/6J mice, i.e. a HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets and compared to Ob/Ob mice fed with a standard LF diet (Control) for 5 weeks.

	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D	n
Body weight g	40.16 $\pm$ 0.68 b	48.67 $\pm$ 1.00 a	47.80 $\pm$ 0.77 a	47.76 $\pm$ 1.04 a	48.90 $\pm$ 0.58 a	8
fat%	51.67 $\pm$ 0.96	53.05 $\pm$ 0.84	52.32 $\pm$ 0.91	52.74 $\pm$ 1.15	53.20 $\pm$ 0.89	8
lean%	45.16 $\pm$ 0.87	44.53 $\pm$ 0.88	44.74 $\pm$ 0.87	44.94 $\pm$ 1.13	44.35 $\pm$ 0.75	8
food consumption						
g/d	3.54 $\pm$ 0.11	3.7 $\pm$ 0.05	3.68 $\pm$ 0.04	3.77 $\pm$ 0.06	3.7 $\pm$ 0.05	8
j/d	58.48 $\pm$ 1.76 b	74.63 $\pm$ 1.04 a	74.28 $\pm$ 0.69 a	76.05 $\pm$ 1.26 a	74.70 $\pm$ 0.91 a	8

## Figures

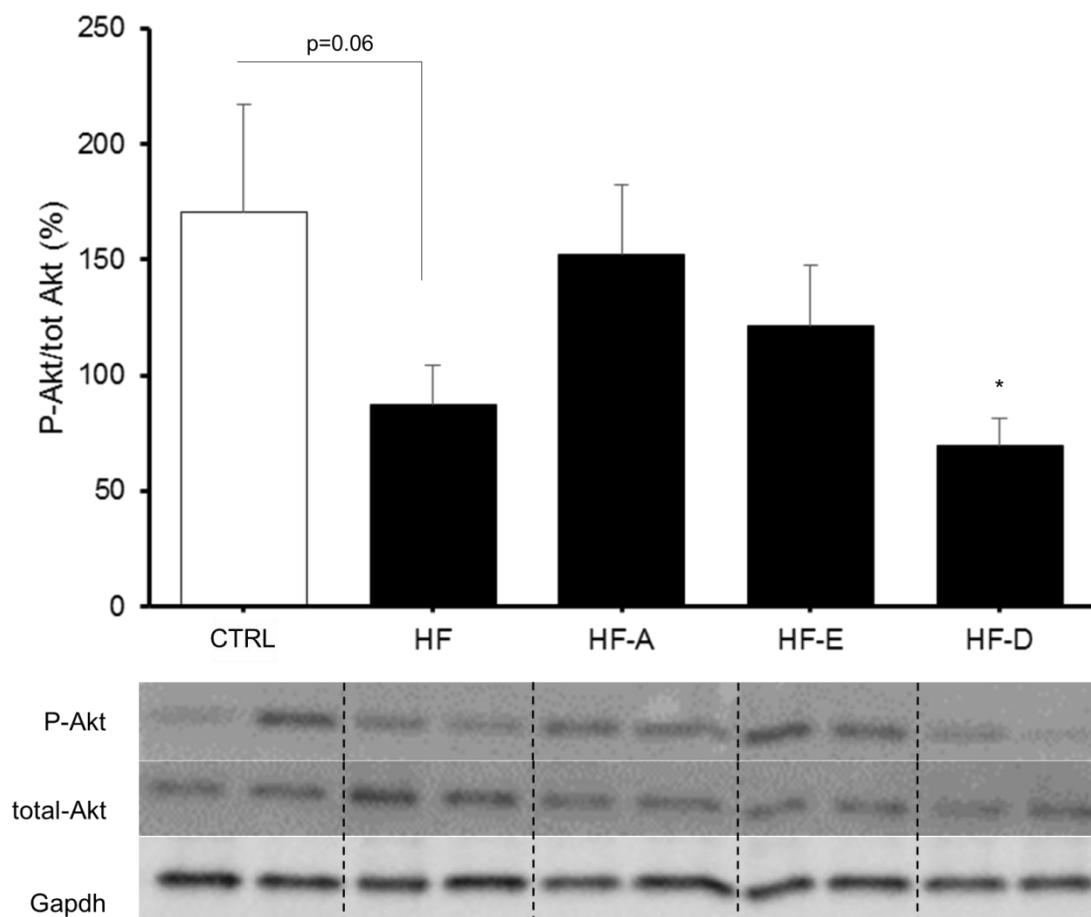


**Figure 1:** Evolution of food consumption in C57BL/6J mice. Five week old mice were placed on a HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets and compared to mice fed with a standard LF diet for 16 weeks. Food consumption was recorded every 2 weeks between week 0 and week 14 and expressed in Joules per day (A) or g per day (B). Total food consumption was measured for each cage (n =5 mice per cage). The measured value was divided by the number of animals in the corresponding cage. Data represent mean consumption per animal  $\pm$  SEM (n=20).



**Figure 2:** Glucose and Insulin tolerance test in C57BL/6J mice.

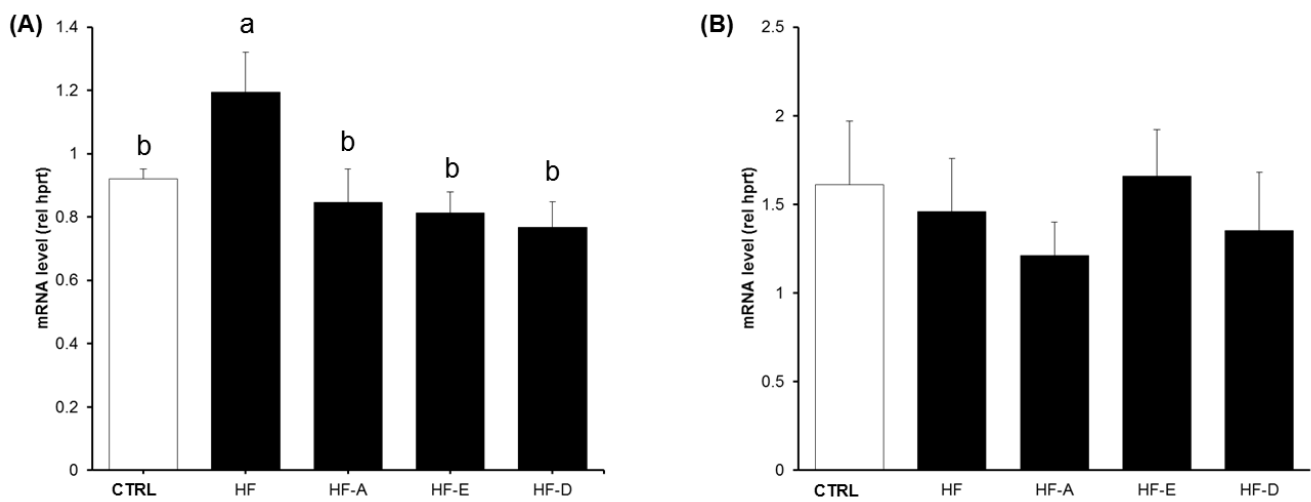
Experiments were performed 16 weeks after the beginning of dietary treatments with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Glucose tolerance test (A–B) or insulin sensitivity (C–D) were performed in two separate sets of animals. (A) Plasma glucose concentrations following intraperitoneal glucose injection to fasted mice. (B) Area under the glycaemic curve values from glucose tolerance test (A). (C) Plasma glycaemia following intraperitoneal insulin injection to fasted mice. (D) Area under the glycaemic curve values from insulin sensitivity test (C). Data are means  $\pm$  SEM (n=8-10, n=7-9 for A-B and C-D respectively. (A): † :  $p < 0.05$  vs HF-D; ¥ :  $p \leq 0.1$  vs HF-D. (C) \*  $p < 0.05$  vs control. (B,D) Means with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).



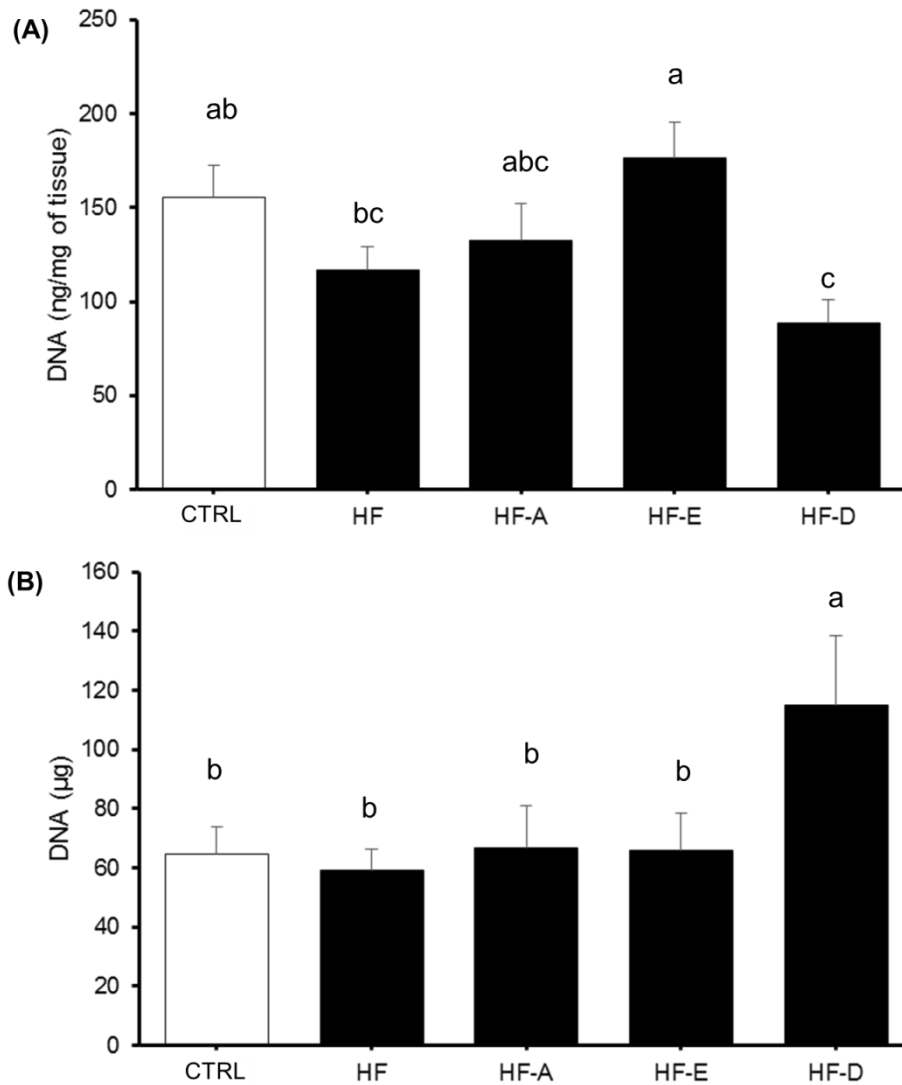
**Figure 3:** Insulin-dependent Akt phosphorylation in the liver from C57BL/6J mice.

Histograms represent means of Akt phosphorylation in skeletal muscle from C57Bl6J mice following insulin injection after 16 weeks of feeding with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. The abundance of Akt phosphorylated at Ser 473 was normalized to total Akt abundance using specific antibodies. Data are means  $\pm$  SEM (n=7-8 experiments per group). Representative pictures of samples from each group are reported. \*p<0.05 vs control group (t test).

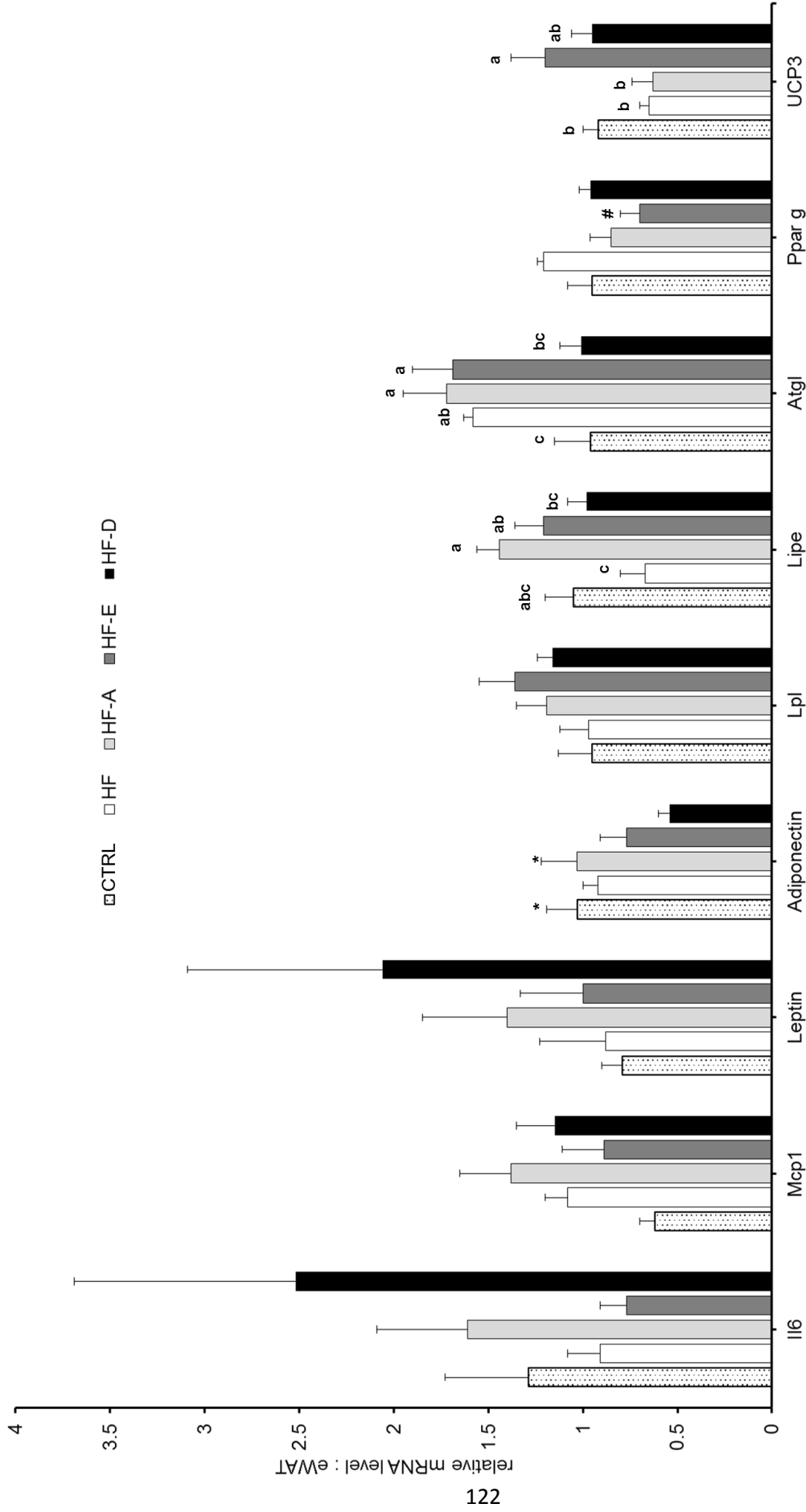




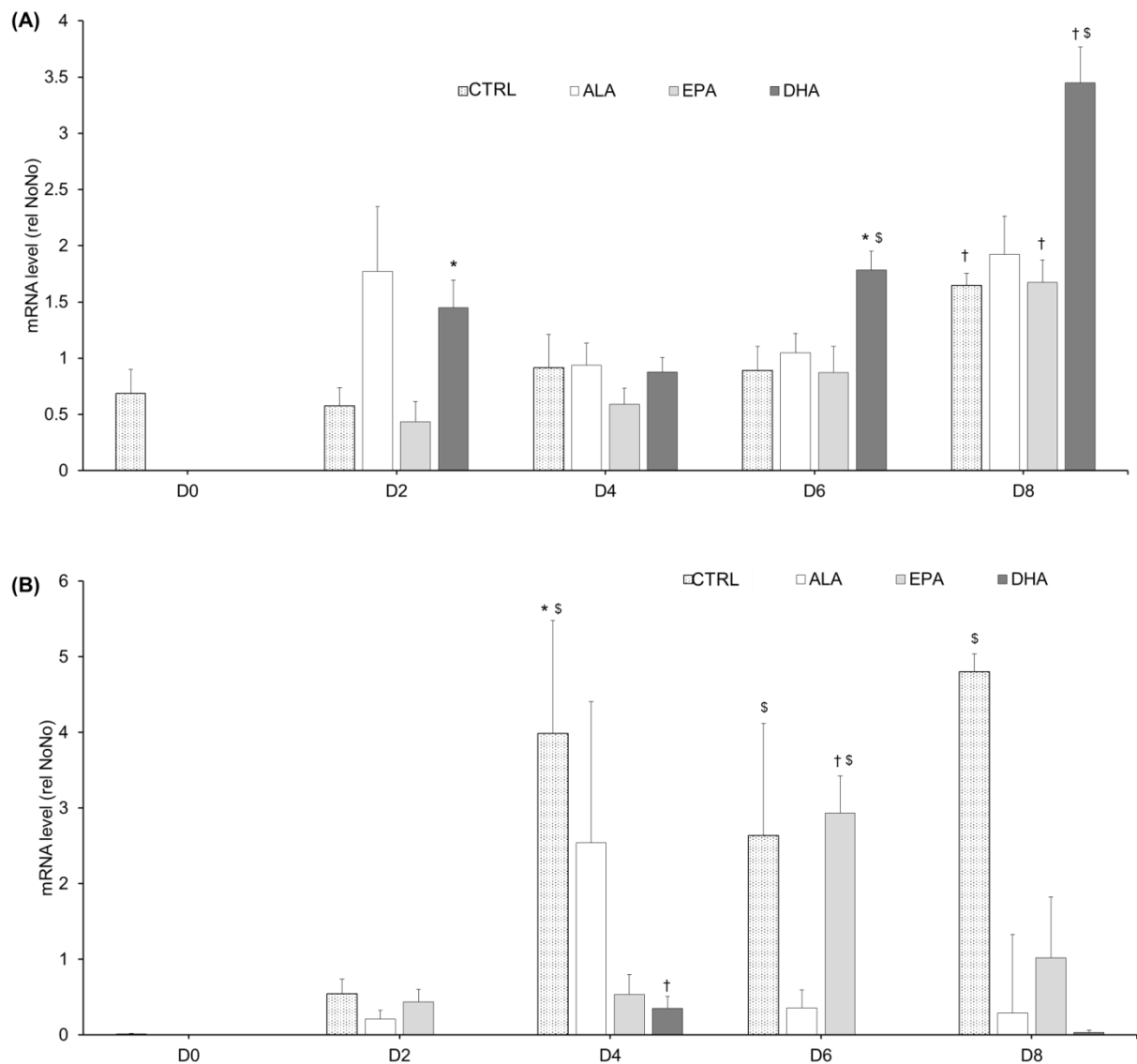
**Figure 4:** TRB3 mRNA level in skeletal muscle (A) and the liver (B) from C57BL/6J mice. Quantification of mRNA was measured by RT-qPCR and normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) mRNA level. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative abundance of each mRNA (n=5-8 and 5-6 in skeletal muscle and the liver respectively). Means with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).



**Figure 5:** eWAT cellularity in C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets: **(A)** DNA concentration in eWAT; **(B)**: Total DNA amount in eWAT depot. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=13-15). Means with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

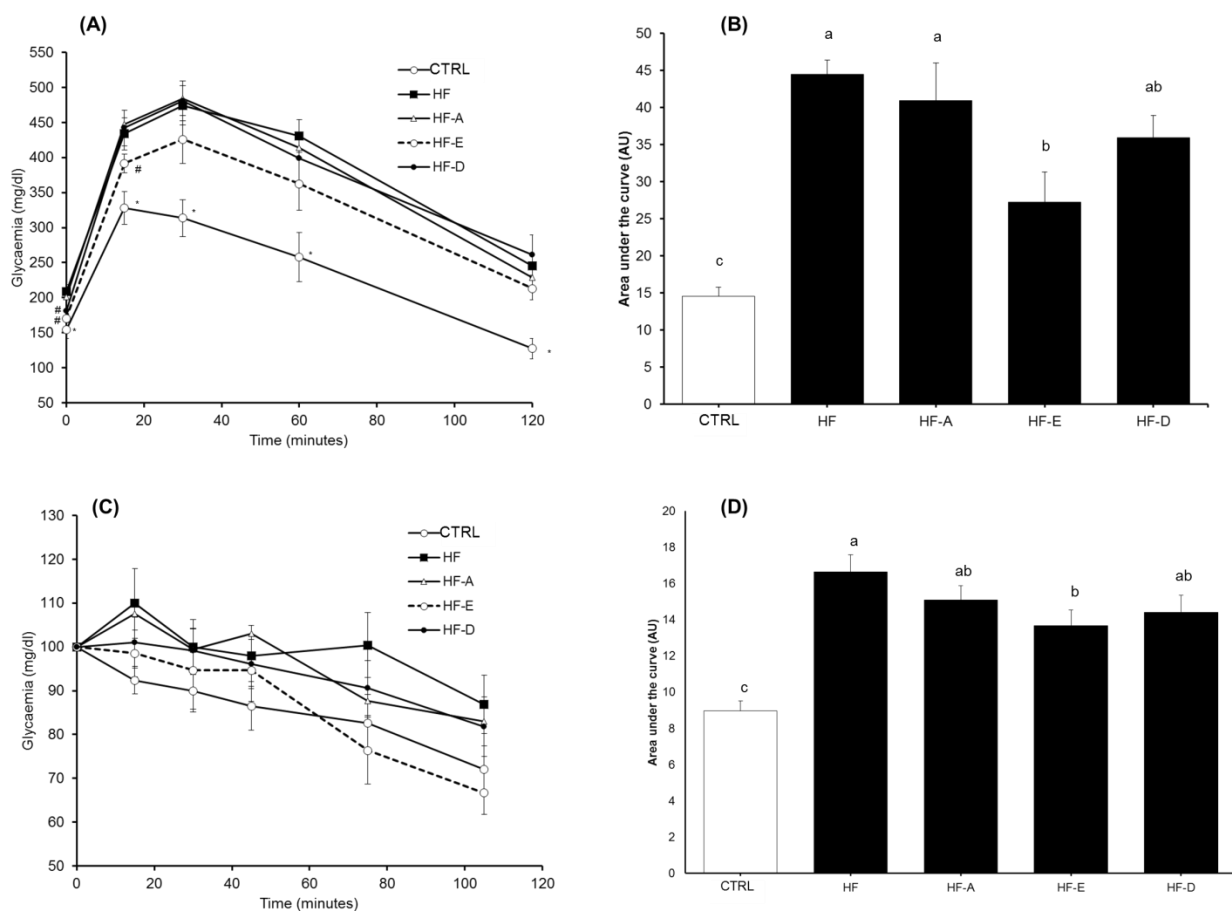


**Figure 6:** Gene expression in eWAT from C57BL/6J mice : Quantification of mRNA was measured by RT-qPCR and normalized to non-POU domain containing, octamer-binding (NoNo) mRNA level. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative abundance of each mRNA (n=5-6 per group). Means with different letters were significantly different (ANOVA); \*:  $p < 0.05$  vs HF-D; #  $p < 0.05$  vs HF (t test).



