



# Impact d'une déficience en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 sur les comportements émotionnels et la plasticité cérébrale chez la souris

Thomas Larrieu

## ► To cite this version:

Thomas Larrieu. Impact d'une déficience en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 sur les comportements émotionnels et la plasticité cérébrale chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2012. Français. NNT: . tel-02807435

**HAL Id: tel-02807435**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02807435>**

Submitted on 6 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.

**Université Bordeaux Segalen**  
**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

Année 2012

Thèse n° 2000

**THESE**

Pour le

**DOCTORAT de l'UNIVERSITE de BORDEAUX 2**

Mention : **Sciences, Technologies, Santé**

Option : **Neurosciences**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 07 décembre 2012

Par **Thomas, Didier LARRIEU**

Né le 08 Avril 1984 à Chatenay Malabry (92)

---

**Impact d'une déficience en acides gras polyinsaturés  
(AGPI) de la série n-3 sur les comportements  
émotionnels et la plasticité cérébrale chez la souris**

---

**Membres du jury**

Pr. Daniel VOISIN  
Dr. Richard P BAZINET  
Dr. Olivier BERTON  
Dr. Olivier MANZONI  
Dr. Sophie LAYE

Professeur de l'université de Bordeaux  
Professeur associé de l'université de Toronto  
Assistant professeur, Philadelphie  
Directeur de recherche, INSERM Marseille  
Directeur de recherche, INRA Bordeaux

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse

**Université Bordeaux Segalen**

**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

Année 2012

Thèse n° 2000

**THESE**

Pour le

**DOCTORAT de L'UNIVERSITE de BORDEAUX 2**

Mention : **Sciences, Technologies, Santé**

Option : **Neurosciences**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 07 décembre 2012

Par **Thomas, Didier LARRIEU**

Né le 08 Avril 1984 à Chatenay Malabry (92)

---

**Impact d'une déficience en acides gras polyinsaturés  
(AGPI) de la série n-3 sur les comportements  
émotionnels et la plasticité cérébrale chez la souris**

---

**Membres du jury**

Pr. Daniel VOISIN  
Dr. Richard P BAZINET  
Dr. Olivier BERTON  
Dr. Olivier MANZONI  
Dr. Sophie LAYE

Professeur de l'université de Bordeaux  
Professeur associé de l'université de Toronto  
Assistant professeur, Philadelphie  
Directeur de recherche, INSERM Marseille  
Directeur de recherche, INRA Bordeaux

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse

---

## Remerciements

---

Entreprendre l'écriture des remerciements est assez émouvant. Cela signifie que trois années ont passé. Trois années de travail qui s'achèvent maintenant, trois années pendant lesquelles j'ai pu goûter aux joies de la recherche en tant que doctorant. Oui, aux « joies de la recherche », sans avoir à trop me soucier de financements et de politique pour mener à bien mon projet. En écrivant ce préambule, je ne peux m'empêcher de me remémorer le parcours qui m'a amené à écrire ces remerciements. Une fois n'est pas coutume, je commencerai par la fin.

J'exprime ma sincère reconnaissance à tous les membres du jury de me faire l'honneur d'assister à ma soutenance :

Je tiens à remercier le **Pr Daniel Voisin** de m'avoir fait l'honneur de présider cette soutenance de thèse. Merci Daniel de nous avoir soutenus, moi et les autres durant toutes ces années de master et de thèse. Je suis ravi de ta présence en ce jour où je m'apprête à fermer un chapitre de ma vie.

Merci aux **Dr Olivier Berton** et **Richard Bazinet** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je suis heureux de pouvoir partager ces trois années de mon travail avec vous.

J'adresse également mes très sincères remerciements au **Dr Olivier Manzoni**, examinateur de cette thèse. Merci pour cette belle collaboration, en espérant interagir à nouveau avec vous et faire avancer la recherche.

Je te remercie, **Sophie Layé** du plus profond du cœur, pour m'avoir guidé et avoir su diriger avec brio cette thèse en Neurosciences. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire ce lundi 8 septembre 2009 par l'intermédiaire d'Agnès Nadjar qui m'a mis en relation avec toi (merci Agnès !). Merci de m'avoir accordé toute ta confiance dans la réalisation de mon travail de thèse. J'ai su immédiatement que tu étais une personne joviale, amusante, pétillante, pleine de vie et surtout, animée d'une grande passion pour la recherche, passion si forte qu'elle a déteint sur moi. Tu es parvenue à me faire aimer plus que tout la recherche. D'une simple phrase, tu as balayé mes doutes et mes craintes. Merci aussi de m'avoir enseigné patiemment l'art de la communication scientifique par l'écriture d'articles en anglais, de projets et du manuscrit de thèse. Je me doute bien que cela n'a pas dû être toujours facile car mon style lyrique t'agace parfois un tantinet. Le français est une si belle langue, tellement riche qu'il peut être frustrant de ne se contenter que d'un sujet, d'un verbe et d'un