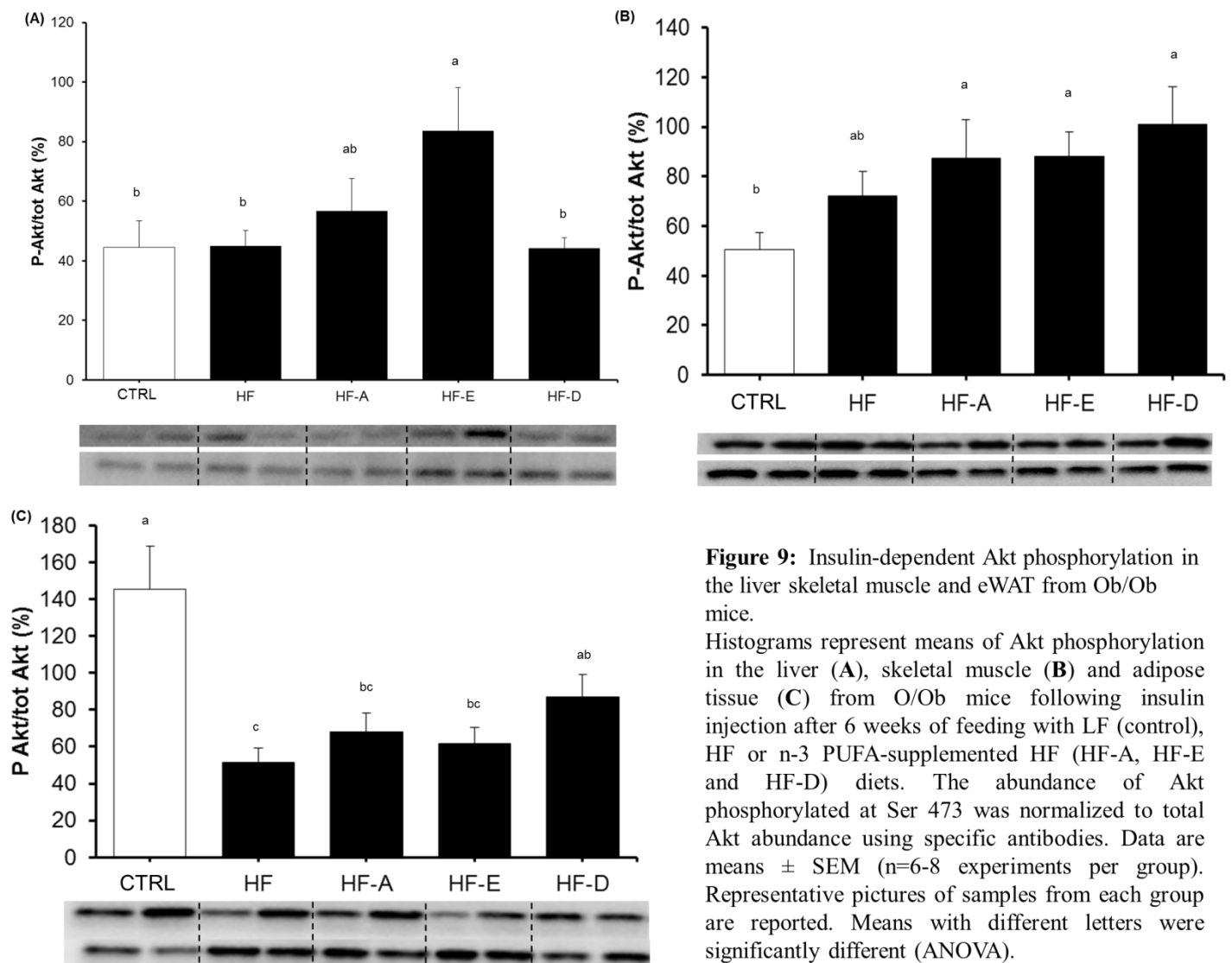
**Figure 7:** Leptin and adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes:

Quantification of Leptin (A) and adiponectin (B) mRNA were measured by RT-qPCR and normalized to non-POU domain containing, octamer-binding (NoNo) mRNA level. Measurements were performed in cells exposed to 0 (CTRL) or 50  $\mu$ M of ALA, EPA or DHA during the differentiation process at day 0 (before FA treatment) and days 2, 4, 6 and 8. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative abundance of each mRNA (n=4-6 per group). \*:  $p < 0.05$  vs D0, †  $p < 0.05$  vs all other days in the same treatment (ANOVA); \$  $p < 0.05$  vs other treatments at the same day.

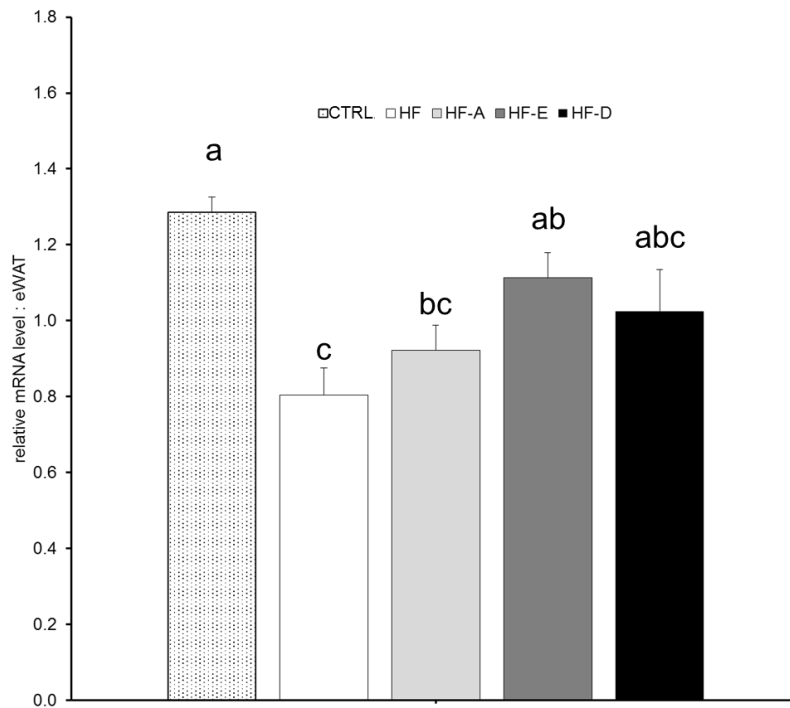


**Figure 8:** Glucose and Insulin tolerance test in Ob/Ob mice

Experiments were performed 5 weeks after the beginning of dietary treatments with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Glucose tolerance test (A–B) or insuline sensitivity (C–D) were performed in the same animals. (A) Plasma glucose concentrations following intraperitoneal glucose injection to fasted mice. (B) Area under the glycaemic curve values from glucose tolerance test (A). (C) Plasma glucose concentrations following intraperitoneal insulin injection to fasted mice. (D) Area under the glycaemic curve values from insulin sensitivity test (C). Data are means  $\pm$  SEM (n=7-8). (A): \* significantly different from the other groups, #: value did not differ from control. Means with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).



**Figure 9:** Insulin-dependent Akt phosphorylation in the liver skeletal muscle and eWAT from Ob/Ob mice. Histograms represent means of Akt phosphorylation in the liver (A), skeletal muscle (B) and adipose tissue (C) from O/Ob mice following insulin injection after 6 weeks of feeding with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. The abundance of Akt phosphorylated at Ser 473 was normalized to total Akt abundance using specific antibodies. Data are means  $\pm$  SEM (n=6-8 experiments per group). Representative pictures of samples from each group are reported. Means with different letters were significantly different (ANOVA).



**Figure 10:** Adiponectin gene expression in eWAT from Ob/Ob mice : Quantification of mRNA was measured by RT-qPCR and normalized to non-POU domain containing, octamer-binding (NoNo) mRNA level. Mice were fed during 6 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative abundance of adiponectin mRNA (n=5-7 per group). Means with different letters were significantly different (ANOVA); \*:  $p < 0.05$  vs HF-D; #  $p < 0.05$  vs HF (t test).

## Supplementary Tables

**Supplementary Table 1:** Fatty acid composition of skeletal muscle phospholipids from C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Data are means of relative percentage of indicated FA  $\pm$  SEM (n=8). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

Fatty acid (rel%)	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
C14:0	0.64 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.5 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
C15:0	0.61 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	1.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>
C16:0	27.51 $\pm$ 0.99	26.07 $\pm$ 0.56	24.62 $\pm$ 0.72	26.15 $\pm$ 1.26	26.23 $\pm$ 0.71
C16:1 n-9	0.68 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.04
C16:1 n-7	2.12 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
C17:0	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
C18:0	10.5 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	12.34 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	13.7 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	12.79 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	13.26 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
C18:1 n-9	6.93 $\pm$ 0.20	8.11 $\pm$ 0.32	7.91 $\pm$ 0.17	7.43 $\pm$ 0.53	7.31 $\pm$ 0.50
C18:1 n-7	3.58 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.06 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.46 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
C18:2 n-6	6.78 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	7.26 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	7.35 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	6.66 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	3.87 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
C20:1 n-9	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C18:3 n-3	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
C20:2	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.54 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C20:3 n-6	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
C20:4 n-6	11.81 $\pm$ 0.26 <sup>ab</sup>	12.23 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	9.66 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	5.34 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	2.88 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
C20:5 n-3	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.15 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C22:4 n-6	0.96 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.63 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
C22:5 n-6	2.78 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	3.38 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
C22:5 n-3	2.07 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.77 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	3.64 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	8.08 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
C22:6:n-3	20.85 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>	19.04 $\pm$ 0.83 <sup>d</sup>	23.35 $\pm$ 0.85 <sup>bc</sup>	25.52 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	39.91 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
sum n-3	25.08 $\pm$ 1.84 <sup>cd</sup>	22.1 $\pm$ 0.90 <sup>d</sup>	27.61 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>	34.64 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	40.99 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
sum n-6	21.87 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>	25.4 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	19.78 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	13.28 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>	7.33 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>
n-6 : n-3	0.92 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>



**Supplementary Table 2:** Fatty acid composition of liver phospholipids from C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Data are means of relative percentage of indicated FA  $\pm$  SEM (n=5-8). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

Fatty acid (rel%)	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
C16:0	21.63 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	18.54 $\pm$ 0.82 <sup>abc</sup>	17.16 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	17.69 $\pm$ 1.21 <sup>bc</sup>	20.31 $\pm$ 1.01 <sup>ab</sup>
C16:1 n-9	0.4 $\pm$ 0.11	0.38 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.05
C16:1 n-7	1.95 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	0.53 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
C17:0	0.42 $\pm$ 0.12	0.36 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.01
C18:0	12.36 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>	15.27 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	16.01 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>	17.34 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	14.37 $\pm$ 0.68 <sup>bc</sup>
C18:1 n-9	14.14 $\pm$ 1.73	12.3 $\pm$ 1.09	11.88 $\pm$ 1.04	10.82 $\pm$ 1.14	11.53 $\pm$ 1.14
C18:1 n-7	2.4 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.19 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
C18:2 n-6	16.73 $\pm$ 1.11	17.56 $\pm$ 0.71	18.76 $\pm$ 0.37	17.79 $\pm$ 0.61	18.45 $\pm$ 0.54
C20:0	0.26 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.04
C18:3 n-6	0.43 $\pm$ 0.11	0.42 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.05
C20 1 n-9	0.28 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02
C18:3 n-3	0.41 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.73 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.26 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>
C20:2	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
C22:0	0.27 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.04
C20:3 n-6	1.03 $\pm$ 0.2	0.51 $\pm$ 0.08	0.85 $\pm$ 0.2	0.76 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.14
C20:4 n-6	15.08 $\pm$ 0.95 <sup>bc</sup>	18.45 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	15.95 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	13.09 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>	9.89 $\pm$ 0.51 <sup>d</sup>
C24:0	0.26 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.03
C20:5 n-3	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	0.62 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	3.38 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
C22:4 n-6	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
C22:5 n-3	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.64 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
C22:6 n-3	9.96 $\pm$ 0.38 <sup>d</sup>	11.25 $\pm$ 0.76 <sup>cd</sup>	12.53 $\pm$ 0.31 <sup>bc</sup>	14.32 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	17.76 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>
sum n-3	11.05 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	12.02 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	14.52 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	19.47 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
sum n-6	34.03 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	37.73 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	36.24 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	32.4 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	29.63 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
n-6 : n-3	3.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.21 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.5 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.69 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	1.48 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>

**Supplementary Table 3:** Gene expression in the liver (A) and skeletal muscle (B) from fasted C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Quantification of mRNA was measured by RT-qPCR using Taqman Low density arrays and normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) mRNA level. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative abundance of each mRNA (n=7 and 6 in skeletal muscle and the liver respectively). Means with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

(A)

Gene symbol	Gene name	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; cytosolic	0.73 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.15 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.27 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2; mitochondrial	0.87 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.16	1.29 $\pm$ 0.18	0.78 $\pm$ 0.09
Gyk	Glycerol kinase	0.83 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.07	0.68 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.1
pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	2.50 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.25 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	0.68 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.10
G6pc	glucose-6-phosphatase	1.12 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	1.45 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.12 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

(B)

Gene symbol	Gene name	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; cytosolic	1.89 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.29a <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2; mitochondrial	1.41 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.16	1.34 $\pm$ 0.16
Gyk	Glycerol kinase	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.05a <sup>b</sup>	0.64 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	0.89 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.09	0.8 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.09
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	1.05 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.15	0.81 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.1

**Supplementary Table 4:** Fatty acid composition of adipose tissue lipids from C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Data are means of relative percentage of indicated FA  $\pm$  SEM (n=6-10). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

Fatty acid (rel%)	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
C14:0	1.67 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.20 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.25 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
C15:0	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C16:0	20.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	16.5 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	17.2 $\pm$ 0.4 <sup>bc</sup>	18.0 $\pm$ 0.5 <sup>bc</sup>	18.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
C16:1 n-9	0.94 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.23 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	1.21 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.05 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>	1.25 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
C16:1 n-7	8.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	4.2 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
C17:0	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C18:0	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
C18:1 n-9	37.5 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	46.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	44.9 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	44.2 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	43.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
C18:1 n-7	3.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
C18:2 n-6	22.4 $\pm$ 0.7	23.4 $\pm$ 0.8	21.9 $\pm$ 0.3	22.9 $\pm$ 0.5	23.2 $\pm$ 0.5
C20:1 n-9	0.70 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.11	0.60 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.10
C18:3 n-3	1.22 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	2.29 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.78 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
C20:2	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
C20:4 n-6	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
C20:5 n-3	nd	nd	nd	0.24 $\pm$ 0.02	nd
C22:5 n-3	nd	nd	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C22:6 n-3	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
sum n-3	1.34 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.78 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	2.50 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.88 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
sum n-6	24.2 $\pm$ 0.7	24.6 $\pm$ 0.8	24.8 $\pm$ 0.3	24.6 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.5
n-6 : n-3	18.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	32.7 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	10.1 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	17.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	14.0 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>

**Supplementary Table 5:** Fatty acid composition of liver neutral lipids from C57BL/6J mice. Mice were fed during 16 weeks with LF (control), HF or n-3 PUFA-supplemented HF (HF-A, HF-E and HF-D) diets. Data are means of relative percentage of indicated FA  $\pm$  SEM (n=5-8). Means within a row with different superscripts differ at  $p < 0.05$  (ANOVA).

Fatty acid (rel %)	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
C16:0	17.2 $\pm$ 3.1	16.7 $\pm$ 1.6	17.6 $\pm$ 0.5	19.1 $\pm$ 1.4	19.3 $\pm$ 0.4
C16:1 n-9	1.03 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.17	1.02 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.12
C16:1 n-7	4.49 $\pm$ 1.75	1.21 $\pm$ 0.29	1.47 $\pm$ 0.20	1.32 $\pm$ 0.19	1.36 $\pm$ 0.18
C18:0	2.61 $\pm$ 0.94	4.65 $\pm$ 1.32	3.46 $\pm$ 1.23	3.38 $\pm$ 0.43	2.69 $\pm$ 0.47
C18:1 n-9	37.8 $\pm$ 1.5	36.8 $\pm$ 2.0	36.6 $\pm$ 2.1	34.3 $\pm$ 0.8	33.3 $\pm$ 0.7
C18:1.n-7	2.85 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.51 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.31 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	1.16 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
C18:2 n-6	22.3 $\pm$ 1.0	24.3 $\pm$ 1.3	24.5 $\pm$ 1.4	23.6 $\pm$ 0.9	24.2 $\pm$ 0.6
C18:3 n-6	0.64 $\pm$ 0.20	0.83 $\pm$ 0.13	0.56 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.06
C20:1 n-9	0.89 $\pm$ 0.17	0.70 $\pm$ 0.14	0.74 $\pm$ 0.16	0.67 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.07
C18:3 n-3	0.92 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
C20:4 n-6	3.87 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	6.11 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 1.44 <sup>ab</sup>	2.25 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	1.32 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
C20:5 n-3	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.41 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
C22 5 n-3	0.47 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	0.36 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.65 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.20 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
C22 6 n-3	2.55 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	2.44 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>	3.00 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	4.77 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	9.85 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>
sum n-3	4.19 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	3.78 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>	6.61 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	10.23 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	12.58 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>
sum n-6	27.6 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	32.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	29.1 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	26.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	26.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
n-6 : n-3	7.45 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	9.03 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	4.64 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	2.68 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	2.23 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>

## 2.2. Oméga-3, lipotoxicité hépatique et musculaire

IMPACT DES OMEGA-3 SUR LE METABOLISME MUSCULAIRE ET  
HEPATIQUE : ROLE DE L'OXYDATION MITOCHONDRIALE ET DE  
L'ACCUMULATION DE DIGLYCERIDES

Données complémentaires à l'article précédent

Afin de proposer un article cohérent sur l'homéostasie du glucose et l'expansion du tissu adipeux, nous avons mis de côté certains résultats obtenus sur le modèle *in vivo*. Ces données, présentées ici, concernent l'évaluation du métabolisme des lipides dans le foie et le muscle et notamment l'oxydation mitochondriale dans ces deux tissus (analysée *ex vivo* à l'aide de palmitate marqué au  $^{14}\text{C}$ ). Cette partie comporte aussi des données sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif du muscle et du foie, évalués à l'aide de cartes microfluidiques qui ont aussi permis d'explorer l'expression des gènes de la néoglucogenèse (*cf.* article précédent). Nos résultats nous ayant conduit à nous intéresser au foie, nous avons exploré la régulation de la lipotoxicité dans ce tissu par le dosage hépatique de DG et TG par CCM et dosage colorimétrique ainsi que par l'exploration de l'activation de la PKC $\theta$  dans le foie des souris sauvages et *ob/ob*. Pour de plus amples informations sur les protocoles expérimentaux employés, se reporter au chapitre III, section 2. ou à l'article précédent.

## Matériels et méthodes

### *Oxydation mitochondriale du 1-<sup>14</sup>C palmitate ex vivo*

Lors de l'abattage des animaux, 90mg de foie ou de muscle ont été broyés dans un milieu de maintien (25mM de sucrose, 2mM d'EDTA, 10mM de Tris base) et incubés dans de la glace. Du tampon d'oxydation (9mM d'ATP, 2mM de NAD, 0,6mM de cytochrome C, 0,2mM de Coenzyme A, 1,2mM de L-carnitine, 0,9mM d'acide malique) a été ajouté. Les Homogénats (75µL) ont ensuite été incubés à 37°C sous agitation pendant 30min dans des fioles hermétique pour piéger le CO<sub>2</sub> libéré lors de l'oxydation complète du palmitate. Pendant l'incubation, 100µL de [1-<sup>14</sup>C] palmitate (0.25µCi/mL, 0.5mM) ont été injectés toutes les 30 secondes. A la fin de l'incubation, 200µL d'acide perchlorique ont été ajoutés dans le milieu pour faire précipiter les acides gras. Les tubes sont conservés à 4°C pendant 1h30. Le piégeur de CO<sub>2</sub> a été récupéré séparément pour le comptage par scintillation de l'oxydation totale. Les milieux sont centrifugés à 200g pendant 5min puis 500µL ont été utilisés pour le comptage des corps acido-solubles.

### *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Les acides ribonucléiques (ARN) ont été extraits en utilisant du TRIzol® (Invitrogen, 1ml/10cm<sup>2</sup>) conformément aux indications du fabricant. Du chloroforme a ensuite été ajouté (0,2mL/mL de TRIzol®) et les échantillons ont été mélangés et centrifugés pendant 15 minutes à 12000g et 4°C. La phase aqueuse contenant les ARN a été collectée et mélangée avec de l'isopropanol pour faire précipiter les ARN avant centrifugation pendant 15 minutes à 12000g et 4°C. Après centrifugation, les culots ont été lavés avec de l'éthanol à 70% (volume/volume), séchés et resuspendus dans de l'eau. La quantification des ARN et leur intégrité ont été vérifiées par la mesure du ratio optique à 260nm et 280nm et par migration sur gel d'agarose, respectivement. Deux microgrammes d'ARN totaux ont été utilisés pour réaliser la transcription inverse des ARN en acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc). La technologie *Taqman Low density array* sur plaque 384 puits a été utilisée pour réaliser la PCR quantitative dans un système 7900HT (Applied Biosystems).

### *Dosage des DG et TG hépatiques*

Après sacrifice, une partie du foie des souris sauvages a été récupérée pour extraire les lipides. Les foies ont été broyés en Méthanol/EGTA (6mL) avant séparation des lipides selon la méthode de Folch *et al.* (Folch *et al.* 1957). La phase de chloroforme est récupérée et séchée

après passage à travers du sulfate de sodium anhydre pour enlever l'eau résiduelle. Le dépôt de lipides est alors repris dans 1mL de méthanol et conservé en pilulier en verre à -20°C jusqu'à utilisation. Un volume fixe de lipides est déposé en CCM et migre dans une phase mobile constituée d'hexane, de diéthyléther et d'acide acétique (74:25:1, volume/volume). Les fractions (DG et TG) séparées sont visualisées par coloration à la vapeur d'iode avant excision des spots et élution à l'aide d'acétone. La quantification des DG et TG est réalisée à l'aide d'un kit enzymatique dégradant le glycérol (Diasys). La quantité relative de DG et TG (en %) est rapporté au poids du tissu de l'échantillon utilisé.

### *Western Blot*

Après injection intrapéritonéale d'insuline et sacrifice des animaux, une partie des foies de souris sauvages et *ob/ob* a été récupérée et congelée à -80°C jusqu'à utilisation. Ces échantillons ont été broyés en présence de tampon de lyse (50mM d'HEPES, 150mM de chlorure de sodium, 10mM d'EDTA, 10mM de NaPPi, 25mM de  $\beta$ -glycérophosphate, 100mM de fluorure de sodium, 10% de glycérol, 1% d'orthovanadate de sodium, 1% de Triton X-100 et 0.5% de cocktail inhibiteur de phosphatases) à l'aide d'un broyeur à billes. La concentration protéique des lysats a été déterminée à l'aide du kit de dosage BCA pour garantir un dépôt de 20 $\mu$ g de protéines pour la migration et la séparation en électrophorèse *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes en (PVDF). Après l'incubation des anticorps primaires et secondaires, la fixation a été détectée en utilisant l'ECL, substrat de l'enzyme couplée aux anticorps secondaires. La chimiluminescence a été enregistrée grâce au système d'imagerie MF ChemiBIS 2020 (DNR Bio-Imaging Systems, Israël). Les bandes obtenues ont été quantifiées avec le logiciel MultiGauge V3.2 (Fujifilm, Asnières, France).

### *Analyses statistiques*

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Une analyse de variance (ANOVA) à une voie a été utilisée pour comparer les traitements entre eux. Si celle-ci était significative ( $p < 0,05$ ), elle a été suivie d'un test post-hoc de Fisher. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statview version 5.0 (SAS Institute Inc., Brie Comte Robert, France).



## Résultats

### *L'oxydation mitochondriale n'est pas améliorée dans le foie des souris sauvages*

L'oxydation du palmitate n'est pas altérée dans le foie des souris HF par rapport à ceux des souris CTRL (*cf.* **Figure 1**). Malgré une ANOVA non significative ( $p=0.095$ ), l'oxydation est améliorée dans les groupes EPA et DHA si l'on considère les résultats au test de student. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par les analyses de l'expression musculaire des gènes de Cpt1a, Cpt1b et Pgc1a et Acadl dans le muscle, où aucun de ces gènes ne présente d'augmentation d'expression dans les groupes supplémentés par rapport au groupe CTRL ou HF (*cf.* **Table 1A**). Une diminution de l'expression de la Cpt1a est même observée dans le groupe HF-E comparé au groupe HF. Dans le foie (*cf.* **Table 1B**), l'expression de Pgc1a est significativement augmentée dans les groupes HF et HF-E par rapport aux autres, tandis que l'expression de Pgc1b est augmentée dans tous les groupes HF supplémentés ou non *vs* CTRL. Dans ce même tissu, aucune différence d'expression génique de Cpt1a n'a été enregistrée.

### *Les oméga-3 réduisent l'accumulation hépatique de DG au profit des TG chez les souris sauvages*

Le contenu hépatique en DG tend à être augmenté par le régime HF non supplémenté ( $p=0,06$ ) comparé au groupe témoin (*cf.* **Figure 2A**). La supplémentation, quel que soit l' $\omega 3$ , réduit significativement le contenu en DG comparé au groupe HF non supplémenté. En revanche, cette baisse des DG intracellulaires s'accompagne d'une augmentation significative des TG dans les trois groupes supplémentés en  $\omega 3$  (*cf.* **Figure 2B**) par rapport aux groupes HF et CTRL. Au contraire, le régime HF seul a réduit significativement l'accumulation de TG par rapport au régime témoin.

### *L'activation de la PKC $\theta$ est augmentée dans le foie des souris ob/ob sous régime HF non supplémenté.*

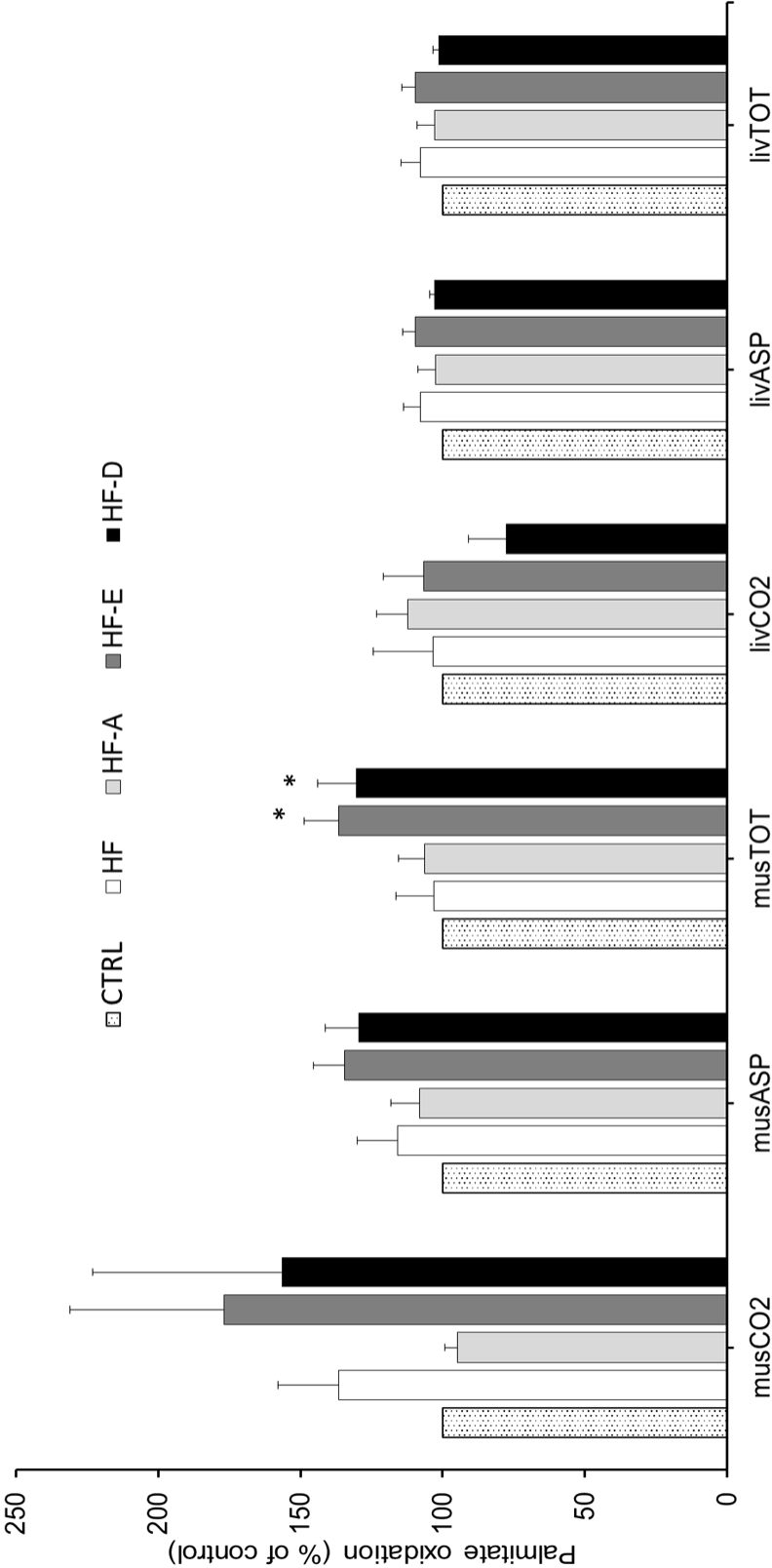
L'activation de la PKC $\theta$ , activable par l'accumulation intracellulaire de DG et de céramides a été analysée par quantification de sa phosphorylation dans le foie. Aucune différence intergroupe n'est observée chez les souris sauvages (*cf.* **Figure 3A**), tandis qu'une augmentation significative de l'activation de la kinase est observable chez les souris *ob/ob* sous régime HF non supplémenté par rapport aux souris sous régime CTRL (*cf.* **Figure 3B**).

Les suppléments en ALA et DHA ( $p < 0,05$ ), et dans une moindre mesure en EPA ( $p = 0,079$ ), réduisent l'activation de la kinase par comparaison au groupe HF.

## **Discussion**

Nous avons montrés que l'oxydation du palmitate n'était pas altérée dans le foie des souris sauvages, en cohérence avec l'expression des gènes impliqués dans celle-ci. Malgré une baisse des DG hépatiques, nous n'avons pas observé d'effet sur l'activation de la PKC $\theta$  chez la souris sauvage. L'obésité n'étant que modérée dans ce modèle, il semblerait que la perturbation du métabolisme musculaire et hépatique ne soit pas encore complètement installée, même si des altérations de l'homéostasie glucidique ont été retrouvées au niveau corps entier. Nous avons toutefois observé que l'oxydation musculaire du palmitate est améliorée dans les groupes supplémentés en EPA ou en DHA. Cet effet n'est cependant pas associé à une amélioration de l'expression des gènes du métabolisme oxydatif. Chez les souris *ob/ob*, l'obésité sévère pourrait, quant à elle, être accompagnée de désordres hépatiques et musculaires. C'est ce que semblerait démontrer l'augmentation de l'activation de la PKC $\theta$  dans le foie des souris HF par rapport aux autres. Il serait donc important d'effectuer des analyses complémentaires de dosages des DG et TG dans ce modèle ainsi que d'évaluer l'expression génique telle que nous l'avons fait dans le modèle d'obésité modérée pour confirmer cette hypothèse. Des différences de réponse aux régimes supplémentés ou non pourraient, peut-être, être mises en évidence. L'amélioration de la tolérance au glucose chez les souris *ob/ob* ayant reçu de l'EPA (*cf.* article précédent) pourrait suggérer des effets spécifiques chez ces souris.

En conclusion, nous avons pu voir que le tissu adipeux était altéré dans les deux modèles d'obésité mais qu'il était difficile d'observer des altérations hépatiques et musculaires marquées chez les souris sauvages présentant une obésité modérée. Il serait donc important d'approfondir les recherches chez les souris *ob/ob* pour caractériser l'effet de la supplémentation en  $\omega 3$  sur le métabolisme des lipides dans le muscle et dans le foie dans un contexte d'obésité sévère.



**Figure 1 :** Oxydation du 1-<sup>14</sup>C palmitate dans le muscle et le foie des souris C57BL/6J. Les histogrammes représentent la moyenne d’oxydation du palmitate en CO<sub>2</sub>, corps acido-solubles (*acide soluble products*, ASP), et la somme des deux (total, TOT) dans le muscle (mus) et dans le foie (*liver*, liv) des souris C57BL/6J après 16 semaines de régimes HF supplémentés ou non en ALA, EPA ou DHA (HF-A, HF-E et HF-D). Les données sont normalisées par rapport aux données obtenues dans le groupe CTRL. (n=4-6 expériences par groupes, en triplicats techniques). \*p<0.05 vs groupe témoin (t test).

**Table 1:** Expression génique dans le muscle (A) et dans le foie (B) des souris.

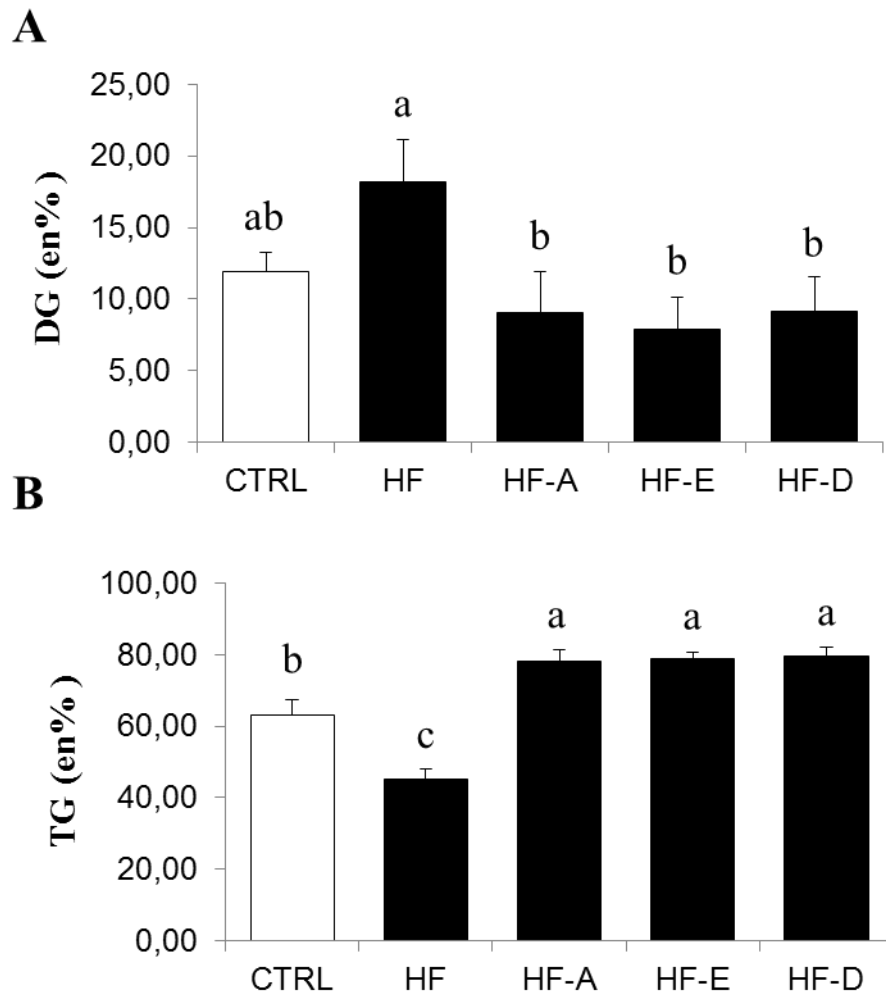
Les souris ont été nourries pendant 16 semaines avec un régime témoin (Control), HF ou HF supplémenté en ALA, EPA ou DHA (HF-A, HF-E, HF-D, respectivement). La quantification des ARNm a été réalisée avec la technologie Taqman en RT-PCR, et normalisée sur l'expression de la hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (Hprt). (n=7 et 6 dans le muscle et le foie respectivement). Différentes lettres indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ) à l'ANOVA suivie d'un test post hoc.

**A**

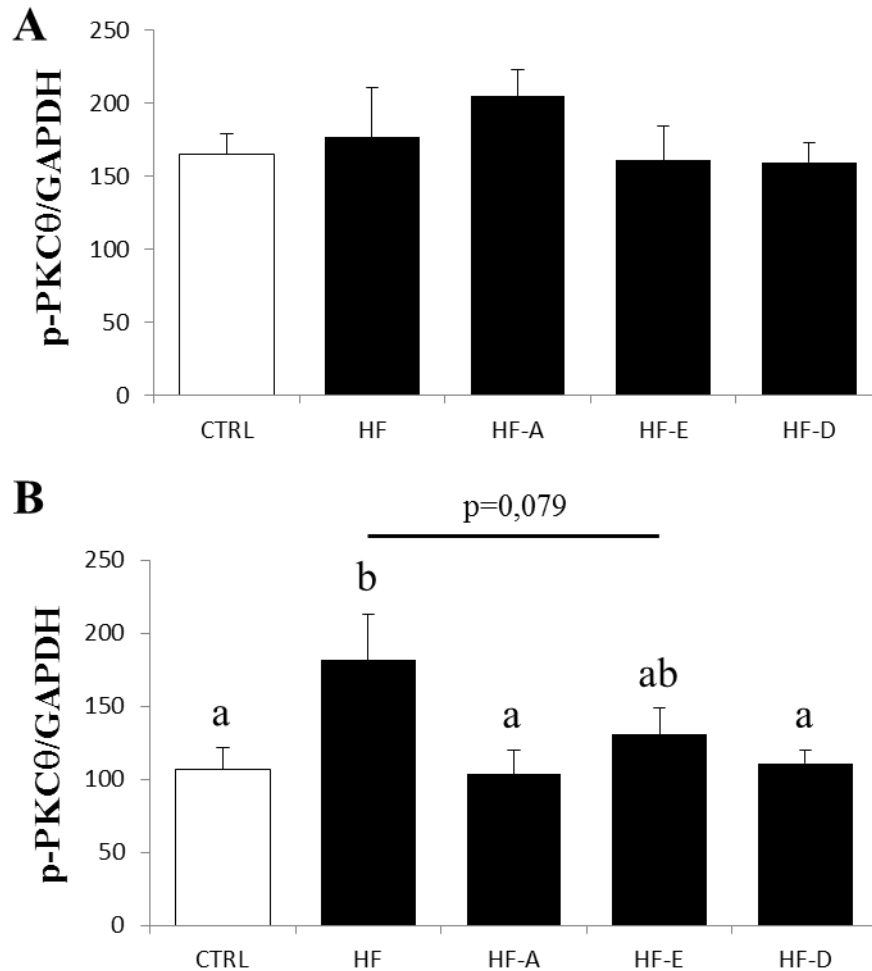
Gene symbol	Gene name	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
Acadl	acyl-Coenzyme A de hydrogenase, long-chain	0.80 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.95 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.06 <sup>a</sup>
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	0.9 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.09 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.07 <sup>ab</sup>
Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	0.88 ± 0.05	1.03 ± 0.1	0.95 ± 0.09	0.92 ± 0.06	1.01 ± 0.09
Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	1.06 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.09 <sup>ab</sup>

**B**

Gene symbol	Gene name	Control	HF	HF-A	HF-E	HF-D
Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	0.89 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.11 <sup>b</sup>
Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	0.80 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.28 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.77 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.21 <sup>ab</sup>
Cpt1a	camitine palmitoyltransferase 1a, liver	0.90 ± 0.05	0.84 ± 0.05	0.87 ± 0.09	1.07 ± 0.13 <sup>f</sup>	0.74 ± 0.06

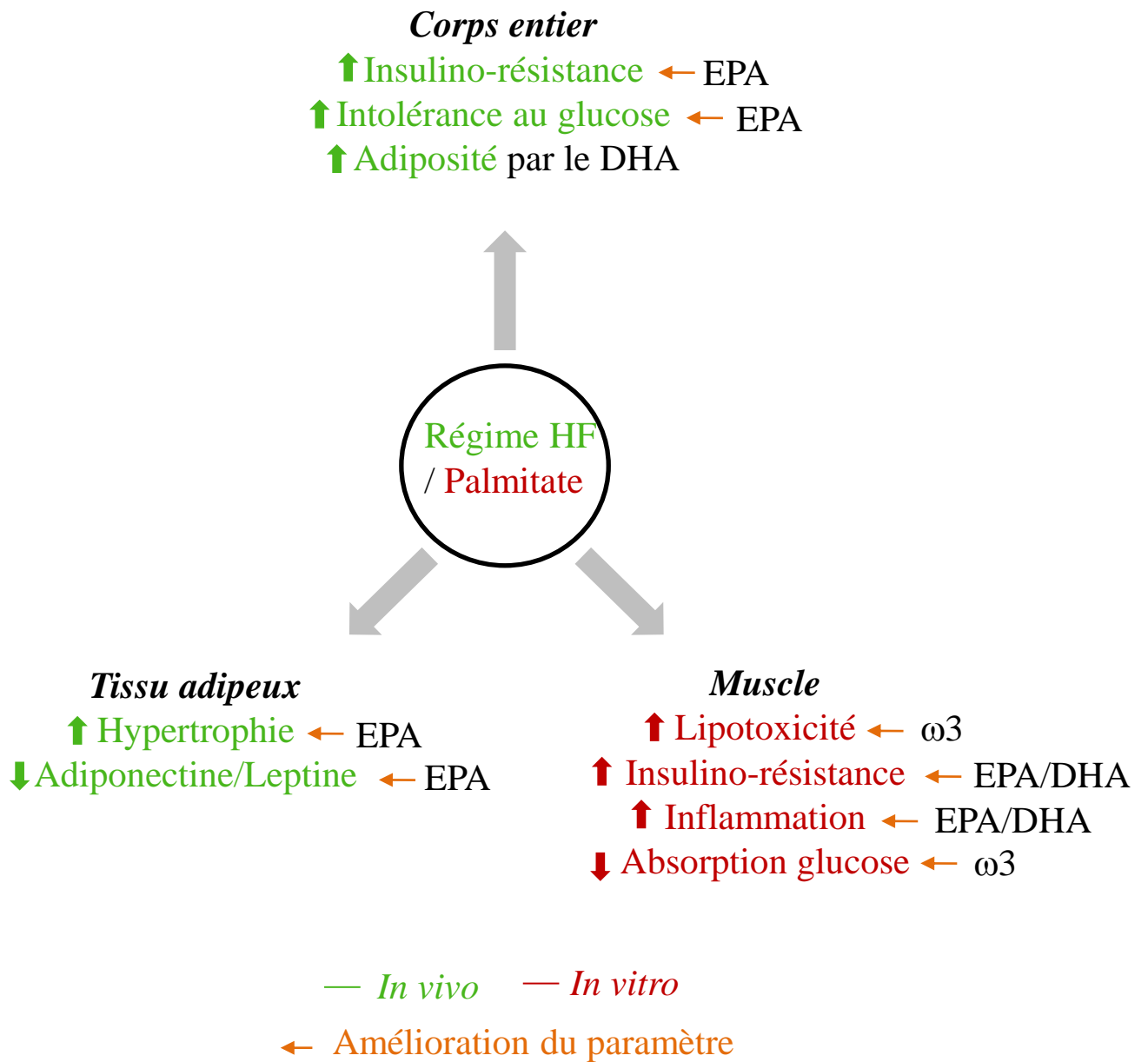


**Figure 2 :** Dosage hépatique des DG (**A**) et TG (**B**) intracellulaires. Après 16 semaines de régime témoin (CTRL), HF ou HF supplémenté en ALA, EPA ou DHA (HF-A, HF-E, HF-D, respectivement), une partie du foie des souris sauvages a été utilisée afin d'extraire les lipides et de quantifier les DG et TG par séparation en CCM et quantification à l'aide d'un kit enzymatique. Différentes lettres indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) à l'ANOVA suivie d'un test post hoc.



**Figure 3 :** Evaluation de l'activation de la PKCθ dans le foie. Les souris C57BL/6J (A) et *ob/ob* (B) ont été soumises à un régime témoin (CTRL), HF ou HF supplémenté en ALA, EPA ou DHA (HF-A, HF-E, HF-D, respectivement) pendant 16 et 5 semaines, respectivement. Au sacrifice, le foie des animaux a été prélevé pour extraire les protéines et pour quantifier l'activation de la PKCθ par phosphorylation. Différentes lettres indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) à l'ANOVA suivie d'un test post hoc.

*D*iscussion  
et perspectives



**Figure 29 : Schéma récapitulatif des principaux résultats**



## V. Discussion et perspectives

La lutte contre l'obésité et le syndrome métabolique est de première importance pour limiter l'incidence de certaines pathologies telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. L'excès de masse grasse provoque une élévation des taux d'AGNE circulants et une accumulation de métabolites lipidiques dans les tissus insulino-sensibles, perturbant ainsi le fonctionnement de ces derniers. Ce processus est plus communément nommé « lipotoxicité ». Afin de prévenir les perturbations métaboliques dans ces tissus, diverses données expérimentales et épidémiologiques ont suggéré que les acides gras  $\omega 3$  pourraient avoir un intérêt. Toutefois, très peu de travaux ont porté sur les effets propres des trois principaux  $\omega 3$  retrouvés dans notre alimentation, ALA, EPA et DHA. Nous apportons ici des réponses à cette question par l'étude des mécanismes *in vitro* dans un contexte de lipotoxicité et d'IR induites par le PAL, ainsi que par l'étude des effets propres de ces  $\omega 3$  dans un modèle *in vivo* afin d'apporter des éléments d'ordre plus physiologique.