complément. Tu mets un point d'honneur à l'apprentissage de l'écriture scientifique et tu dis souvent que « la rédaction d'un papier occupe 95% de l'expérimentation » alors autant savoir bien raconter son histoire. Maintenant, je souhaiterais ne pas te remercier de t'être raillée ouvertement de ma coupe de cheveux pendant des mois, mois durant lesquels mes cheveux n'ont cessés de pousser et durant lesquels tu m'as affublé du nom de « Shogun » en raison de ma petite queue de cheval. Quel bonheur de travailler avec toi et de t'avoir rencontré ! Pour toutes ces raisons, cette thèse t'est dédiée.

Mais notre rencontre Sophie n'aurait sans doute jamais eu lieu si je n'avais pas réalisé mon stage de licence de biologie dans le service du **Dr Olivier Bergis**, chercheur chez Sanofi-Aventis et ami. C'est grâce à toi Olivier, grâce à la passion qui t'anime, à ton soutien et à tes encouragements, que la recherche en neurosciences s'est imposée à moi comme une évidence. Pour toutes ces raisons, cette thèse t'est dédiée.

Ce stage sous ta direction, Olivier, c'est l'aboutissement du premier cycle en licence de biologie, que j'avais choisi de suivre. Ce choix de cursus universitaire m'est apparu en terminale grâce à mon enseignante de sciences de la vie et de la terre **Claudine Granbois**, qui a su transcender cette matière par ses cours si vivants et si passionnants. Une fois encore, la passion d'un métier m'a touchée. Claudine, je me rappelle de ce voyage scolaire dans les Alpes « à la recherche de l'océan perdu ». Ce voyage a fait naître en moi une envie insatiable d'apprendre. Quelle meilleure façon d'apprendre que de faire de la recherche ? Pour toutes ces raisons, cette thèse t'est dédiée.

Revenons maintenant au présent. En plus d'avoir été dirigé par une directrice de thèse formidable, j'ai eu le bonheur d'être entouré de personnes, au sein du laboratoire, qui me sont devenues chères. Je souhaiterais remercier chaleureusement mes collègues et amis : **Julie Lasselin-Desaine**, notre « ptite julie » et nounou administrative que je remercie également pour toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues, **Jean-Christophe Delpech** qui a su être un témoin de mariage admirable, **Charlotte Madore** (Chacha) pour sa bonne humeur et son rire facile, légendaire, tellement communicatif. Merci Charlotte d'avoir été une si bonne partenaire scientifique (clin d'œil au « 2 week paper »). Merci à **Laurent Ladépêche** (Lau), **Anael Chazeau**, **Leslie Subrin**, **Michael Garcia**, mes amis depuis 5 ans déjà avec qui j'ai partagé de très bons moments ici comme ailleurs. Ce fût grâce à vous tous, des années inoubliables !

Je tiens à remercier chaleureusement le **Dr Guillaume Ferreira** pour sa « cool attitude », son expertise dans les neurosciences comportementales et son investissement précieux dans la recherche d'un postdoc. Je remercie également tous les autres membres du laboratoire avec qui j'ai partagé ces trois ans, Lucile Capuron, **Agnès Nadjar** sans qui je n'aurais jamais pu rencontrer ma directrice de thèse, Nathalie Castanon, Corinne Joffre, Muriel Darnaudery, Véronique De Smedt, Helen Beyer, Julie Sauvant, Agnès Aubert, Sandra Dexpert, Philippe Birac, Claudine Tridon, Fabrice Casenave, Julie Remus, Anne-Laure Diné, Chloé Boitard, Amandine Lepinay, Véronique Pallet, Marie-Pierre Moisan, Nathalie Arvy, Pauline Lafenêtre, Jean-Christophe Helbling, Aline Foury, **Amandine Mini** et ses mojitos légendaires, Julie Brossaud, Anne Letondor et Benjamin Bonhomme.

Un merci spécial à **Mathieu Cadet** qui m'a apporté une aide précieuse pendant la rédaction de ma thèse. Merci Mathieu d'avoir été plus que disponible.

Un énorme merci à tout le staff administratif sans qui cette thèse n'aurait pas été parfaite, **Stéphanie Dechery**, **Julie desboeuf**, **Catherine Noel Suberville** et enfin la maman de tous les thésards, **Marie-Pierre Manain** qui a su si bien s'occuper de nous.

**Papa, Maman, S urette**, merci à vous pour vos encouragements constants, merci d'avoir cru en moi, même si vous me destiniez d'avantage à devenir artiste que chercheur du temps du lycée. Merci de vous être tant intéressés à ma thèse et aux oméga-3.