Afin de discuter globalement les résultats de cette thèse (résumés dans la **figure 29**) et de proposer des pistes pour l'avenir, nous aborderons le travail effectué *in vitro* sur des cellules musculaires puis nous élargirons la discussion au modèle *in vivo* avant d'évoquer les limites de ce modèle et de proposer des perspectives à ce projet.

***Intérêts des  $\omega 3$  dans l'IR et le métabolisme des lipides des cellules musculaires.*** Le muscle squelettique est le principal contributeur à l'homéostasie glucidique en réponse à l'insuline. Il est maintenant bien établi que l'accumulation excessive de lipides dans ce tissu perturbe son métabolisme, et notamment sa capacité à répondre à l'insuline. Nous avons montré que les trois  $\omega 3$  étaient capables de restaurer l'absorption du glucose en condition d'IR induite par le PAL dans les cellules musculaires C2C12 en culture. Contrairement à l'ALA, l'EPA et le DHA ont permis une amélioration de l'activation de la voie de l'insuline. Des mécanismes encore mal connus pourraient être impliqués. Une diminution de l'expression du gène *Trb3* en présence d'EPA ou de DHA pourrait aussi participer à l'effet insulino-sensibilisant puisque la protéine TRB3 pourrait inhiber la voie de l'insuline (Du *et al.* 2003). Au contraire, l'ALA ne permet pas de réduire son expression et cette différence pourrait expliquer les effets différentiels entre l'ALA et les deux autres  $\omega 3$ . Il faudrait confirmer cette hypothèse en recherchant notamment à quantifier la protéine TRB3 dans nos conditions pour valider que l'expression génique reflète bien l'abondance de la protéine ou à travailler sur des modèles d'inactivation/surexpression ciblant cette protéine. Une étude, issue

de notre équipe, avait auparavant démontré un effet bénéfique du DHA sur l'IR induite par le PAL dans ce même modèle cellulaire (Capel *et al.* 2015). Nos résultats concernant l'ALA et l'EPA sont également en accord avec la littérature utilisant des conditions de culture très similaires (respectivement (Chen *et al.* 2015) et (Sawada *et al.* 2012)). Cet effet n'est cependant pas spécifique aux  $\omega 3$ , puisque l'AA, un AGPI  $\omega 6$  (Sawada *et al.* 2012) et l'OLE, un AGMI  $\omega 9$  (Coll *et al.* 2008) ont également un effet insulino-sensibilisant malgré l'induction de l'IR par le PAL.

L'originalité de notre travail sur cellules musculaires réside dans la description de l'effet de chaque  $\omega 3$  à une dose équivalente sur le métabolisme du PAL et de son orientation vers l'accumulation de DG et de céramides, ou vers l'oxydation. Cette orientation différentielle participerait à l'amélioration (ou non) de la sensibilité à l'insuline par détoxification cellulaire. Contrairement à l'EPA et au DHA, l'ALA a eu un effet plus modéré sur la baisse des DG et des TG et n'a pas amélioré significativement l'oxydation du PAL. Il pourrait être intéressant d'étudier le devenir des  $\omega 3$  dans le métabolisme musculaire des lipides en reproduisant une expérience similaire avec un marquage au  $^{14}\text{C}$  de ces 3 AG, tel que nous avons pu le faire pour le PAL. En suivant leur devenir, nous pourrions déterminer si l'oxydation des  $\omega 3$  est comparable à celle du PAL et si des différences peuvent être observées entre l'ALA, l'EPA et le DHA. Une étude au niveau cérébral chez la souris a montré que la formation de corps acido-solubles était 2,5 fois supérieure dans les cerveaux perfusés avec de l'EPA comparés à ceux perfusés avec du DHA, suggérant que l'EPA pourrait être oxydé en proportion importante (Chen *et al.* 2009). Une étude parue en 1997 a montré que l'ALA d'origine alimentaire serait oxydé à 84,9% (Cunnane and Anderson 1997), soit un taux de  $\beta$ -oxydation particulièrement important suggérant qu'il y a bien des différences dans le taux d'oxydation des  $\omega 3$ . Ces différences sont probablement très dépendantes du tissu considéré et du statut physiologique des individus (par exemple mince *vs.* obèse). Il serait également intéressant de s'attarder plus spécifiquement sur l'oxydation péroxysomale des AG à longue chaîne. La formation d'acylcarnitines spécifiques à celle-ci (glutaryl-carnitines et acylcarnitines dicarboxyliques) a été mise en évidence suite à la consommation d'un régime enrichi en huile de poisson comparativement à un régime riche en lard chez la souris (Fiamoncini *et al.* 2015). L'activation de la  $\omega$ -oxydation peroxysomale pourrait ainsi compléter l'action de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale afin de réduire l'accumulation des DG et des céramides intracellulaires, permettant indirectement une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

L'ALA n'étant pas capable de réduire l'activation de la p38MAPK induite par le PAL, nous avons exploré le rôle de cette kinase dans les perturbations métaboliques musculaires. L'activation de la p38MAPK par le PAL avait déjà été décrite auparavant mais aucune étude n'avait démontré l'importance de cette kinase dans la réponse inflammatoire induite par le PAL. Cette kinase ne semble pas impliquée dans l'IR induite par le PAL mais semblerait avoir un rôle important dans l'inflammation causée par ce dernier. Certains points restent toutefois à éclaircir à partir de nos résultats. Nous tentons actuellement de déterminer l'effet de l'inhibition de cette kinase sur des temps courts pour déterminer si elle pourrait être impliquée dans l'activation de la voie inflammatoire NF- $\kappa$ B. Pour cela, nous avons initié des expérimentations consistant à comparer l'effet du LPS, connu pour induire la voie NF- $\kappa$ B, et l'effet du PAL sur la dégradation de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  en présence ou non de SB203580. Nous aurons alors des éléments concernant l'implication de la p38MAPK dans l'effet inflammatoire du PAL à court terme et la possible interaction entre l'activation de la p38MAPK et la voie NF- $\kappa$ B.

***Intérêts des  $\omega$ 3 dans l'homéostasie glucidique chez la souris.*** Chez la souris, nous nous sommes intéressés à la supplémentation en  $\omega$ 3 afin de valider et de compléter le travail effectué *in vitro*. Nous avons considéré, à l'échelle de l'organisme, l'impact des  $\omega$ 3 sur l'homéostasie glucidique. Sur ce paramètre, l'EPA a été le plus efficace en maintenant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Grâce à cette supplémentation, l'homéostasie du glucose a également été préservée dans le modèle d'obésité sévère que représentent les souris *ob/ob* sous régime HF. Contrairement aux expériences *in vitro*, l'exploration de la sensibilité de la voie AKT n'a pas montré de résultats positifs. Nous avons toutefois observé une amélioration de l'oxydation totale du PAL dans le muscle squelettique avec les régimes enrichis en EPA et en DHA. Ce travail mériterait toutefois d'être confirmé, la variabilité interindividuelle et entre chaque série de mesures étant importante. *In vivo*, nous n'avons pas observé d'amélioration de l'insulino-sensibilité musculaire, évaluée par la mesure de l'activation d'AKT par l'insuline suite à la consommation des  $\omega$ 3 dans notre régime HF à 45% de l'énergie apportés sous forme de lipides. Dans notre étude, les souris ont reçu les  $\omega$ 3 à hauteur de 2% de l'AET. Or nous avons précédemment observé que le DHA à 2% de l'AET améliore l'activation de la protéine AKT chez la souris LDLR-/- dans des conditions d'induction de troubles métaboliques mais avec un apport lipidique bien inférieur (Capel *et al.* 2015). La part plus importante de lipides totaux et la richesse en sucrose (17 % de l'énergie)

dans notre régime HF pourraient avoir participé à une moindre efficacité de la supplémentation en  $\omega 3$  et expliquer que nous n'ayons pas observé d'amélioration au niveau musculaire. Cependant, une étude de Poudyal *et al.* a montré des effets positifs d'une supplémentation en ALA, EPA ou DHA sur l'insulino-sensibilité au niveau corps entier lors d'un régime HF à 50% de l'AET sous forme de lipides (Poudyal *et al.* 2012). Mais cette étude ne s'est pas intéressée à la sensibilité à l'insuline dans les tissus. Le modèle d'étude (le rat) et la durée du régime (8 semaines), le mode d'apport des  $\omega 3$  (huiles enrichies, mais non pures) pourraient expliquer les différences observées avec notre étude chez la souris pendant 16 semaines. Lors de l'apparition de l'obésité et des perturbations métaboliques, le muscle est le tissu insulino-sensible le plus tardivement touché par l'IR (Kraegen *et al.* 1991), une durée d'intervention prolongée ou un régime particulièrement drastique pourraient donc être nécessaires pour observer une IR musculaire, comme par exemple un régime à 60% de l'AET sous forme de lipides.

***Impact des  $\omega 3$  sur le développement adipocytaire et le TA épидidymal.*** Les informations disponibles dans la littérature convergent vers un rôle majeur du TA viscéral dans l'apparition des désordres métaboliques. Nous avons donc souhaité comparer les effets des  $\omega 3$  sur le développement et le fonctionnement du TAE de nos souris. Ainsi, nous avons observé que les  $\omega 3$  ont des effets distincts sur la taille des adipocytes tandis que la différenciation des cellules 3T3-L1 *in vitro* est favorisée par le DHA. En effet, le DHA s'est distingué des autres  $\omega 3$  par un effet pro-adipogénique. Aucune étude actuellement disponible n'a observé un tel effet. A titre de comparaison, nous n'aurions peut-être pas observé cet effet à 6-8 semaines de régime dans nos conditions, car les souris sous DHA présentaient un poids quasi identique au groupe témoin à cette période. Une analyse de la composition corporelle à ce stade aurait pu nous permettre de déterminer si, à cette période, les souris sous DHA présentaient déjà une masse adipeuse plus importante.

Nos résultats suggèrent que l'ALA et l'EPA pourraient favoriser l'expression des gènes de la lipolyse. De plus, l'EPA limite l'expression génique de PPAR $\gamma$  impliqué dans l'adipogenèse. Une exploration fonctionnelle serait maintenant nécessaire pour caractériser les effets spécifiques de l'ALA, de l'EPA et du DHA. Il serait donc intéressant d'étudier la lipolyse dans le modèle *in vitro* des 3T3-L1. Une concentration de 50 à 200 $\mu$ M de DHA induit une augmentation de la lipolyse dans des cellules 3T3-L1 (Kim *et al.* 2006). Or, une réduction partielle de la lipolyse chez la souris LHS<sup>+/-</sup> améliore la sensibilité à l'insuline et



favorise la lipogenèse *de novo* et l'absorption de glucose par le TA (Girousse *et al.* 2013). Les effets de l'ALA et de l'EPA sur la lipolyse n'ont pas été étudiés. Pour répondre à nos objectifs il serait donc judicieux de prévoir une comparaison entre 50µM de PAL, d'ALA, d'EPA et de DHA. Tandis que la lipolyse participerait à la régulation de la taille des adipocytes, l'apoptose des adipocytes serait, quant à elle, un moyen de contrôler le nombre d'adipocytes matures. Encore une fois, Kim *et al.* ont étudié l'effet du DHA uniquement et ont rapporté que celui-ci induisait une augmentation de l'apoptose dès 24h d'incubation à 200µM et après 48h à la concentration de 100µM de DHA. Une autre étude a observé des effets similaires avec 250µM de DHA ou d'EPA dans des pré-adipocytes humains en culture (Hanada *et al.* 2011). Aucune donnée sur l'ALA et l'apoptose des pré-adipocytes n'a été rapportée. Il serait donc important d'étudier les effets de l'ALA, de l'EPA ou du DHA à concentrations physiologiques variables (50, 100 et 200µM par exemple) sur l'apoptose des préadipocytes pour caractériser les effets de l'ALA et les comparer à ceux de l'EPA et du DHA.

Comme décrit dans la partie bibliographie, le TA est capable de moduler le métabolisme musculaire notamment *via* la sécrétion de cytokines et le relargage d'AGNE. Il paraît donc intéressant d'imaginer une étude *in vitro* de milieux conditionnés d'adipocytes préalablement traités ou de mettre en co-culture des adipocytes matures et des myotubes en présence de différents acides gras (OLE, PAL, ALA, EPA, DPA ou DHA) pour étudier plus finement l'impact qu'ont les sécrétions adipocytaires sur le métabolisme des cellules musculaires. Ces méthodes sont en cours de développement au laboratoire. Elles n'ont encore jamais été utilisées pour étudier l'effet des  $\omega$ 3 sur la relation adipocyte/muscle.

Dans le prolongement de cette approche *in vivo*, nous avons également initié une étude des effets préventifs de l'EPA sur l'obésité et l'IR sur trois générations de souris (*cf.* **Figure 30**). L'objectif est d'évaluer l'importance de la nutrition lipidique, au cours du développement fœtal et durant les premiers mois de vie, sur la prédisposition des souris et de leurs descendants à l'obésité. Dans la littérature, un régime maternel enrichi en ALA, en EPA ou en DHA durant la gestation et la lactation a favorisé une réduction de l'IR chez les descendants F1 à l'âge de 3 semaines (Shomonov-Wagner *et al.* 2015). Une autre étude sur la déficience d'un régime en  $\omega$ 3 (ALA à 0.16% de l'AET) a montré que les descendants de génération F3 présentaient une obésité accrue comparés à leurs homologues nourris sous régime à 1% d'ALA (Hanbauer *et al.* 2009). Nous avons donc soumis des souris femelles sur trois générations (F0, F1 et F2) à un régime témoin (1% du poids du régime en huile de tournesol

oléique) ou enrichi en EPA (1% du poids du régime) avant et pendant leur mise en reproduction (avec des mâles de même génération et soumis au même régime que les femelles sélectionnées), ainsi que pendant la gestation et l'allaitement. Nous avons émis l'hypothèse que les souris sous régime enrichi en EPA seraient plus résistantes à une diète obésogène à l'âge adulte, même si aucune étude équivalente n'a été réalisée à l'heure actuelle. Ainsi, des descendants mâles (F1, F2 ou F3) sont ensuite nourris avec une diète HF (sans supplémentation) ou avec un régime à teneur normale en lipides (*low fat*, LF non supplémenté) pendant 3 mois. Une analyse de la composition corporelle est planifiée après le sevrage, ainsi qu'après un et trois mois de challenge HF en même temps que des tests de tolérance à l'insuline et au glucose. La consommation et le poids des souris sont suivis tout le long de l'expérimentation, du sevrage au sacrifice. Une fois le protocole terminé, les données recueillies (poids, composition corporelle, tolérance à l'insuline et au glucose) pourront être analysées et des données complémentaires pourront être obtenues par l'analyse des foies, TAe, muscles (*gastrocnemius* et *quadriceps*) et plasmas récupérés au sacrifice des animaux.

***Rôle du foie et impact des  $\omega 3$  sur son métabolisme en situation d'IR.*** Parmi les tissus insulino-sensibles, le foie joue également un rôle important dans l'homéostasie glucidique et lipidique. En conditions physiologiques, le foie contribue au stockage du glucose en glycogène, à la redistribution de glucose dans l'organisme lors du jeûne et à la captation et la redistribution des lipides. Suite à l'observation d'une amélioration de l'homéostasie glucidique et de l'absence d'effet de l'EPA sur la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire, nous avons voulu étudié l'activation d'AKT par l'insuline dans le foie. Une amélioration de son activation a été observée dans le foie des souris sauvages et *ob/ob* sous régime enrichi en EPA uniquement. Ces résultats sont encourageants mais ne suffisent pas à affirmer l'implication du foie. Les données d'expression des gènes du métabolisme du glucose et du glycérol suggèrent des effets dans ce tissu qui mériteraient d'être élucidés. Il serait donc intéressant d'utiliser une même approche transversale (culture *in vitro* d'hépatocytes et analyse en profondeur de l'effet d'un régime HF sur le métabolisme hépatique *in vivo*) pour étudier les mécanismes impliqués dans l'IR induite par l'obésité dans ce tissu. Ainsi, nous serions capables de comprendre quels mécanismes sont impliqués. Globalement, les perturbations de la voie de l'insuline et du métabolisme des lipides sont très similaires à celles observées dans le muscle au cours de l'obésité. Ainsi, lorsque l'afflux de lipides est trop élevée, les capacités métaboliques du foie sont dépassées et les DG et les céramides

s'accumulent (Samuel and Shulman 2012). Cette accumulation de DG semble secondaire à une augmentation de l'activité DGAT2 et de la synthèse des TG, la surexpression de la DGAT2 induisant une augmentation des TG mais n'étant pas suffisante pour induire une moindre accumulation de DG hépatiques (Jornayvaz *et al.* 2011). Ces DG peuvent activer les PKC et induire une inhibition du signal de l'insuline au niveau de son récepteur (Samuel *et al.* 2004; Jornayvaz and Shulman 2012). L'insuline n'est donc plus en mesure d'inhiber la production *de novo* du glucose (Boden *et al.* 2001) et la glycémie devrait alors augmenter. Nos résultats chez les souris C57BL/6 et *ob/ob* convergent vers une meilleure phosphorylation d'AKT dans le foie lors de la supplémentation en EPA tandis que tous les  $\omega 3$  permettent une réduction des DG intracellulaires au profit de l'accumulation de TG, moins délétères. Contrairement à nos observations, une étude a démontré que la supplémentation en DHA chez des souris *db/db* limite fortement l'accumulation hépatique de TG en comparaison avec des souris non supplémentées (Gotoh *et al.* 2009). Cette même étude a montré que l'EPA n'avait pas d'effet significatif (Gotoh *et al.* 2009). Chez le rat, l'EPA et le DHA ont eu un effet supérieur à l'ALA sur la réduction du contenu hépatique en TG (Ikeda *et al.* 1998), qui serait liée à une diminution de l'activité de la FAS, impliquée dans la lipogenèse. L'oxydation mitochondriale des lipides pourrait aussi jouer un rôle dans la détoxification lipidique du foie. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de la supplémentation en  $\omega 3$  sur la  $\beta$ -oxydation hépatique *ex vivo*. Dans la littérature, seule la supplémentation en EPA favorise l'expression et l'activité des CPT mitochondriales lors un régime normo-lipidique chez le rat (Ikeda *et al.* 1998). L'expression et l'activité de la CACT, impliquée dans le transfert des acyl-CoA vers la matrice mitochondriale, sont augmentées dans le foie de rats recevant un régime riche en l'huile de poisson comparées à celles de rats sous régime enrichi en huile d'olive (riche en acides gras  $\omega 9$ ) (Priore *et al.* 2012). L'EPA étant un meilleur activateur de PPAR $\alpha$  que le DHA (Pawar and Jump 2003), la présence d'un élément de réponse à ce récepteur nucléaire (impliqué dans la  $\beta$ -oxydation) dans le promoteur du gène de la CACT, pourrait expliquer l'effet préférentiel de l'EPA dans notre étude. Toutefois, la supplémentation en DHA pourrait indirectement aboutir à l'activation de PPAR $\alpha$ , par la rétro-conversion du DHA en EPA (Arterburn *et al.* 2006). L'importance du foie dans les adaptations métaboliques observées dans notre étude murine n'est donc pas négligeable et des analyses complémentaires auraient pu nous éclairer sur les effets distincts de l'ALA, de l'EPA et du DHA. Nous avons montré que le phénomène de rétroconversion se produit dans le foie. Néanmoins, les teneurs en EPA



Species	Weight (kg)	BSA (m <sup>2</sup> )	K <sub>m</sub> factor
Human			
Adult	60	1.6	37
Child	20	0.8	25
Baboon	12	0.6	20
Dog	10	0.5	20
Monkey	3	0.24	12
Rabbit	1.8	0.15	12
Guinea pig	0.4	0.05	8
Rat	0.15	0.025	6
Hamster	0.08	0.02	5
Mouse	0.02	0.007	3

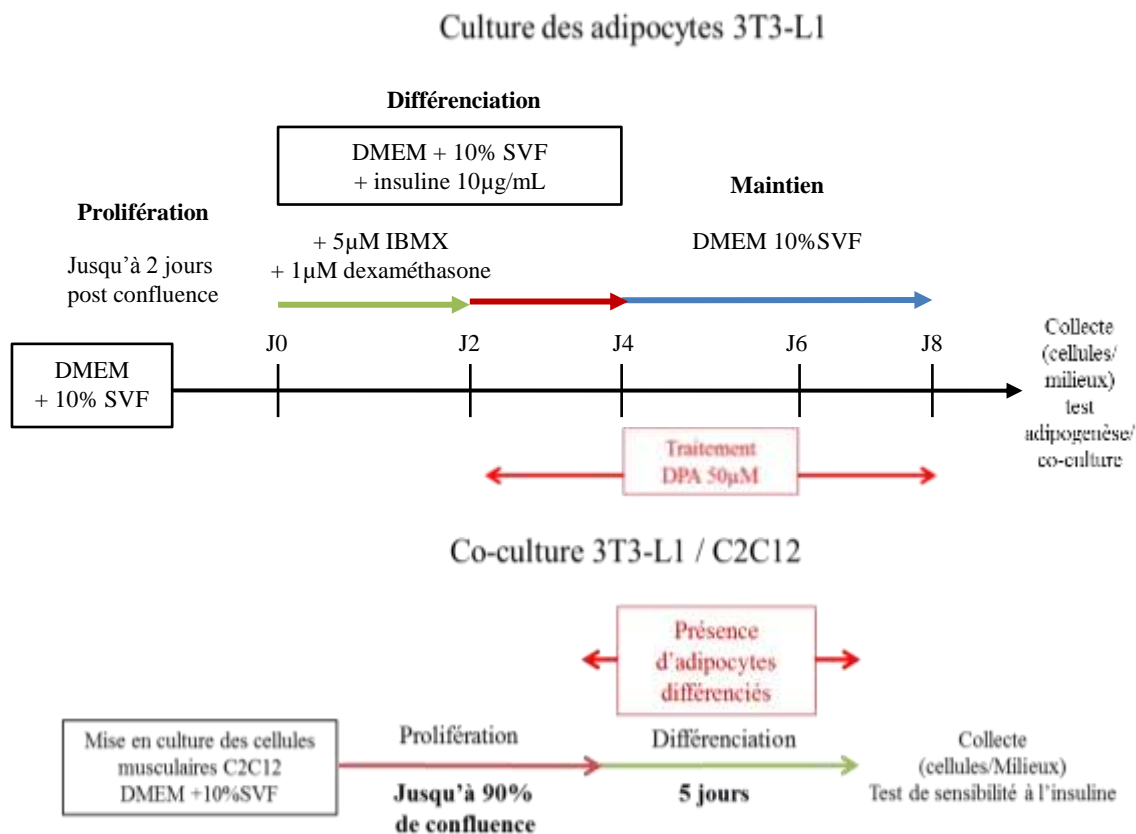
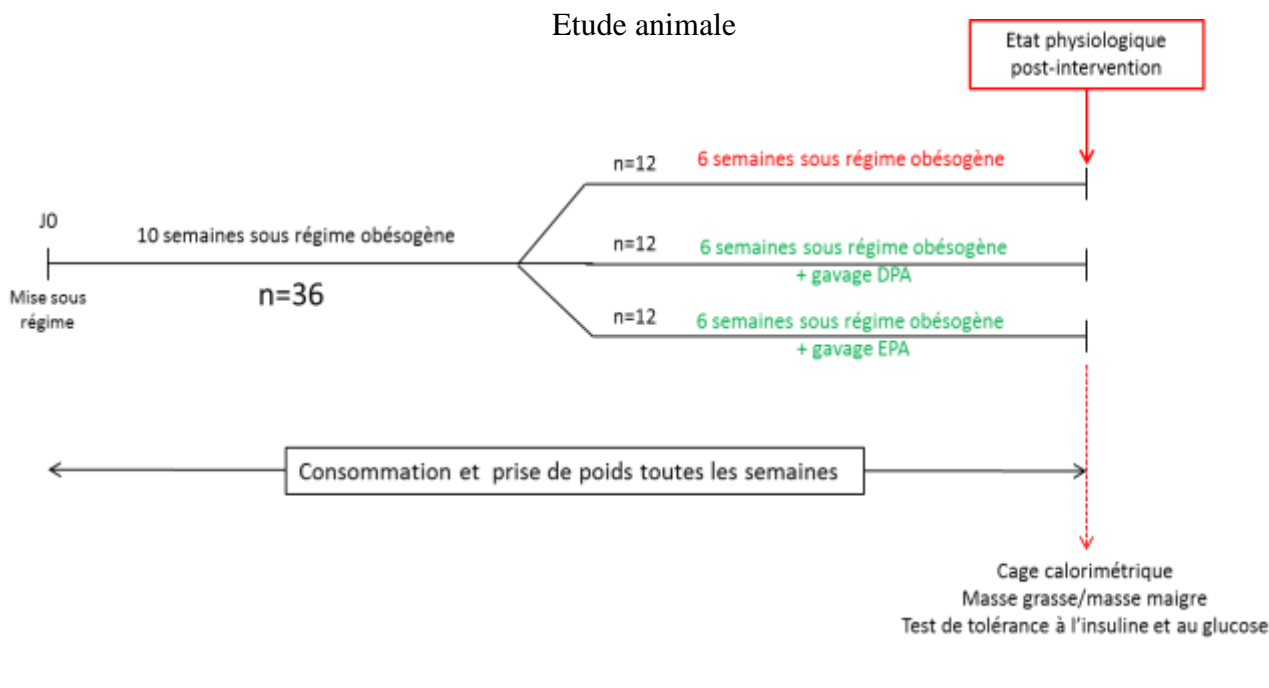
Formula for Dose Translation Based on BSA
$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by } \frac{\text{Animal } K_m}{\text{Human } K_m}$

Reagan-Shaw, FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology , 2008  
 BSA: Body surface area; HED: Human equivalent dose

**Figure 31 : Extrapolation d'une dose utilisée chez l'animal à l'Homme**

observées sont nettement inférieures sous l'effet de la rétroconversion par rapport à la supplémentation alimentaire en EPA.

**Effet de la composition du régime alimentaire des animaux.** Pour discuter plus amplement des différences entre nos résultats et la littérature, il est important de s'intéresser à la composition des régimes administrés aux animaux dans les différentes études. Comme dans les études antérieures évoquées dans les paragraphes 5.4. et 5.5., les apports en  $\omega 3$  sont de compositions (huile de poisson, graines et huiles de lin et de chia, EPA, ALA ou DHA seuls) et de concentrations diverses. Il est donc tout à fait possible que ces éléments aient une influence sur les effets observés. La dose que nous avons choisie (2% de l'AET, soit 0.8 à 1,0 g.kg<sup>-1</sup>) correspondrait à une supplémentation chez l'Homme d'environ 4 à 5 g.j<sup>-1</sup> pour un individu de 60kg. Cette correspondance de dose tient compte de la différence de métabolisme entre la souris et l'Homme et s'appuie sur la surface corporelle plutôt que sur le poids de l'individu pour extrapoler la dose utilisée chez l'animal (Reagan-Shaw *et al.* 2008) (*cf.* **Figure 31**). Sachant que les ANC préconisent 1.8 g.j<sup>-1</sup> d'ALA et 500mg.j<sup>-1</sup> d'EPA et de DHA, cette dose est déjà très élevée. Elle n'est pas pour autant incohérente avec les doses utilisées dans certaines études cliniques. Pourtant, les suppléments utilisés dans les autres études disponibles dans la littérature peuvent être encore plus conséquentes, atteignant jusqu'à 140 g/kg chez le rat (Peyron-Caso *et al.* 2003), soit 28 g.kg<sup>-1</sup> d' $\omega 3$  (= 4,5 g.kg<sup>-1</sup> ou 27 g.j<sup>-1</sup> chez l'Homme) ou même 80 g.kg<sup>-1</sup> d'huile de poisson soit 16 g.kg<sup>-1</sup> d' $\omega 3$  dans l'étude de Mori *et al.* (Mori *et al.* 2007) chez la souris (= 1,2 g.kg<sup>-1</sup> ou 78 g.j<sup>-1</sup> chez l'Homme). L'effet dose-réponse avec les  $\omega 3$  n'est pas forcément linéaire, si l'on en croit des résultats obtenus sur des paramètres impliqués dans les maladies cardiovasculaires notamment (Calzada *et al.* 2010). En effet, les auteurs ont montré que les doses de 200 à 800 mg.j<sup>-1</sup> de DHA avaient des effets positifs sur la concentration en tocophérol dans les LDL alors qu'une supplémentation à 1600 mg.j<sup>-1</sup> n'avait pas d'effet (Calzada *et al.* 2010). Bien que cela soit difficile à démontrer, ceci pourrait donc expliquer les différences entre notre étude et la littérature sur les différents paramètres mesurés. L'apport sous forme d'AGNE dans l'alimentation des animaux pourrait aussi avoir eu une influence, puisqu'il a été démontré qu'un apport sous forme de PL était beaucoup plus favorable à une baisse de la cellularité du TAe que sous la forme de TG dans un régime HF relativement modéré (20% de l'AET) (Awada *et al.* 2013). Notre objectif était d'observer les effets spécifiques de chaque  $\omega 3$ , ce qui nous a contraints à apporter les  $\omega 3$  sous



DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine; SVF: Serum de veau foetal

**Figure 32 : Protocoles expérimentaux d'étude du DPA**

forme d'huile purifiée. Nous avons néanmoins pu observer une très bonne incorporation des AG dans les hématies, le plasma et les différents tissus.

**Limite du modèle *in vivo* choisi.** Comme tout modèle, celui que nous avons choisi a ses limites. Dans notre étude chez la souris C57BL/6, il est important de souligner que les régimes témoins et HF ne sont pas exempt d' $\omega 3$ , l'ALA représentant 4,49% des AG totaux dans le régime témoin, tandis que 1,49% sont retrouvés dans le régime HF non supplémenté. Ceci pourrait donc partiellement expliquer que la supplémentation en ALA n'ait pas eu d'effet net sur les paramètres mesurés, puisqu'il est le seul  $\omega 3$  à être présent dans ces deux régimes. Le rapport  $\omega 6/\omega 3$  dans le régime reste toutefois bien moins favorable dans le régime HF seul (14,80) que dans les régimes témoin, ALA, EPA et DHA (8,36 ; 2,64 ; 3,71 et 4,43 ; respectivement).

**Rôle du DPA dans l'effet protecteur de l'EPA sur l'IR.** Nous avons pu constater que les souris sauvages nourries avec le régime enrichi en EPA étaient les seules à présenter une augmentation très forte des taux de DPA dans les membranes et les lipides neutres des tissus et du plasma. L'ALA a eu un effet notable, mais bien moins franc. Cette observation n'est pas surprenante, la désaturation du DPA en DHA est une étape limitante de la production de DHA par l'organisme. Or, c'est justement le régime enrichi en EPA qui a eu les effets les plus positifs sur l'IR. Selon une méthodologie proche de celles développées dans ce projet, nous avons réfléchi à une perspective d'étude concernant le DPA qui ferait intervenir deux volets complémentaires : une étude *in vivo* chez la souris et une étude *in vitro* dans les adipocytes 3T3-L1 et les cellules musculaires C2C12 dont les protocoles expérimentaux sont présentés en **figure 32**. Les éléments novateurs par rapport à ce que nous avons déjà réalisés sont les suivants : le DPA serait étudié en tant que supplémentation chez la souris déjà obèse, les souris ayant été soumises au régime HF durant 10 semaines avant la supplémentation. Nous comparerions les effets du DPA par rapport à l'EPA et au régime HF seul durant 6 semaines supplémentaires. Le choix de la méthode du gavage permettrait de contrôler l'apport en DPA. Quant à la dose de 0,5% de l'AET, elle limiterait au maximum le gaspillage et serait aussi plus proche des recommandations chez l'Homme. Suite à cette supplémentation, le foie, le TA épидidymal et le muscle seraient prélevés pour explorer la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des lipides comme nous l'avons fait ici avec toutefois une exploration plus poussée dans le foie. La culture des adipocytes 3T3-L1 serait le point de départ de l'étude *in*

*in vitro*. Ces cellules seraient soumises à un traitement au DPA à 50 $\mu$ M dès la mise en différenciation des préadipocytes. Ce traitement serait comparé à un traitement à l'acide oléique, connu pour son effet pro-adipogénique et à un traitement à l'EPA comme contrôle positif. Après différenciation et maintien en culture, les cellules 3T3-L1 différenciées seront alors soumises à un test d'adipogenèse ou mises en co-culture sur des cellules musculaires C2C12 lors de la mise en différenciation de ces dernières. Les sécrétions adipocytaires devraient influencer la différenciation et la sensibilité à l'insuline des cellules C2C12 lors du test de sensibilité à l'insuline, et de manière différentielle selon le traitement préalable au DPA, à l'EPA ou à l'OLE.

**Rôle des dérivés oxygénés des  $\omega$ 3.** Comme constaté (cf. **Figure 29**), les  $\omega$ 3 ont des effets multiples et cette complexité d'action est décuplée si l'on considère les nombreux dérivés oxygénés issues de l'oxydation par voie enzymatique ou non. Les études disponibles dans la littérature ont apporté quelques éléments de réponse concernant les effets des résolvines et des protectines sur l'IR induite par l'obésité. Ainsi, des souris *ob/ob* sous régime HF contenant 6% des lipides sous forme d' $\omega$ 3 présentent une augmentation de la concentration intracellulaire en protectine D1 et resolvine D1, associée à une augmentation de l'expression des gènes d'IRS-1 et de GLUT4 pouvant induire une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Gonzalez-Periz *et al.* 2009). La concentration musculaire et adipocytaire en protectine D1 est également augmentée chez des souris *fat-1* hétérozygotes. Sous régime HF, ces souris présentent une moindre infiltration de macrophages dans le TA et une restauration de la phosphorylation d'AKT dans le foie et le muscle comparativement aux souris sauvages sous le même régime (White *et al.* 2010). Ceci démontre que les dérivés oxygénés du DHA tels que la protectine D1 pourrait limiter l'IR et l'inflammation musculaires et confirmerait l'intérêt de la supplémentation en  $\omega$ 3. De la même manière, l'infusion de protectine DX en simultané avec des lipides réduit l'IR et augmente l'activation de l'AMPK dans les muscles de souris C57BL/6, favorisant ainsi la régulation de l'homéostasie glucidique corps entier (White *et al.* 2014). Chez des souris *db/db* déficientes en récepteur à la leptine, une injection de 2 $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> de resolvine D1 pendant 16 jours a limité l'IR dans le TA. Le TA de souris injectées avec la resolvine D1 est plus sensible à la phosphorylation d'AKT et a un profil moins inflammatoire que le TA de souris témoins (Hellmann *et al.* 2011). Des hépatocytes en culture traités avec 10nM de resolvine D1 et 150 $\mu$ M de PAL accumulent moins de lipides que des hépatocytes traités uniquement avec du

PAL (Jung *et al.* 2014). Les résolvines et protectines dérivant des  $\omega 3$  semblent donc avoir un effet protecteur vis-à-vis des perturbations métaboliques liées à l'obésité et limiteraient la lipotoxicité aussi bien dans le muscle que dans le TA ou le foie. Il faut toutefois rester prudents, car ces composés dérivent uniquement du DHA et ne représentent qu'une infime partie des dérivés oxygénés des  $\omega 3$ . Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier les dérivés les plus actifs et quelle source (ALA, EPA ou DHA) serait la plus intéressante pour lutter contre l'IR induite par un régime HF.

## VI. Conclusion

Pour conclure, nos résultats ont montré que les  $\omega 3$  ont des effets distincts sur l'IR et le métabolisme des lipides. L'EPA et le DHA améliorent nettement le métabolisme des cellules musculaires, tandis que seul l'EPA permet une amélioration de la sensibilité à l'insuline *in vivo* chez la souris. Dans ce même modèle, l'EPA réduit l'expansion du TA contrairement au DHA favorise l'hyperplasie et l'hypertrophie du tissu. Il semblerait que cet effet différentiel soit dû à une augmentation de la différenciation des cellules adipocytaires en présence de DHA. Le foie pourrait également être une cible importante des  $\omega 3$  pour améliorer l'IR induite en situation d'obésité. Des données supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces différentes observations.

## Références bibliographiques

- Aas, V., M. H. Rokling-Andersen, E. T. Kase, G. H. Thoresen and A. C. Rustan (2006). "Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells." *Journal of lipid research* **47**(2): 366-374.
- Abedi, E. and M. A. Sahari (2014). "Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties." *Food Sci Nutr* **2**(5): 443-463.
- Adams, R. H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein and A. R. Nebreda (2000). "Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development." *Mol Cell* **6**(1): 109-116.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, S. C. Smith, Jr., E. International Diabetes Federation Task Force on, Prevention, L. National Heart, I. Blood, A. American Heart, F. World Heart, S. International Atherosclerosis and O. International Association for the Study of (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* **120**(16): 1640-1645.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* **7**(4): 261-269.
- Allister, C. A., L. F. Liu, C. A. Lamendola, C. M. Craig, S. W. Cushman, M. K. Hellerstein and T. L. McLaughlin (2015). "In vivo 2H2O administration reveals impaired triglyceride storage in adipose tissue of insulin-resistant humans." *Journal of lipid research* **56**(2): 435-439.
- Alsaleh, A., Z. Maniou, F. J. Lewis, W. L. Hall, T. A. Sanders and S. D. O'Dell (2014). "ELOVL2 gene polymorphisms are associated with increases in plasma eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid proportions after fish oil supplement." *Genes & nutrition* **9**(1): 362.
- Altintas, M. M., A. Azad, B. Nayer, G. Contreras, J. Zaias, C. Faul, J. Reiser and A. Nayer (2011). "Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice." *Journal of lipid research* **52**(3): 480-488.
- ANSES (2009). "Synthèse de l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007." 36.
- ANSES (2011). "Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras." *Rapport d'expertise collective*: 20-30.
- Arimura, N., T. Horiba, M. Imagawa, M. Shimizu and R. Sato (2004). "The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes." *The Journal of biological chemistry* **279**(11): 10070-10076.
- Arner, P., S. Bernard, M. Salehpour, G. Possnert, J. Liebl, P. Steier, B. A. Buchholz, M. Eriksson, E. Arner, H. Hauner, T. Skurk, M. Ryden, K. N. Frayn and K. L. Spalding (2011). "Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease." *Nature* **478**(7367): 110-113.
- Aron-Wisniewsky, J., J. Tordjman, C. Poitou, F. Darakhshan, D. Hugol, A. Basdevant, A. Aissat, M. Guerre-Millo and K. Clement (2009). "Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**(11): 4619-4623.



- Arterburn, L. M., E. B. Hall and H. Oken (2006). "Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans." The American journal of clinical nutrition **83**(6 Suppl): 1467S-1476S.
- Asif, M. (2011). "Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: Perilla frutescens is a good example of plant oils." Orient Pharm Exp Med **11**((1)): 51–59.
- Avram, A. S., M. M. Avram and W. D. James (2005). "Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue." J Am Acad Dermatol **53**(4): 671-683.
- Awada, M., A. Meynier, C. O. Soulage, L. Hadji, A. Geloën, M. Viau, L. Ribourg, B. Benoit, C. Debard, M. Guichardant, M. Lagarde, C. Genot and M. C. Michalski (2013). "n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice." Nutrition & metabolism **10**(1): 23.
- Badin, P. M., D. Langin and C. Moro (2013). "Dynamics of skeletal muscle lipid pools." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **24**(12): 607-615.
- Badran, M., N. Ayas and I. Laher (2014). "Insights into obstructive sleep apnea research." Sleep Med **15**(5): 485-495.
- Bae, S. S., H. Cho, J. Mu and M. J. Birnbaum (2003). "Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B." The Journal of biological chemistry **278**(49): 49530-49536.
- Balk, E. M., A. H. Lichtenstein, M. Chung, B. Kupelnick, P. Chew and J. Lau (2006). "Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review." Atherosclerosis **189**(1): 19-30.
- Balvers, M. G., K. C. Verhoeckx, P. Plastina, H. M. Wortelboer, J. Meijerink and R. F. Witkamp (2010). "Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid are converted by 3T3-L1 adipocytes to N-acyl ethanolamines with anti-inflammatory properties." Biochimica et biophysica acta **1801**(10): 1107-1114.
- Bandyopadhyay, G., M. L. Standaert, L. Galloway, J. Moscat and R. V. Farese (1997). "Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes." Endocrinology **138**(11): 4721-4731.
- Bandyopadhyay, G. K., J. G. Yu, J. Ofrecio and J. M. Olefsky (2006). "Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects." Diabetes **55**(8): 2277-2285.
- Barma, P., S. Bhattacharya, A. Bhattacharya, R. Kundu, S. Dasgupta, A. Biswas and S. S. Roy (2009). "Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance." Biochimica et biophysica acta **1792**(3): 190-200.
- Baron, A. D., G. Brechtel, P. Wallace and S. V. Edelman (1988). "Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans." The American journal of physiology **255**(6 Pt 1): E769-774.
- Barouki, R. (2013). "Interaction between environmental pollutants and obesity." Cahier de Nutrition et de Diététique **48**: 123-128.
- Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." Nat Rev Endocrinol **10**(1): 24-36.
- Belchior, T., V. A. Paschoal, J. Magdalon, P. Chimin, T. M. Farias, A. B. Chaves-Filho, R. Gorjao, P. St-Pierre, S. Miyamoto, J. X. Kang, Y. Deshaies, A. Marette and W. Festuccia (2015). "Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation through PPARgamma dependent and independent actions." Molecular nutrition & food research.

- Bell, J. A., M. A. Reed, L. A. Consitt, O. J. Martin, K. R. Haynie, M. W. Hulver, D. M. Muoio and G. L. Dohm (2010). "Lipid partitioning incomplete FA oxidation and insulin signal transduction in primary human muscle cells - effects of severe obesity FA incubation and FA translocase/CD36 overexpression." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **95**(7): 3400-3410.
- Bender, N., M. Portmann, Z. Heg, K. Hofmann, M. Zwahlen and M. Egger (2014). "Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity.
- Berggren, J. R., K. E. Boyle, W. H. Chapman and J. A. Houmard (2008). "Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **294**(4): E726-732.
- Bertrand, C., A. Pignalosa, E. Wanecq, C. Rancoule, A. Batut, S. Deleruyelle, L. Lionetti, P. Valet and I. Castan-Laurell (2013). "Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle." PloS one **8**(11): e78874.
- Bigornia, S. J., M. G. Farb, M. M. Mott, D. T. Hess, B. Carmine, A. Fiscale, L. Joseph, C. M. Apovian and N. Gokce (2012). "Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity." Nutr Diabetes **2**: e30.
- Blucher, M. (2010). "The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals." Current opinion in lipidology **21**(1): 38-43.
- Boarnet, M. G., C. L. Anderson, K. Day, T. McMillan and M. Alfonzo (2005). "Evaluation of the California Safe Routes to School legislation: urban form changes and children's active transportation to school." Am J Prev Med **28**(2 Suppl 2): 134-140.
- Boden, G. (2006). "Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver." Current diabetes reports **6**(3): 177-181.
- Boden, G., X. Chen and T. P. Stein (2001). "Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **280**(1): E23-30.
- Bonen, A., N. N. Tandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken and G. J. Heigenhauser (2006). "The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes." International journal of obesity **30**(6): 877-883.
- Boonsong, T., L. Norton, K. Chokkalingam, K. Jewell, I. Macdonald, A. Bennett and K. Tsintzas (2007). "Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways." Biochemical Society transactions **35**(Pt 5): 1310-1311.
- Bost, F., M. Aouadi, L. Caron and B. Binetruy (2005). "The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity." Biochimie **87**(1): 51-56.
- Boucher, J., B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpene, Y. Audigier, J. S. Saulnier-Blache and P. Valet (2005). "Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity." Endocrinology **146**(4): 1764-1771.
- Brossard, N., M. Croset, C. Pachiaudi, J. P. Riou, J. L. Tayot and M. Lagarde (1996). "Retroconversion and metabolism of [13C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [13C]22:6n-3-triacylglycerols." The American journal of clinical nutrition **64**(4): 577-586.
- Brown, A. E., J. Palsgaard, R. Borup, P. Avery, D. A. Gunn, P. De Meyts, S. J. Yeaman and M. Walker (2015). "p38 MAPK activation upregulates proinflammatory pathways in

- skeletal muscle cells from insulin-resistant type 2 diabetic patients." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **308**(1): E63-70.
- Budin, J., W. Breene and D. Putnam (1995). "Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) seeds and oils." Journal of the American Oil Chemists' Society **72**(3): 309-315.
- Burdge, G. C., A. E. Jones and S. A. Wootton (2002). "Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men\*." The British journal of nutrition **88**(4): 355-363.
- Cabrera Escobar, M. A., J. L. Veerman, S. M. Tollman, M. Y. Bertram and K. J. Hofman (2013). "Evidence that a tax on sugar sweetened beverages reduces the obesity rate: a meta-analysis." BMC public health **13**: 1072.
- Calder, P. C. (2004). "n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored." Clinical science **107**(1): 1-11.
- Calzada, C., R. Colas, N. Guillot, M. Guichardant, M. Laville, E. Vericel and M. Lagarde (2010). "Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men." Atherosclerosis **208**(2): 467-472.
- Cancello, R. and K. Clement (2006). "Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue." BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology **113**(10): 1141-1147.
- Capel, F., C. Acquaviva, E. Pitois, B. Laillet, J. P. Rigaudiere, C. Jouve, C. Pouyet, C. Gladine, B. Comte, C. Vianey Saban and B. Morio (2015). "DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation." The Journal of nutritional biochemistry.
- Capel, F., E. Klimcakova, N. Viguerie, B. Roussel, M. Vitkova, M. Kovacikova, J. Polak, Z. Kovacova, J. Galitzky, J. J. Maoret, J. Hanacek, T. H. Pers, A. Bouloumie, V. Stich and D. Langin (2009). "Macrophages and adipocytes in human obesity: adipose tissue gene expression and insulin sensitivity during calorie restriction and weight stabilization." Diabetes **58**(7): 1558-1567.
- Cappuccio, F. P., F. M. Taggart, N. B. Kandala, A. Currie, E. Peile, S. Stranges and M. A. Miller (2008). "Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults." Sleep **31**(5): 619-626.
- Capurso, C. and A. Capurso (2012). "From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids." Vascular pharmacology **57**(2-4): 91-97.
- Casas-Agustench, P., D. K. Arnett, C. E. Smith, C. Q. Lai, L. D. Parnell, I. B. Borecki, A. C. Frazier-Wood, M. Allison, Y. D. Chen, K. D. Taylor, S. S. Rich, J. I. Rotter, Y. C. Lee and J. M. Ordovas (2014). "Saturated fat intake modulates the association between an obesity genetic risk score and body mass index in two US populations." J Acad Nutr Diet **114**(12): 1954-1966.
- Cawthorn, W. P., F. Heyd, K. Hegyi and J. K. Sethi (2007). "Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway." Cell Death Differ **14**(7): 1361-1373.
- Chang, Y. H., D. M. Chang, K. C. Lin, S. J. Shin and Y. J. Lee (2011). "Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review." Diabetes Metab Res Rev **27**(6): 515-527.
- Chavez, J. A., T. A. Knotts, L. P. Wang, G. Li, R. T. Dobrowsky, G. L. Florant and S. A. Summers (2003). "A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids." The Journal of biological chemistry **278**(12): 10297-10303.

- Chen, C. T., Z. Liu, M. Ouellet, F. Calon and R. P. Bazinet (2009). "Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **80**(2-3): 157-163.
- Chen, P. Y., J. Wang, Y. C. Lin, C. C. Li, C. W. Tsai, T. C. Liu, H. W. Chen, C. S. Huang, C. K. Lii and K. L. Liu (2015). "18-Carbon polyunsaturated fatty acids ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in mouse C2C12 myotubes." The Journal of nutritional biochemistry.
- Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." The Journal of biological chemistry **276**(42): 38349-38352.
- Chou, M. M., W. Hou, J. Johnson, L. K. Graham, M. H. Lee, C. S. Chen, A. C. Newton, B. S. Schaffhausen and A. Toker (1998). "Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1." Curr Biol **8**(19): 1069-1077.
- Codoner-Franch, P. and E. Alonso-Iglesias (2015). "Resistin: insulin resistance to malignancy." Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry **438**: 46-54.
- Coen, P. M., K. C. Hames, E. M. Leachman, J. P. DeLany, V. B. Ritov, E. V. Menshikova, J. J. Dube, M. Stefanovic-Racic, F. G. Toledo and B. H. Goodpaster (2013). "Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity." Obesity **21**(11): 2362-2371.
- Coll, T., E. Eyre, R. Rodriguez-Calvo, X. Palomer, R. M. Sanchez, M. Merlos, J. C. Laguna and M. Vazquez-Carrera (2008). "Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells." The Journal of biological chemistry **283**(17): 11107-11116.
- Collins, J. M., M. J. Neville, M. B. Hoppa and K. N. Frayn (2010). "De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury." The Journal of biological chemistry **285**(9): 6044-6052.
- Conn, V. S., A. Hafdahl, L. J. Phillips, T. M. Ruppert and J. A. Chase (2014). "Impact of physical activity interventions on anthropometric outcomes: systematic review and meta-analysis." J Prim Prev **35**(4): 203-215.
- Cornelius, P., O. A. MacDougald and M. D. Lane (1994). "Regulation of adipocyte development." Annual review of nutrition **14**: 99-129.
- Corpeleijn, E., M. M. Pelters, S. Soenen, M. Mensink, F. G. Bouwman, M. E. Kooi, W. H. Saris, J. F. Glatz and E. E. Blaak (2008). "Insulin acutely upregulates protein expression of the fatty acid transporter CD36 in human skeletal muscle in vivo." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **59**(1): 77-83.
- Cote, J. A., M. Nadeau, M. Leboeuf, L. Blackburn and A. Tchernof (2014). "Adipose tissue diacylglycerol acyltransferase activity and blood lipoprotein triglyceride enrichment in women with abdominal obesity." Atherosclerosis **233**(1): 172-177.
- Cuenda, A. and P. Cohen (1999). "Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis." The Journal of biological chemistry **274**(7): 4341-4346.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochimica et biophysica acta **1773**(8): 1358-1375.
- Cunnane, S. C. and M. J. Anderson (1997). "The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat." The Journal of nutrition **127**(1): 146-152.

- Dagenais, G. R., R. G. Tancredi and K. L. Zierler (1976). "Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm." The Journal of clinical investigation **58**(2): 421-431.
- de la Hunty, A., S. Gibson and M. Ashwell (2013). "Does regular breakfast cereal consumption help children and adolescents stay slimmer? A systematic review and meta-analysis." Obesity facts **6**(1): 70-85.
- de la Maza, M. P., S. Hirsch, N. Jara, L. Leiva, G. Barrera, C. Silva, L. Panella, S. Henriquez and D. Bunout (2014). "Central obesity and not age increases skeletal muscle lipids, without influencing lean body mass and strength." Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral **31**(3): 1134-1141.
- DeLany, J. P., M. M. Windhauser, C. M. Champagne and G. A. Bray (2000). "Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans." The American journal of clinical nutrition **72**(4): 905-911.
- Delzenne, N., P. Ferre, M. Beylot, C. Daubioul, B. Declercq, F. Diraison, I. Dugail, F. Fougere, M. Foretz, K. Mace, R. Reimer, G. Palmer, G. Rutter, J. Tavares, J. Van Loo and H. Vidal (2001). "Study of the regulation by nutrients of the expression of genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals." Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD **11**(4 Suppl): 118-121.
- Diamond-Stanic, M. K., E. M. Marchionne, M. K. Teachey, D. E. Durazo, J. S. Kim and E. J. Henriksen (2011). "Critical role of the transient activation of p38 MAPK in the etiology of skeletal muscle insulin resistance induced by low-level in vitro oxidant stress." Biochemical and biophysical research communications **405**(3): 439-444.
- Dimitriadis, G., P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou and S. A. Raptis (2011). "Insulin effects in muscle and adipose tissue." Diabetes research and clinical practice **93** Suppl 1: S52-59.
- Dray, C., C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P. D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpenne, R. Burcelin, I. Castan-Laurell and P. Valet (2008). "Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice." Cell metabolism **8**(5): 437-445.
- Drolet, R., C. Richard, A. D. Sniderman, J. Mailloux, M. Fortier, C. Huot, C. Rheume and A. Tchernof (2008). "Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women." International journal of obesity **32**(2): 283-291.
- Du, K., S. Herzig, R. N. Kulkarni and M. Montminy (2003). "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver." Science **300**(5625): 1574-1577.
- Duan, Y., F. Li, L. Li, J. Fan, X. Sun and Y. Yin (2014). "n-6:n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs." The British journal of nutrition **111**(3): 445-451.
- Eckel, R. H., S. E. Kahn, E. Ferrannini, A. B. Goldfine, D. M. Nathan, M. W. Schwartz, R. J. Smith and S. R. Smith (2011). "Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?" The Journal of clinical endocrinology and metabolism **96**(6): 1654-1663.
- Egert, S., M. Fobker, G. Andersen, V. Somoza, H. F. Erbersdobler and U. Wahrburg (2008). "Effects of dietary alpha-linolenic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on parameters of glucose metabolism in healthy volunteers." Annals of nutrition & metabolism **53**(3-4): 182-187.
- Eissing, L., T. Scherer, K. Todter, U. Knippschild, J. W. Greve, W. A. Buurman, H. O. Pinnschmidt, S. S. Rensen, A. M. Wolf, A. Bartelt, J. Heeren, C. Buettner and L. Scheja (2013). "De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health." Nature communications **4**: 1528.

- Emery, C., J. Dinet, A. Lafuma, C. Sermet, B. Khoshnood and F. Fagnani (2007). "[Cost of obesity in France]." Presse Med **36**(6 Pt 1): 832-840.
- Enos, R. T., K. T. Velazquez, J. L. McClellan, T. L. Cranford, M. D. Walla and E. A. Murphy (2014). "Reducing the Dietary Omega-6:Omega-3 Utilizing alpha-Linolenic Acid; Not a Sufficient Therapy for Attenuating High-Fat-Diet-Induced Obesity Development Nor Related Detrimental Metabolic and Adipose Tissue Inflammatory Outcomes." PloS one **9**(4): e94897.
- Eschwege, E., M. A. Charles and A. Basdevant (2012). "ObEpi : Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité."
- Esfahani, M., A. Movahedian, M. Baranchi and M. T. Goodarzi (2015). "Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome." Iran J Basic Med Sci **18**(5): 430-442.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." J Allergy Clin Immunol **115**(5): 911-919; quiz 920.
- Fardet, A. and Y. Boirie (2013). "Associations between diet-related diseases and impaired physiological mechanisms: a holistic approach based on meta-analyses to identify targets for preventive nutrition." Nutrition reviews **71**(10): 643-656.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger and R. Paschke (2002). "Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." Biochemical and biophysical research communications **290**(3): 1084-1089.
- Faust, I. M., P. R. Johnson, J. S. Stern and J. Hirsch (1978). "Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity." The American journal of physiology **235**(3): E279-286.
- Feillet-Coudray, C., M. Aoun, G. Fouret, B. Bonafos, J. Ramos, F. Casas, J. P. Cristol and C. Coudray (2013). "Effects of long-term administration of saturated and n-3 fatty acid-rich diets on lipid utilisation and oxidative stress in rat liver and muscle tissues." The British journal of nutrition: 1-14.
- Fiamoncini, J., T. M. Lima, S. M. Hirabara, J. Ecker, R. Gorjao, T. Romanatto, E. L. A. S. Worsch, H. Laumen, B. Bader, H. Daniel and R. Curi (2015). "Medium-chain dicarboxylic acylcarnitines as markers of n-3 PUFA-induced peroxisomal oxidation of fatty acids." Molecular nutrition & food research **59**(8): 1573-1583.
- Fiamoncini, J., N. Turner, S. M. Hirabara, T. M. Salgado, A. C. Marcal, S. Leslie, S. M. da Silva, F. C. Deschamps, J. Luz, G. J. Cooney and R. Curi (2013). "Enhanced peroxisomal beta-oxidation is associated with prevention of obesity and glucose intolerance by fish oil-enriched diets." Obesity **21**(6): 1200-1207.
- Field, A. E., W. C. Willett, L. Lissner and G. A. Colditz (2007). "Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study." Obesity **15**(4): 967-976.
- Flachs, P., M. Rossmeisl and J. Kopecky (2014). "The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca **63 Suppl 1**: S93-S118.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." The Journal of biological chemistry **226**(1): 497-509.
- Foster, G. D., S. Sherman, K. E. Borradaile, K. M. Grundy, S. S. Vander Veur, J. Nachmani, A. Karpyn, S. Kumanyika and J. Shults (2008). "A policy-based school intervention to prevent overweight and obesity." Pediatrics **121**(4): e794-802.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin and A. S. Greenberg (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **83**(3): 847-850.

- Fry, A. C. (2004). "The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations." Sports Med **34**(10): 663-679.
- Fujishiro, M., Y. Gotoh, H. Katagiri, H. Sakoda, T. Ogihara, M. Anai, Y. Onishi, H. Ono, M. Funaki, K. Inukai, Y. Fukushima, M. Kikuchi, Y. Oka and T. Asano (2001). "MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression." The Journal of biological chemistry **276**(23): 19800-19806.
- Fukagawa, N. K., L. G. Bandini, W. H. Dietz and J. B. Young (1996). "Effect of age on body water and resting metabolic rate." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **51**(2): M71-73.
- Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa and I. Shimomura (2005). "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." Science **307**(5708): 426-430.
- Galano, J. M., J. C. Lee, C. Gladine, B. Comte, J. Y. Le Guennec, C. Oger and T. Durand (2015). "Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of adrenic, docosahexaenoic, eicosapentaenoic and alpha-linolenic acids; bioactivities and potential use as biomarkers." Biochimica et biophysica acta **1851**(4): 446-455.
- Galbraith-Emami, S. and T. Lobstein (2013). "The impact of initiatives to limit the advertising of food and beverage products to children: a systematic review." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity **14**(12): 960-974.
- Ginter, E. and V. Simko (2012). "Brown fat tissue - a potential target to combat obesity." Bratisl Lek Listy **113**(1): 52-56.
- Girousse, A., G. Tavernier, C. Valle, C. Moro, N. Mejhert, A. L. Dinel, M. Houssier, B. Roussel, A. Besse-Patin, M. Combes, L. Mir, L. Monbrun, V. Bezaire, B. Prunet-Marcassus, A. Waget, I. Vila, S. Caspar-Bauguil, K. Louche, M. A. Marques, A. Mairal, M. L. Renoud, J. Galitzky, C. Holm, E. Mouisel, C. Thalamas, N. Viguerie, T. Sulpice, R. Burcelin, P. Arner and D. Langin (2013). "Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass." PLoS biology **11**(2): e1001485.
- Glatz, J. F., F. G. Schaap, B. Binas, A. Bonen, G. J. van der Vusse and J. J. Luiken (2003). "Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle." Acta physiologica Scandinavica **178**(4): 367-371.
- Godin, J. P., L. B. Fay and G. Hopfgartner (2007). "Liquid chromatography combined with mass spectrometry for <sup>13</sup>C isotopic analysis in life science research." Mass Spectrom Rev **26**(6): 751-774.
- Gonzalez-Periz, A., R. Horrillo, N. Ferre, K. Gronert, B. Dong, E. Moran-Salvador, E. Titos, M. Martinez-Clemente, M. Lopez-Parra, V. Arroyo and J. Claria (2009). "Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **23**(6): 1946-1957.
- Goodpaster, B. H., J. He, S. Watkins and D. E. Kelley (2001). "Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(12): 5755-5761.
- Gotoh, N., K. Nagao, S. Onoda, B. Shirouchi, K. Furuya, T. Nagai, H. Mizobe, K. Ichioka, H. Watanabe, T. Yanagita and S. Wada (2009). "Effects of three different highly purified n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice." Journal of agricultural and food chemistry **57**(22): 11047-11054.

- Gregg, E. W., B. L. Cadwell, Y. J. Cheng, C. C. Cowie, D. E. Williams, L. Geiss, M. M. Engelgau and F. Vinicor (2004). "Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S." Diabetes care **27**(12): 2806-2812.
- Gregoire, F. M. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." Experimental biology and medicine **226**(11): 997-1002.
- Gronn, M., E. Christensen, T. A. Hagve and B. O. Christophersen (1991). "Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells." Biochimica et biophysica acta **1081**(1): 85-91.
- Grundty, S. M. (2006). "Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds." Journal of the American College of Cardiology **47**(6): 1093-1100.
- Guelzim, N., J. F. Huneau, V. Mathe, S. Tesseraud, J. Mourot, N. Simon and D. Hermier (2014). "N-3 fatty acids improve body composition and insulin sensitivity during energy restriction in the rat." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **91**(5): 203-211.
- Guerra, P. H., M. R. Nobre, J. A. Silveira and J. A. Taddei (2013). "The effect of school-based physical activity interventions on body mass index: a meta-analysis of randomized trials." Clinics (Sao Paulo) **68**(9): 1263-1273.
- Guillaume, M., L. Lapidus, F. Beckers, A. Lambert and P. Bjorntorp (1995). "Familial trends of obesity through three generations: the Belgian-Luxembourg child study." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity **19 Suppl 3**: S5-9.
- Guillet-Deniau, I., A. L. Pichard, A. Kone, C. Esnous, M. Nieruchalski, J. Girard and C. Prip-Buus (2004). "Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway." J Cell Sci **117**(Pt 10): 1937-1944.
- Gunnarsdottir, I., H. Tomasson, M. Kiely, J. A. Martinez, N. M. Bandarra, M. G. Morais and I. Thorsdottir (2008). "Inclusion of fish or fish oil in weight-loss diets for young adults: effects on blood lipids." International journal of obesity **32**(7): 1105-1112.
- Guo, Z. K., L. K. Cella, C. Baum, E. Ravussin and D. A. Schoeller (2000). "De novo lipogenesis in adipose tissue of lean and obese women: application of deuterated water and isotope ratio mass spectrometry." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity **24**(7): 932-937.
- Hamada, Y., H. Nagasaki, A. Fujiya, Y. Seino, Q. L. Shang, T. Suzuki, H. Hashimoto and Y. Oiso (2014). "Involvement of de novo ceramide synthesis in pro-inflammatory adipokine secretion and adipocyte-macrophage interaction." The Journal of nutritional biochemistry **25**(12): 1309-1316.
- Hamel, F. G., R. G. Bennett, J. L. Upward and W. C. Duckworth (2001). "Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes." Endocrinology **142**(6): 2702-2706.
- Hanada, H., K. Morikawa, K. Hirota, M. Nonaka and Y. Umehara (2011). "Induction of apoptosis and lipogenesis in human preadipocyte cell line by n-3 PUFAs." Cell biology international **35**(1): 51-59.
- Hanbauer, I., I. Rivero-Covelo, E. Maloku, A. Baca, Q. Hu, J. R. Hibbeln and J. M. Davis (2009). "The Decrease of n-3 Fatty Acid Energy Percentage in an Equicaloric Diet Fed to B6C3Fe Mice for Three Generations Elicits Obesity." Cardiovascular psychiatry and neurology **2009**: 867041.
- Harms, M. and P. Seale (2013). "Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential." Nature medicine **19**(10): 1252-1263.



- Harris, C. A., J. T. Haas, R. S. Streeper, S. J. Stone, M. Kumari, K. Yang, X. Han, N. Brownell, R. W. Gross, R. Zechner and R. V. Farese, Jr. (2011). "DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes." Journal of lipid research **52**(4): 657-667.
- Hartweg, J., A. J. Farmer, R. R. Holman and A. Neil (2009). "Potential impact of omega-3 treatment on cardiovascular disease in type 2 diabetes." Current opinion in lipidology **20**(1): 30-38.
- Hauner, H. (2005). "Secretory factors from human adipose tissue and their functional role." The Proceedings of the Nutrition Society **64**(2): 163-169.
- Hector, J., B. Schwarzloh, J. Goehring, T. G. Strate, U. F. Hess, G. Deuretzbacher, N. Hansen-Algenstaedt, F. U. Beil and P. Algenstaedt (2007). "TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme **39**(4): 250-255.
- Hellerstein, M. K. (1999). "De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects." European journal of clinical nutrition **53 Suppl 1**: S53-65.
- Hellmann, J., Y. Tang, M. Kosuri, A. Bhatnagar and M. Spite (2011). "Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **25**(7): 2399-2407.
- Hensler, M., K. Bardova, Z. M. Jilkova, W. Wahli, D. Meztger, P. Chambon, J. Kopecky and P. Flachs (2011). "The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice." Lipids in health and disease **10**: 128.
- Herman, M. A., O. D. Peroni, J. Villoria, M. R. Schon, N. A. Abumrad, M. Bluher, S. Klein and B. B. Kahn (2012). "A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism." Nature **484**(7394): 333-338.
- Herman, W. H. and P. Zimmet (2012). "Type 2 diabetes: an epidemic requiring global attention and urgent action." Diabetes care **35**(5): 943-944.
- Hinney, A., C. I. Vogel and J. Hebebrand (2010). "From monogenic to polygenic obesity: recent advances." Eur Child Adolesc Psychiatry **19**(3): 297-310.
- Holdsworth, M., Y. Kameli and F. Delpuech (2007). "Stakeholder views on policy options for responding to the growing challenge from obesity in France: findings from the PorGrow project." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity **8 Suppl 2**: 53-61.
- Hoper, A. C., W. Salma, S. J. Sollie, A. D. Hafstad, J. Lund, A. M. Khalid, J. Raa, E. Aasum and T. S. Larsen (2013). "Wax Esters from the Marine Copepod *Calanus finmarchicus* Reduce Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Mice." The Journal of nutrition.
- Horakova, O., D. Medrikova, E. M. van Schothorst, A. Bunschoten, P. Flachs, V. Kus, O. Kuda, K. Bardova, P. Janovska, M. Hensler, M. Rossmeisl, R. Wang-Sattler, C. Prehn, J. Adamski, T. Illig, J. Keijer and J. Kopecky (2012). "Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n-3 PUFA and rosiglitazone in dietary obese mice." PloS one **7**(8): e43764.
- Horikawa, C., S. Kodama, Y. Yachi, Y. Heianza, R. Hirasawa, Y. Ibe, K. Saito, H. Shimano, N. Yamada and H. Sone (2011). "Skipping breakfast and prevalence of overweight and obesity in Asian and Pacific regions: a meta-analysis." Prev Med **53**(4-5): 260-267.
- Hutchins, A. M., B. D. Brown, S. C. Cunnane, S. G. Domitrovich, E. R. Adams and C. E. Bobowiec (2013). "Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study." Nutrition research **33**(5): 367-375.

- Ian Givens, D. and R. A. Gibbs (2008). "Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them." The Proceedings of the Nutrition Society **67**(3): 273-280.
- Ikeda, I., J. Y. Cha, T. Yanagita, N. Nakatani, K. Oogami, K. Imaizumi and K. Yazawa (1998). "Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **62**(4): 675-680.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, F. Schmeder and G. Boden (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha." Diabetes **51**(7): 2005-2011.
- Itariu, B. K., M. Zeyda, E. E. Hochbrugger, A. Neuhofer, G. Prager, K. Schindler, A. Bohdjalian, D. Mascher, S. Vangala, M. Schranz, M. Krebs, M. G. Bischof and T. M. Stulnig (2012). "Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial." The American journal of clinical nutrition **96**(5): 1137-1149.
- Jelinek, D., J. J. Castillo, S. L. Arora, L. M. Richardson and W. S. Garver (2013). "A high-fat diet supplemented with fish oil improves metabolic features associated with type 2 diabetes." Nutrition.
- Johnson, M. A., J. Polgar, D. Weightman and D. Appleton (1973). "Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study." J Neurol Sci **18**(1): 111-129.
- Jornayvaz, F. R., A. L. Birkenfeld, M. J. Jurczak, S. Kanda, B. A. Guigni, D. C. Jiang, D. Zhang, H. Y. Lee, V. T. Samuel and G. I. Shulman (2011). "Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(14): 5748-5752.
- Jornayvaz, F. R. and G. I. Shulman (2012). "Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance." Cell metabolism **15**(5): 574-584.
- Jove, M., A. Planavila, J. C. Laguna and M. Vazquez-Carrera (2005). "Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells." Endocrinology **146**(7): 3087-3095.
- Jove, M., A. Planavila, R. M. Sanchez, M. Merlos, J. C. Laguna and M. Vazquez-Carrera (2006). "Palmitate induces TNF-alpha expression in C2C12 by a mechanism involving PKC and NF-kB activation." Endocrinology **147**(1): 552-561.
- Jung, T. W., H. J. Hwang, H. C. Hong, H. Y. Choi, H. J. Yoo, S. H. Baik and K. M. Choi (2014). "Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells." Molecular and cellular endocrinology **391**(1-2): 30-40.
- Kaiser, K. A., A. W. Brown, M. M. Bohan Brown, J. M. Shikany, R. D. Mattes and D. B. Allison (2014). "Increased fruit and vegetable intake has no discernible effect on weight loss: a systematic review and meta-analysis." The American journal of clinical nutrition **100**(2): 567-576.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira and M. Kasuga (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." The Journal of clinical investigation **116**(6): 1494-1505.
- Kasbi Chadli, F., A. Andre, X. Prieur, G. Loirand, A. Meynier, M. Krempf, P. Nguyen and K. Ouguerram (2011). "n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity

- and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet." The British journal of nutrition: 1-11.
- Kayali, A. G., D. A. Austin and N. J. Webster (2000). "Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." Diabetes **49**(11): 1783-1793.
- Kazantzis, M. and A. Stahl (2012). "Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease." Biochimica et biophysica acta **1821**(5): 852-857.
- Kelley, G. A. and K. S. Kelley (2013). "Effects of exercise in the treatment of overweight and obese children and adolescents: a systematic review of meta-analyses." Journal of obesity **2013**: 783103.
- Kennedy, A., K. Martinez, C. C. Chuang, K. LaPoint and M. McIntosh (2009). "Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications." The Journal of nutrition **139**(1): 1-4.
- Kern, P. A., S. Ranganathan, C. Li, L. Wood and G. Ranganathan (2001). "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **280**(5): E745-751.
- Kim, B. (2008). "Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate." Thyroid **18**(2): 141-144.
- Kim, H. K., M. Della-Fera, J. Lin and C. A. Baile (2006). "Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes." The Journal of nutrition **136**(12): 2965-2969.
- Kim, J., Y. Li and B. A. Watkins (2013). "Fat to treat fat: emerging relationship between dietary PUFA, endocannabinoids, and obesity." Prostaglandins & other lipid mediators **104-105**: 32-41.
- Kim, K. H., K. Lee, Y. S. Moon and H. S. Sul (2001). "A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation." The Journal of biological chemistry **276**(14): 11252-11256.
- Kissebah, A. H. and G. R. Krakower (1994). "Regional adiposity and morbidity." Physiol Rev **74**(4): 761-811.
- Knudsen, N., P. Laurberg, L. B. Rasmussen, I. Bulow, H. Perrild, L. Ovesen and T. Jorgensen (2005). "Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **90**(7): 4019-4024.
- Kraegen, E. W., P. W. Clark, A. B. Jenkins, E. A. Daley, D. J. Chisholm and L. H. Storlien (1991). "Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats." Diabetes **40**(11): 1397-1403.
- Kramer, H. F., C. A. Witczak, E. B. Taylor, N. Fujii, M. F. Hirshman and L. J. Goodyear (2006). "AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle." The Journal of biological chemistry **281**(42): 31478-31485.
- Kuda, O., T. Jelenik, Z. Jilkova, P. Flachs, M. Rossmeisl, M. Hensler, L. Kazdova, N. Ogston, M. Baranowski, J. Gorski, P. Janovska, V. Kus, J. Polak, V. Mohamed-Ali, R. Burcelin, S. Cinti, M. Bryhn and J. Kopecky (2009). "n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet." Diabetologia **52**(5): 941-951.
- Kuma, Y., G. Sabio, J. Bain, N. Shpiro, R. Marquez and A. Cuenda (2005). "BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo." The Journal of biological chemistry **280**(20): 19472-19479.
- Kunesova, M., R. Braunerova, P. Hlavaty, E. Tvrzicka, B. Stankova, J. Skrha, J. Hilgertova, M. Hill, J. Kopecky, M. Wagenknecht, V. Hainer, M. Matoulek, J. Parizkova, A. Zak

- and S. Svacina (2006). "The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca **55**(1): 63-72.
- La Rosa, E., P. Valensi, R. Cohen, K. Soufi, C. Robache and H. le Clesiau (2003). "[Socioeconomic determinism of obesity in the Seine-Saint-Denis area]." Presse Med **32**(2): 55-60.
- Lafontan, M. (2013). "Différences entre tissu adipeux sous-cutané et tissu adipeux viscéral." Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux(Part 4): 337-357.
- Lagarde, M., N. Bernoud-Hubac, C. Calzada, E. Vericel and M. Guichardant (2013). "Lipidomics of essential fatty acids and oxygenated metabolites." Molecular nutrition & food research **57**(8): 1347-1358.
- Lam, Y. Y., G. Hatzinikolas, J. M. Weir, A. Janovska, A. J. McAinch, P. Game, P. J. Meikle and G. A. Wittert (2011). "Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids." Biochimica et biophysica acta **1811**(7-8): 468-475.
- Lanza, I. R., A. Blachnio-Zabielska, M. L. Johnson, J. M. Schimke, D. R. Jakaitis, N. K. Lebrasseur, M. D. Jensen, K. Sreekumaran Nair and P. Zabielski (2013). "Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **304**(12): E1391-1403.
- Large, V., S. Reynisdottir, D. Langin, K. Fredby, M. Klannemark, C. Holm and P. Arner (1999). "Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects." Journal of lipid research **40**(11): 2059-2066.
- Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J. G. Strauss, G. Gorkiewicz and R. Zechner (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell metabolism **3**(5): 309-319.
- Lattka, E., T. Illig, B. Koletzko and J. Heinrich (2010). "Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism." Current opinion in lipidology **21**(1): 64-69.
- Laville, M., C. Cornu, S. Normand, G. Mithieux, M. Beylot and J. P. Riou (1993). "Decreased glucose-induced thermogenesis at the onset of obesity." The American journal of clinical nutrition **57**(6): 851-856.
- Lefterova, M. I. and M. A. Lazar (2009). "New developments in adipogenesis." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **20**(3): 107-114.
- Legrand, P. and V. Rioux (2010). "The complex and important cellular and metabolic functions of saturated fatty acids." Lipids **45**(10): 941-946.
- LeMieux, M. J., N. S. Kalupahana, S. Scoggin and N. Moustaid-Moussa (2015). "Eicosapentaenoic Acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an adiposity-independent manner." The Journal of nutrition **145**(3): 411-417.
- Leray, C. (2010). "Les lipides dans le monde vivant." Edition TEC&DOC Lavoisier: 7-17.
- Leslie, N. R. and C. P. Downes (2002). "PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling." Cellular signalling **14**(4): 285-295.
- Letexier, D., C. Pinteur, V. Large, V. Frering and M. Beylot (2003). "Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue." Journal of lipid research **44**(11): 2127-2134.

- Li, Z., M. Maglione, W. Tu, W. Mojica, D. Arterburn, L. R. Shugarman, L. Hilton, M. Suttorp, V. Solomon, P. G. Shekelle and S. C. Morton (2005). "Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity." Ann Intern Med **142**(7): 532-546.
- Lionetti, L., M. P. Mollica, R. Sica, I. Donizzetti, G. Gifuni, A. Pignalosa, G. Cavaliere and R. Putti (2014). "Differential effects of high-fish oil and high-lard diets on cells and cytokines involved in the inflammatory process in rat insulin-sensitive tissues." International journal of molecular sciences **15**(2): 3040-3063.
- Liu, F., X. Kong, J. Cao, S. Chen, C. Li, J. Huang, D. Gu and T. N. Kelly (2015). "Mobile phone intervention and weight loss among overweight and obese adults: a meta-analysis of randomized controlled trials." American journal of epidemiology **181**(5): 337-348.
- Liu, H. Q., Y. Qiu, Y. Mu, X. J. Zhang, L. Liu, X. H. Hou, L. Zhang, X. N. Xu, A. L. Ji, R. Cao, R. H. Yang and F. Wang (2013). "A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats." Nutrition research **33**(10): 849-858.
- Liu, J., F. F. Zeng, Z. M. Liu, C. X. Zhang, W. H. Ling and Y. M. Chen (2013). "Effects of blood triglycerides on cardiovascular and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of 61 prospective studies." Lipids in health and disease **12**: 159.
- Liu, L., Y. Zhang, N. Chen, X. Shi, B. Tsang and Y. H. Yu (2007). "Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance." The Journal of clinical investigation **117**(6): 1679-1689.
- Liu, M., M. K. Montgomery, C. E. Fiveash, B. Osborne, G. J. Cooney, K. Bell-Anderson and N. Turner (2014). "PPAR $\alpha$ -independent actions of omega-3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis." Sci Rep **4**: 5538.
- Lolmede, K., C. Duffaut, A. Zakaroff-Girard and A. Bouloumie (2011). "Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders." Diabetes & metabolism **37**(4): 283-290.
- Lonn, M., K. Mehlig, C. Bengtsson and L. Lissner (2010). "Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**(1): 326-331.
- Lu, C. Y., C. C. Li, K. L. Liu, C. W. Tsai, C. K. Lii and H. W. Chen (2010). "Docosahexaenoic acid down-regulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the sphingomyelinase/ceramide pathway." The Journal of nutritional biochemistry **21**(4): 338-344.
- Lyon, H. N. and J. N. Hirschhorn (2005). "Genetics of common forms of obesity: a brief overview." The American journal of clinical nutrition **82**(1 Suppl): 215S-217S.
- Ma, W., J. H. Wu, Q. Wang, R. N. Lemaitre, K. J. Mukamal, L. Djousse, I. B. King, X. Song, M. L. Biggs, J. A. Delaney, J. R. Kizer, D. S. Siscovick and D. Mozaffarian (2015). "Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study." The American journal of clinical nutrition **101**(1): 153-163.
- Maccarrone, M., V. Gasperi, M. V. Catani, T. A. Diep, E. Dainese, H. S. Hansen and L. Avigliano (2010). "The endocannabinoid system and its relevance for nutrition." Annual review of nutrition **30**: 423-440.
- Maggard, M. A., L. R. Shugarman, M. Suttorp, M. Maglione, H. J. Sugerman, E. H. Livingston, N. T. Nguyen, Z. Li, W. A. Mojica, L. Hilton, S. Rhodes, S. C. Morton and P. G. Shekelle (2005). "Meta-analysis: surgical treatment of obesity." Ann Intern Med **142**(7): 547-559.

- Major, G. C., E. Doucet, P. Trayhurn, A. Astrup and A. Tremblay (2007). "Clinical significance of adaptive thermogenesis." International journal of obesity **31**(2): 204-212.
- Manickam, E., A. J. Sinclair and D. Cameron-Smith (2010). "Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes." Lipids in health and disease **9**: 57.
- Mannaerts, G. P., L. J. Debeer, J. Thomas and P. J. De Schepper (1979). "Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats." The Journal of biological chemistry **254**(11): 4585-4595.
- Marques, B. G., D. B. Hausman and R. J. Martin (1998). "Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity." The American journal of physiology **275**(6 Pt 2): R1898-1908.
- Massiera, F., M. Bloch-Faure, D. Ceiler, K. Murakami, A. Fukamizu, J. M. Gasc, A. Quignard-Boulange, R. Negrel, G. Ailhaud, J. Seydoux, P. Meneton and M. Teboul (2001). "Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**(14): 2727-2729.
- Matravadia, S., E. A. Herbst, S. S. Jain, D. M. Mutch and G. P. Holloway (2014). "Both linoleic and alpha-linolenic acid prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **307**(1): E102-114.
- Matsuzawa, Y., I. Shimomura, T. Nakamura, Y. Keno, K. Kotani and K. Tokunaga (1995). "Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity." Obes Res **3 Suppl 2**: 187S-194S.
- Mattes, R. (2014). "Energy intake and obesity: ingestive frequency outweighs portion size." Physiology & behavior **134**: 110-118.
- McKinsey Global Institute (2014). "Overcoming obesity : an initial economic analysis."
- Ministère de l'agriculture de l'agro-alimentaire et de la forêt (2010). "Plan National pour l'Alimentation."
- Ministère du Travail de l'Emploi et de la Santé (2010). "Plan Obésité 2010-2013." DICOM n° S-11-046
- Ministère du Travail de l'Emploi et de la Santé (2011). "Plan National Nutrition Santé 2011-2015." DICOM n° S-11-047.
- Miyanaga, O., M. Nagano and G. L. Cottam (1982). "Effect of insulin on liver pyruvate kinase in vivo and in vitro." The Journal of biological chemistry **257**(18): 10617-10623.
- Molina, J. M., T. P. Ciaraldi, D. Brady and J. M. Olefsky (1989). "Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects." Diabetes **38**(8): 991-995.
- Mori, T., H. Kondo, T. Hase, I. Tokimitsu and T. Murase (2007). "Dietary fish oil upregulates intestinal lipid metabolism and reduces body weight gain in C57BL/6J mice." The Journal of nutrition **137**(12): 2629-2634.
- Moro, C., J. E. Galgani, L. Luu, M. Pasarica, A. Mairal, S. Bajpeyi, G. Schmitz, D. Langin, G. Liebisch and S. R. Smith (2009). "Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **94**(9): 3440-3447.
- Motoshima, H., X. Wu, M. K. Sinha, V. E. Hardy, E. L. Rosato, D. J. Barbot, F. E. Rosato and B. J. Goldstein (2002). "Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and

- rosiglitazone." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **87**(12): 5662-5667.
- Mozaffarian, D., A. Geelen, I. A. Brouwer, J. M. Geleijnse, P. L. Zock and M. B. Katan (2005). "Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials." Circulation **112**(13): 1945-1952.
- Mozaffarian, D., T. Hao, E. B. Rimm, W. C. Willett and F. B. Hu (2011). "Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men." The New England journal of medicine **364**(25): 2392-2404.
- Mraz, M. and M. Haluzik (2014). "The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation." The Journal of endocrinology **222**(3): R113-127.
- Muller-Stich, B. P., J. D. Senft, R. Warschkow, H. G. Kenngott, A. T. Billeter, G. Vit, S. Helfert, M. K. Diener, L. Fischer, M. W. Buchler and P. P. Nawroth (2015). "Surgical versus medical treatment of type 2 diabetes mellitus in nonseverely obese patients: a systematic review and meta-analysis." Annals of surgery **261**(3): 421-429.
- Murali, G., C. V. Desouza, M. E. Clevenger, R. Ramalingam and V. Saraswathi (2014). "Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **90**(1): 13-21.
- Muramatsu, T., H. Yatsuya, H. Toyoshima, S. Sasaki, Y. Li, R. Otsuka, K. Wada, Y. Hotta, H. Mitsuhashi, K. Matsushita, T. Murohara and K. Tamakoshi (2010). "Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese." Prev Med **50**(5-6): 272-276.
- Murumalla, R. K., M. K. Gunasekaran, J. K. Padhan, K. Bencharif, L. Gence, F. Festy, M. Cesari, R. Roche and L. Hoareau (2012). "Fatty acids do not pay the toll: effect of SFA and PUFA on human adipose tissue and mature adipocytes inflammation." Lipids in health and disease **11**(1): 175.
- Mytton, O. T., K. Nnoaham, H. Eyles, P. Scarborough and C. Ni Mhurchu (2014). "Systematic review and meta-analysis of the effect of increased vegetable and fruit consumption on body weight and energy intake." BMC public health **14**: 886.
- Nadeau, K. J., J. W. Leitner, I. Gurerich and B. Draznin (2004). "Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes." The Journal of biological chemistry **279**(33): 34380-34387.
- Nair, K. S. (2005). "Aging muscle." The American journal of clinical nutrition **81**(5): 953-963.
- Naughton, S. S., M. L. Mathai, D. H. Hryciw and A. J. McAinch (2013). "Fatty Acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism." International journal of endocrinology **2013**: 361895.
- Ng, M., T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E. C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S. F. Abera, J. P. Abraham, N. M. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F. S. AlBuhairan, Z. A. Alemu, R. Alfonso, M. K. Ali, R. Ali, N. A. Guzman, W. Ammar, P. Anwar, A. Banerjee, S. Barquera, S. Basu, D. A. Bennett, Z. Bhutta, J. Blore, N. Cabral, I. C. Nonato, J. C. Chang, R. Chowdhury, K. J. Courville, M. H. Criqui, D. K. Cundiff, K. C. Dabhadkar, L. Dandona, A. Davis, A. Dayama, S. D. Dharmaratne, E. L. Ding, A. M. Durrani, A. Esteghamati, F. Farzadfar, D. F. Fay, V. L. Feigin, A. Flaxman, M. H. Forouzanfar, A. Goto, M. A. Green, R. Gupta, N. Hafezi-Nejad, G. J. Hankey, H. C. Harewood, R. Havmoeller, S. Hay, L. Hernandez, A. Husseini, B. T. Idrisov, N. Ikeda, F. Islami, E. Jahangir, S. K. Jassal, S. H. Jee, M. Jeffreys, J. B. Jonas, E. K. Kabagambe, S. E. Khalifa, A. P. Kengne, Y. S. Khader, Y. H. Khang, D. Kim, R. W. Kimokoti, J. M. Kinge, Y. Kokubo, S. Kosen, G. Kwan, T. Lai, M. Leinsalu, Y. Li, X. Liang, S. Liu, G. Logroscino, P. A. Lotufo, Y. Lu, J. Ma,

- N. K. Mainoo, G. A. Mensah, T. R. Merriman, A. H. Mokdad, J. Moschandreas, M. Naghavi, A. Naheed, D. Nand, K. M. Narayan, E. L. Nelson, M. L. Neuhouser, M. I. Nisar, T. Ohkubo, S. O. Oti, A. Pedroza, D. Prabhakaran, N. Roy, U. Sampson, H. Seo, S. G. Sepanlou, K. Shibuya, R. Shiri, I. Shiue, G. M. Singh, J. A. Singh, V. Skirbekk, N. J. Stapelberg, L. Sturua, B. L. Sykes, M. Tobias, B. X. Tran, L. Trasande, H. Toyoshima, S. van de Vijver, T. J. Vasankari, J. L. Veerman, G. Velasquez-Melendez, V. V. Vlassov, S. E. Vollset, T. Vos, C. Wang, X. Wang, E. Weiderpass, A. Werdecker, J. L. Wright, Y. C. Yang, H. Yatsuya, J. Yoon, S. J. Yoon, Y. Zhao, M. Zhou, S. Zhu, A. D. Lopez, C. J. Murray and E. Gakidou (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet **384**(9945): 766-781.
- Nicholls, D. G. and E. Rial (1999). "A history of the first uncoupling protein, UCP1." J Bioenerg Biomembr **31**(5): 399-406.
- Nielsen, S., Z. Guo, C. M. Johnson, D. D. Hensrud and M. D. Jensen (2004). "Splanchnic lipolysis in human obesity." The Journal of clinical investigation **113**(11): 1582-1588.
- Nieman, D. C., E. J. Cayea, M. D. Austin, D. A. Henson, S. R. McAnulty and F. Jin (2009). "Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults." Nutrition research **29**(6): 414-418.
- Nieto-Vazquez, I., S. Fernandez-Veledo, C. de Alvaro and M. Lorenzo (2008). "Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle." Diabetes **57**(12): 3211-3221.
- Nobili, V., A. Alisi, C. Della Corte, P. Rise, C. Galli, C. Agostoni and G. Bedogni (2012). "Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: Randomised controlled trial in children." Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.
- Nosaka, N., H. Maki, Y. Suzuki, H. Haruna, A. Ohara, M. Kasai, H. Tsuji, T. Aoyama, M. Okazaki, O. Igarashi and K. Kondo (2003). "Effects of margarine containing medium-chain triacylglycerols on body fat reduction in humans." J Atheroscler Thromb **10**(5): 290-298.
- Novak, N. L. and K. D. Brownell (2012). "Role of policy and government in the obesity epidemic." Circulation **126**(19): 2345-2352.
- Oliva, M. E., M. R. Ferreira, A. Chicco and Y. B. Lombardo (2013). "Dietary Salba (Salvia hispanica L) seed rich in alpha-linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **89**(5): 279-289.
- Oliver, E., F. C. McGillicuddy, K. A. Harford, C. M. Reynolds, C. M. Phillips, J. F. Ferguson and H. M. Roche (2012). "Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA." The Journal of nutritional biochemistry **23**(9): 1192-1200.
- OMS, O. m. d. l. s. (2003). "Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale."
- Orel, M., R. Lichnovska, S. Gwozdziwiczova, N. Zlamalova, I. Klementa, A. Merkunova and J. Hrebicek (2004). "Gender differences in tumor necrosis factor alpha and leptin secretion from subcutaneous and visceral fat tissue." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca **53**(5): 501-505.
- Oster, R. T., J. M. Tishinsky, Z. Yuan and L. E. Robinson (2010). "Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPARgamma mRNA, in 3T3-L1 adipocytes." Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme **35**(6): 783-789.



- Pawar, A. and D. B. Jump (2003). "Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes." The Journal of biological chemistry **278**(38): 35931-35939.
- Pearson, N., R. E. Braithwaite, S. J. Biddle, E. M. van Sluijs and A. J. Atkin (2014). "Associations between sedentary behaviour and physical activity in children and adolescents: a meta-analysis." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity **15**(8): 666-675.
- Pellegrinelli, V., C. Rouault, S. Rodriguez-Cuenca, V. Albert, F. Edom-Vovard, A. Vidal-Puig, K. Clement, G. Butler-Browne and D. Lacasa (2015). "Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity." Diabetes.
- Perdiguerro, E., V. Ruiz-Bonilla, L. Gresh, L. Hui, E. Ballestar, P. Sousa-Victor, B. Baeza-Raja, M. Jardi, A. Bosch-Comas, M. Esteller, C. Caelles, A. L. Serrano, E. F. Wagner and P. Munoz-Canoves (2007). "Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation." The EMBO journal **26**(5): 1245-1256.
- Perdomo, G., S. R. Commerford, A. M. Richard, S. H. Adams, B. E. Corkey, R. M. O'Doherty and N. F. Brown (2004). "Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation." The Journal of biological chemistry **279**(26): 27177-27186.
- Petrigli Polidori, G., M. A. Lomax and K. Docherty (2012). "Palmitate enhances the differentiation of mouse embryonic stem cells towards white adipocyte lineages." Molecular and cellular endocrinology **361**(1-2): 40-50.
- Peyron-Caso, E., A. Quignard-Boulange, M. Laromiguiere, S. Feing-Kwong-Chan, A. Veronese, B. Ardouin, G. Slama and S. W. Rizkalla (2003). "Dietary fish oil increases lipid mobilization but does not decrease lipid storage-related enzyme activities in adipose tissue of insulin-resistant, sucrose-fed rats." The Journal of nutrition **133**(7): 2239-2243.
- Philp, L. K., L. K. Heilbronn, A. Janovska and G. A. Wittert (2015). "Dietary Enrichment with Fish Oil Prevents High Fat-Induced Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle in Mice." PloS one **10**(2): e0117494.
- Pillon, N. J., K. Arane, P. J. Bilan, T. T. Chiu and A. Klip (2012). "Muscle cells challenged with saturated fatty acids mount an autonomous inflammatory response that activates macrophages." Cell communication and signaling : CCS **10**(1): 30.
- Pilz, S. and W. Marz (2008). "Free fatty acids as a cardiovascular risk factor." Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC **46**(4): 429-434.
- Poppitt, S. D. and A. M. Prentice (1996). "Energy density and its role in the control of food intake: evidence from metabolic and community studies." Appetite **26**(2): 153-174.
- Poudyal, H., S. K. Panchal, L. C. Ward and L. Brown (2012). "Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats." The Journal of nutritional biochemistry.
- Priore, P., E. Stanca, G. V. Gnoni and L. Siculella (2012). "Dietary fat types differently modulate the activity and expression of mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase in rat liver." Biochimica et biophysica acta **1821**(10): 1341-1349.
- Puri, V., S. Ranjit, S. Konda, S. M. Nicoloso, J. Straubhaar, A. Chawla, M. Chouinard, C. Lin, A. Burkart, S. Corvera, R. A. Perugini and M. P. Czech (2008). "Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(22): 7833-7838.
- Radin, M. S., S. Sinha, B. A. Bhatt, N. Dedousis and R. M. O'Doherty (2008). "Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial

- protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle." Diabetologia **51**(2): 336-346.
- Rasmussen, B. B., U. C. Holmback, E. Volpi, B. Morio-Liondore, D. Paddon-Jones and R. R. Wolfe (2002). "Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle." The Journal of clinical investigation **110**(11): 1687-1693.
- Ravussin, E., S. Lillioja, W. C. Knowler, L. Christin, D. Freymond, W. G. Abbott, V. Boyce, B. V. Howard and C. Bogardus (1988). "Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain." The New England journal of medicine **318**(8): 467-472.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad (2008). "Dose translation from animal to human studies revisited." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**(3): 659-661.
- Resjo, S., O. Goransson, L. Harndahl, S. Zolnierowicz, V. Manganiello and E. Degerman (2002). "Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes." Cellular signalling **14**(3): 231-238.
- Reyna, S. M., S. Ghosh, P. Tantiwong, C. S. Meka, P. Eagan, C. P. Jenkinson, E. Cersosimo, R. A. Defronzo, D. K. Coletta, A. Sriwijitkamol and N. Musi (2008). "Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects." Diabetes **57**(10): 2595-2602.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." The Journal of physiology **529 Pt 1**: 3-10.
- Rioux, V., F. Pedrono and P. Legrand (2011). "Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations." Biochimica et biophysica acta **1811**(1): 1-8.
- Robinson, E., E. Almiron-Roig, F. Rutters, C. de Graaf, C. G. Forde, C. Tudur Smith, S. J. Nolan and S. A. Jebb (2014). "A systematic review and meta-analysis examining the effect of eating rate on energy intake and hunger." The American journal of clinical nutrition **100**(1): 123-151.
- Rokling-Andersen, M. H., A. C. Rustan, A. J. Wensaas, O. Kaalhus, H. Wergedahl, T. H. Rost, J. Jensen, B. A. Graff, R. Caesar and C. A. Drevon (2009). "Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a high-fat diet." The British journal of nutrition **102**(7): 995-1006.
- Rosen, E. D., C. H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez and B. M. Spiegelman (2002). "C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway." Genes Dev **16**(1): 22-26.
- Rosenwald, M. and C. Wolfrum (2014). "The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes." Adipocyte **3**(1): 4-9.
- Ruzickova, J., M. Rossmeisl, T. Prazak, P. Flachs, J. Sponarova, M. Veck, E. Tvrzicka, M. Bryhn and J. Kopecky (2004). "Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue." Lipids **39**(12): 1177-1185.
- Sainz, N., J. Barrenetxe, M. J. Moreno-Aliaga and J. A. Martinez (2015). "Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin." Metabolism: clinical and experimental **64**(1): 35-46.
- Sakurai, T., J. Ogasawara, T. Kizaki, S. Sato, Y. Ishibashi, M. Takahashi, O. Kobayashi, S. Oh-Ishi, J. Nagasawa, K. Takahashi, H. Ishida, T. Izawa and H. Ohno (2013). "The effects of exercise training on obesity-induced dysregulated expression of adipokines in white adipose tissue." International journal of endocrinology **2013**: 801743.

- Samuel, V. T., Z. X. Liu, X. Qu, B. D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A. J. Romanelli and G. I. Shulman (2004). "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." The Journal of biological chemistry **279**(31): 32345-32353.
- Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.
- Sanchez-Gurmaches, J. and D. A. Guertin (2014). "Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat." Biochimica et biophysica acta **1842**(3): 340-351.
- Sassa, T. and A. Kihara (2014). "Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology." Biomol Ther (Seoul) **22**(2): 83-92.
- Sato, A., H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami and Y. Ogawa (2010). "Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis." Diabetes **59**(10): 2495-2504.
- Sawada, K., K. Kawabata, T. Yamashita, K. Kawasaki, N. Yamamoto and H. Ashida (2012). "Ameliorative effects of polyunsaturated fatty acids against palmitic acid-induced insulin resistance in L6 skeletal muscle cells." Lipids in health and disease **11**: 36.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). "Fiber types in mammalian skeletal muscles." Physiol Rev **91**(4): 1447-1531.
- Schmitz-Peiffer, C. and J. P. Whitehead (2003). "IRS-1 regulation in health and disease." IUBMB life **55**(7): 367-374.
- Schrauwen-Hinderling, V. B., M. K. Hesselink, P. Schrauwen and M. E. Kooi (2006). "Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle." Obesity **14**(3): 357-367.
- Scott, W., J. Stevens and S. A. Binder-Macleod (2001). "Human skeletal muscle fiber type classifications." Phys Ther **81**(11): 1810-1816.
- Seyoum, B., A. Fite and A. B. Abou-Samra (2011). "Effects of 3T3 adipocytes on interleukin-6 expression and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells." Biochemical and biophysical research communications **410**(1): 13-18.
- Shen, Y. H., L. Zhang, Y. Gan, X. Wang, J. Wang, S. A. LeMaire, J. S. Coselli and X. L. Wang (2006). "Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells." The Journal of biological chemistry **281**(12): 7727-7736.
- Shomonov-Wagner, L., A. Raz and A. Leikin-Frenkel (2015). "Alpha linolenic acid in maternal diet halts the lipid disarray due to saturated fatty acids in the liver of mice offspring at weaning." Lipids in health and disease **14**(1): 14.
- Short, K. R., J. L. Vittone, M. L. Bigelow, D. N. Proctor, J. M. Coenen-Schimke, P. Rys and K. S. Nair (2005). "Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training." J Appl Physiol (1985) **99**(1): 95-102.
- Sinacore, D. R. and E. A. Gulve (1993). "The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy." Phys Ther **73**(12): 878-891.
- Siri-Tarino, P. W., Q. Sun, F. B. Hu and R. M. Krauss (2010). "Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease." The American journal of clinical nutrition **91**(3): 535-546.
- Siri-Tarino, P. W., Q. Sun, F. B. Hu and R. M. Krauss (2010). "Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease." The American journal of clinical nutrition **91**(3): 502-509.
- Sitnick, M. T., M. K. Basantani, L. Cai, G. Schoiswohl, C. F. Yazbeck, G. Distefano, V. Ritov, J. P. DeLany, R. Schreiber, D. B. Stolz, N. P. Gardner, P. C. Kienesberger, T.

- Pulinilkunnil, R. Zechner, B. H. Goodpaster, P. Coen and E. E. Kershaw (2013). "Skeletal muscle triacylglycerol hydrolysis does not influence metabolic complications of obesity." Diabetes **62**(10): 3350-3361.
- Skulas-Ray, A. C., P. M. Kris-Etherton, W. S. Harris, J. P. Vanden Heuvel, P. R. Wagner and S. G. West (2011). "Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia." The American journal of clinical nutrition **93**(2): 243-252.
- Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder and H. Hauner (2007). "Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **92**(3): 1023-1033.
- Souza, S. C., H. J. Palmer, Y. H. Kang, M. T. Yamamoto, K. V. Muliro, K. E. Paulson and A. S. Greenberg (2003). "TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes." Journal of cellular biochemistry **89**(6): 1077-1086.
- Spadaro, L., O. Magliocco, D. Spampinato, S. Piro, C. Oliveri, C. Alagona, G. Papa, A. M. Rabuazzo and F. Purrello (2008). "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease." Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver **40**(3): 194-199.
- Stanford, K. I., R. J. Middelbeek and L. J. Goodyear (2015). "Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations." Diabetes **64**(7): 2361-2368.
- Steinberg, G. R., B. E. Kemp and M. J. Watt (2007). "Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **293**(4): E958-964.
- Steinberg, G. R., J. W. Rush and D. J. Dyck (2003). "AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **284**(3): E648-654.
- Stofkova, A. (2010). "Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity." Endocr Regul **44**(1): 25-36.
- Stonehouse, W. (2014). "Does consumption of LC omega-3 PUFA enhance cognitive performance in healthy school-aged children and throughout adulthood? Evidence from clinical trials." Nutrients **6**(7): 2730-2758.
- Stubbs, R. J. and S. Whybrow (2004). "Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans." Physiology & behavior **81**(5): 755-764.
- Suganami, T. and Y. Ogawa (2010). "Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling." Journal of leukocyte biology **88**(1): 33-39.
- Sun, Z., J. Gong, H. Wu, W. Xu, L. Wu, D. Xu, J. Gao, J. W. Wu, H. Yang, M. Yang and P. Li (2013). "Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes." Nature communications **4**: 1594.
- Swinburn, B. A., I. Caterson, J. C. Seidell and W. P. James (2004). "Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity." Public health nutrition **7**(1A): 123-146.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel and C. Londos (2003). "Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation." The Journal of cell biology **161**(6): 1093-1103.
- Tanabe, Y., Y. Matsunaga, M. Saito and K. Nakayama (2008). "Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation." Journal of pharmacological sciences **106**(3): 478-484.
- Tappy, L. (1996). "Thermic effect of food and sympathetic nervous system activity in humans." Reprod Nutr Dev **36**(4): 391-397.

- Tekeleselassie, A. W., Y. M. Goh, M. A. Rajion, M. Motshakeri and M. Ebrahimi (2013). "A high-fat diet enriched with low omega-6 to omega-3 fatty acid ratio reduced fat cellularity and plasma leptin concentration in Sprague-Dawley rats." ScientificWorldJournal **2013**: 757593.
- Thorsdottir, I., H. Tomasson, I. Gunnarsdottir, E. Gisladdottir, M. Kiely, M. D. Parra, N. M. Bandarra, G. Schaafsma and J. A. Martinez (2007). "Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content." International journal of obesity **31**(10): 1560-1566.
- Thow, A. M., S. Jan, S. Leeder and B. Swinburn (2010). "The effect of fiscal policy on diet, obesity and chronic disease: a systematic review." Bull World Health Organ **88**(8): 609-614.
- Todoric, J., M. Loffler, J. Huber, M. Bilban, M. Reimers, A. Kadl, M. Zeyda, W. Waldhausl and T. M. Stulnig (2006). "Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids." Diabetologia **49**(9): 2109-2119.
- Torres, S. J. and C. A. Nowson (2007). "Relationship between stress, eating behavior, and obesity." Nutrition **23**(11-12): 887-894.
- Tressou-Cosmao, J., S. Pasteau, C. Le Guillou and N. Simon (2015). "Analyse des apports nutritionnels en acides gras de la population française à partir des données INCA 2 " (4): 16.
- Tsuchiya, A., T. Kanno and T. Nishizaki (2014). "PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway." The Journal of endocrinology **220**(1): 49-59.
- Tu, W. C., R. J. Cook-Johnson, M. J. James, B. S. Muhlhausler and R. A. Gibson (2010). "Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **83**(2): 61-68.
- Turinsky, J., D. M. O'Sullivan and B. P. Bayly (1990). "1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo." The Journal of biological chemistry **265**(28): 16880-16885.
- Utter, J., D. Neumark-Sztainer, R. Jeffery and M. Story (2003). "Couch potatoes or french fries: are sedentary behaviors associated with body mass index, physical activity, and dietary behaviors among adolescents?" J Am Diet Assoc **103**(10): 1298-1305.
- Van Harmelen, V., P. Ariapart, J. Hoffstedt, I. Lundkvist, S. Bringman and P. Arner (2000). "Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity." Obes Res **8**(4): 337-341.
- Van Harmelen, V., S. Reynisdottir, P. Eriksson, A. Thorne, J. Hoffstedt, F. Lonnqvist and P. Arner (1998). "Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women." Diabetes **47**(6): 913-917.
- van Rooy, M. J. and E. Pretorius (2014). "Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events." Curr Med Chem **21**(19): 2121-2129.
- Vasickova, L., P. Stavek and P. Suchanek (2011). "Possible effect of DHA intake on body weight reduction and lipid metabolism in obese children." Neuro endocrinology letters **32 Suppl 2**: 64-67.
- Vazquez-Vela, M. E., N. Torres and A. R. Tovar (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." Arch Med Res **39**(8): 715-728.
- Veerman, J. L., E. F. Van Beeck, J. J. Barendregt and J. P. Mackenbach (2009). "By how much would limiting TV food advertising reduce childhood obesity?" European journal of public health **19**(4): 365-369.

- Veilleux, A., M. Caron-Jobin, S. Noel, P. Y. Laberge and A. Tchernof (2011). "Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women." Diabetes **60**(5): 1504-1511.
- Viner, R. and D. Nicholls (2005). "Managing obesity in secondary care: a personal practice." Arch Dis Child **90**(4): 385-390.
- Viswakarma, N., S. Yu, S. Naik, P. Kashireddy, K. Matsumoto, J. Sarkar, S. Surapureddi, Y. Jia, M. S. Rao and J. K. Reddy (2007). "Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma." The Journal of biological chemistry **282**(25): 18613-18624.
- Vu, V., W. Kim, X. Fang, Y. T. Liu, A. Xu and G. Sweeney (2007). "Coculture with primary visceral rat adipocytes from control but not streptozotocin-induced diabetic animals increases glucose uptake in rat skeletal muscle cells: role of adiponectin." Endocrinology **148**(9): 4411-4419.
- Wagner, A., C. Simon, B. Morio, J. Dallongeville, J. B. Ruidavets, B. Haas, B. Laillet, D. Cottel, J. Ferrieres and D. Arveiler (2015). "Omega-3 index levels and associated factors in a middle-aged French population: the MONA LISA-NUT Study." European journal of clinical nutrition **69**(4): 436-441.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." Endocrine reviews **21**(6): 697-738.
- Wall, R., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald and C. Stanton (2010). "Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids." Nutrition reviews **68**(5): 280-289.
- Wanders, R. J. (2014). "Metabolic functions of peroxisomes in health and disease." Biochimie **98**: 36-44.
- Wang, Y., K. A. Kim, J. H. Kim and H. S. Sul (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." The Journal of nutrition **136**(12): 2953-2956.
- Wang, Y., E. B. Rimm, M. J. Stampfer, W. C. Willett and F. B. Hu (2005). "Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men." The American journal of clinical nutrition **81**(3): 555-563.
- Wang, Y. C., P. Coxson, Y. M. Shen, L. Goldman and K. Bibbins-Domingo (2012). "A penny-per-ounce tax on sugar-sweetened beverages would cut health and cost burdens of diabetes." Health Aff (Millwood) **31**(1): 199-207.
- Weber, G. (1952). "Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method." The Biochemical journal **51**(2): 145-155.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." The Journal of clinical investigation **112**(12): 1796-1808.
- Welle, S., R. G. Schwartz and M. Statt (1991). "Reduced metabolic rate during beta-adrenergic blockade in humans." Metabolism: clinical and experimental **40**(6): 619-622.
- White, P. J., M. Arita, R. Taguchi, J. X. Kang and A. Marette (2010). "Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice." Diabetes **59**(12): 3066-3073.
- White, P. J., P. St-Pierre, A. Charbonneau, P. L. Mitchell, E. St-Amand, B. Marcotte and A. Marette (2014). "Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis." Nature medicine **20**(6): 664-669.
- Widberg, C. H., F. S. Newell, A. W. Bachmann, S. N. Ramnoruth, M. C. Spelta, J. P. Whitehead, L. J. Hutley and J. B. Prins (2009). "Fibroblast growth factor receptor 1 is

- a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **296**(1): E121-131.
- Williams, A. J., W. E. Henley, C. A. Williams, A. J. Hurst, S. Logan and K. M. Wyatt (2013). "Systematic review and meta-analysis of the association between childhood overweight and obesity and primary school diet and physical activity policies." Int J Behav Nutr Phys Act **10**: 101.
- Wood, J. D. and M. Enser (1997). "Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality." The British journal of nutrition **78 Suppl 1**: S49-60.
- Wu, Z. and S. Wang (2013). "Role of kruppel-like transcription factors in adipogenesis." Dev Biol **373**(2): 235-243.
- Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." The Journal of clinical investigation **112**(12): 1821-1830.
- Xu, X., H. Zeng, D. Xiao, H. Zhou and Z. Liu (2013). "Genome wide association study of obesity." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **38**(1): 95-100.
- Yan, J., L. Liu, Y. Zhu, G. Huang and P. P. Wang (2014). "The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis." BMC public health **14**: 1267.
- Yeop Han, C., A. Y. Kargi, M. Omer, C. K. Chan, M. Wabitsch, K. D. O'Brien, T. N. Wight and A. Chait (2010). "Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation." Diabetes **59**(2): 386-396.
- Young, L. R. and M. Nestle (2002). "The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic." Am J Public Health **92**(2): 246-249.
- Youngson, N. A. and M. J. Morris (2013). "What obesity research tells us about epigenetic mechanisms." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **368**(1609): 20110337.
- Yu, Z. B., S. P. Han, G. Z. Zhu, C. Zhu, X. J. Wang, X. G. Cao and X. R. Guo (2011). "Birth weight and subsequent risk of obesity: a systematic review and meta-analysis." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity **12**(7): 525-542.
- Yvan-Charvet, L., F. Massiera, N. Lamande, G. Ailhaud, M. Teboul, N. Moustaid-Moussa, J. M. Gasc and A. Quignard-Boulangue (2009). "Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue." Endocrinology **150**(3): 1421-1428.
- Yvan-Charvet, L. and A. Quignard-Boulangue (2011). "Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity." Kidney international **79**(2): 162-168.
- Zamani, N. and C. W. Brown (2011). "Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure." Endocrine reviews **32**(3): 387-403.
- Zaragosi, L. E., G. Ailhaud and C. Dani (2006). "Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells." Stem Cells **24**(11): 2412-2419.
- Zhang, L., W. Keung, V. Samokhvalov, W. Wang and G. D. Lopaschuk (2010). "Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle." Biochimica et biophysica acta **1801**(1): 1-22.
- Zhao, M. and X. Chen (2014). "Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes." Biochemical and biophysical research communications **450**(4): 1446-1451.

Zheng, Z., X. Liu, Q. Zhao, L. Zhang, C. Li and Y. Xue (2014). "Regulation of UCP1 in the Browning of Epididymal Adipose Tissue by beta3-Adrenergic Agonist: A Role for MicroRNAs." International journal of endocrinology **2014**: 530636.



## Résumé

L'obésité est un état physiopathologique d'origine multifactorielle caractérisé par une accumulation excessive de tissu adipeux (TA). Elle est associée à une augmentation du risque de développer une insulino-résistance (IR), un syndrome métabolique et, à terme, un diabète de type 2. L'altération des fonctions du TA au cours de l'obésité joue un rôle central dans l'apparition des troubles métaboliques, tels qu'une accumulation ectopique de graisse et une IR périphérique, notamment dans le muscle. Dans ce contexte, la qualité des apports énergétiques et plus précisément en lipides pourrait jouer un rôle important dans l'adaptation des tissus au cours de l'obésité. Ainsi le palmitate (PAL), un acide gras saturé (AGS) est pro-lipogénique, pro-inflammatoire et lipotoxique, ce qui favorise l'apparition d'une IR. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 ( $\omega$ 3) auraient des effets antagonistes au PAL et donc potentiellement protecteurs vis-à-vis des perturbations métaboliques associées à l'obésité. Parmi les  $\omega$ 3, les effets spécifiques des trois principaux acides gras alimentaires, les acides alpha-linolénique (ALA), éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), ont été très peu décrits.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier les effets propres de l'ALA, de l'EPA et du DHA sur les altérations métaboliques induites en situation d'obésité. Des explorations mécanistiques ont été réalisées sur les cellules musculaires C2C12 dans lesquelles l'IR a été induite par le PAL et sur des adipocytes 3T3-L1 pour étudier l'impact des AGPI  $\omega$ 3 sur la différenciation adipocytaire. Les effets des AGPI  $\omega$ 3 ont ensuite été étudiés *in vivo*, en supplémentant des souris C57BL/6 sauvages ou déficientes en leptine (*ob/ob*) lors de la consommation d'un régime obésogène riche en lipides et en sucrose (mimant un régime occidental).

Dans les cellules musculaires C2C12, les trois  $\omega$ 3 co-incubés avec le PAL ont induit de façon comparable une diminution du contenu en composés lipotoxiques et une amélioration de la captation du glucose, mais seuls l'EPA et le DHA ont restauré la  $\beta$ -oxydation du PAL et l'activation de la voie de signalisation de l'insuline. De plus, l'EPA et le DHA ont eu un effet protecteur supérieur à l'ALA vis-à-vis de l'inflammation induite par le PAL. Dans le modèle *in vivo*, seul la supplémentation en EPA a amélioré l'homéostasie du glucose en comparaison avec les suppléments en ALA et en DHA. Alors que l'EPA a réduit la prise de masse grasse, le DHA a induit une hypertrophie des cellules adipeuses associée à une augmentation de la sécrétion de leptine et une baisse de la sécrétion d'adiponectine. Dans un modèle d'adipocytes 3T3-L1 en culture, le DHA a accéléré la différenciation des préadipocytes en comparaison avec l'ALA et l'EPA, pouvant expliquer son effet hypertrophique *in vivo*.

En conclusion et dans nos conditions expérimentales, les  $\omega$ 3 ALA, EPA et DHA ont bien des effets communs sur le métabolisme lipidique et glucidique *in vitro* mais également des effets propres qui ont permis de montrer qu'une supplémentation nutritionnelle en EPA serait plus intéressante pour limiter l'IR *in vivo* par rapport au DHA ou à l'ALA. Le DHA a quant à lui favorisé l'hypertrophie du TA, perturbant ainsi la sécrétion des adipokines participant à la régulation de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, comme le muscle squelettique.

**Mots clés :** acides gras oméga-3, résistance à l'insuline, obésité, syndrome métabolique