Enfin je souhaiterais remercier ma chère femme, **Muna Hilal-Larrieu** sans qui je me serais sans doute effondré à maintes reprises dans les abîmes du doute et de l'angoisse. Muna, merci pour tout ton amour et ton précieux soutien. Selon un mythe, nous, les êtres humains, aurions été constitués à l'origine de quatre bras, quatre jambes et de deux têtes. Zeus, qui aurait craint notre potentiel pouvoir, nous aurait coupés en deux, nous condamnant ainsi à passer le reste de notre existence à rechercher notre moitié injustement volé. Voilà, je pense que cette petite histoire se suffit à elle-même pour exprimer ce que je ressens. Tu es mon amie, ma femme, mon tout, mon autre moi, je t'aime... Pour toutes ces raisons, cette thèse t'es dédiée.

---

## Liste des publications

---

Lafourcade M\*, **Larrieu T**\*, Mato S\*, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Laye S<sup>#</sup>, Manzoni OJ<sup>#</sup> (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. Nat Neurosci 14:345-350. \*Ces personnes se partagent la place de premier auteur, <sup>#</sup> Ces personnes se partagent la place de dernier auteur

Laye S, Delpech JC, DeSmedt-Peyrusse V, Joffre C, **Larrieu T**, Madore C, Nadjar A, Capuron L (2011). Neuroinflammation and aging: influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid. OCL 2011; xx(x): 1-6. doi : 10.1684/ocl.2011.0412

**Larrieu T**\*, Madore C\*, Joffre C and Laye S (2012). Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signalling pathway in the brain and associated anxiety-like behaviour in mice. Journal of physiology and biochemistry, special issue CTP. \* Ces personnes se partagent la place de premier auteur

**Larrieu T**, Hilal M, Desmedt-Peurusse V, Sans N and Laye S. Alterations in prefrontal cortex dendritic arborization and emotional behavior in n-3 polyunsaturated fatty acids deficient mice reveal corticosterone involvement. Soumis

---

## Liste des communications orales

---

**Larrieu T** and Laye S Anxiety and depressive-like symptoms induced by n-3 polyunsaturated fatty acids dietary deficiency: what are the mechanisms? 5ème symposium Nutrition & Neurosciences, NeuroCentre Magendi Université Bordeaux2, 2 Avril 2012

**Larrieu T** et Laye S Les oméga-3, des lipides qui nous veulent du bien ! 12<sup>ème</sup> journée scientifique de l'école doctorale sciences de la vie et de la santé, Palais des congrès, Arcachon, 28 Mars 2012

**Larrieu T** and Laye S Polyunsaturated fatty acids (omega-3 & omega-6) and chronic stress: when plasticity comes into it ! 8ème symposium organisé par la Communauté de Travail des Pyrénées (CTP) 1<sup>er</sup> Décembre 2011

**Larrieu T** et Laye S Les acides gras polyinsaturés (omega-3 & omega-6) et stress chronique : quand la plasticité s'en mêle ! 1<sup>ère</sup> journée doctorants/post-doctorants NutriNeuro 7 Novembre 2011

---

## Liste des communications affichées

---

**Larrieu T**, Hilal M, Gregoire S, Bretillon L, Sans N and Laye S Anxiety-like symptoms induced by n-3 polyunsaturated fatty acids dietary deficiency: what are the mechanisms? Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Palais des Congrès d'Arcachon 28 Mars 2012

**Larrieu T**, Joffre C, Gregoire S, Bretillon L, Manzoni O and Laye S Nutritional omega-3 deficiency and emotional behaviors. 10ème colloque de la société française des neurosciences (SFN) à Marseille 24-27 Mai 2011

**Larrieu T**, Joffre C, Gregoire S, Bretillon L, Manzoni O and Laye S Nutritional omega-3 deficiency and emotional behaviors : a role of CB1R ? Journée Chevreul 2011 « Lipids and Brain » organisée par la Société Française pour l'Etude des Lipides (SFEL) à Paris 28-30 Mars 2011

Joffre C, Darnaudéry M, **Larrieu T**, Acar N, Bretillon L, Guesnet P, Parnet P and Laye S Impact of perinatal high fat diet on metabolic parameters, visual function and behaviour in adulthood Journée Chevreul 2011 « Lipids and Brain » organisée par la Société Française pour l'Etude des Lipides (SFEL) à Paris 28-30 Mars 2011

---

## Abstract

---

Low dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has been associated with the prevalence of mood disorders in humans. In rodents, nutritional approaches aiming at modeling poor dietary n-3 PUFAs intake have been extensively developed in the last century. As a result, one- or multi-generation dietary n-3 deficiency induces depressive and anxiety-like behaviors. We have shown in the Nutrineuro lab that mice fed with a diet deficient in n-3 PUFAs exhibit decreased n-3 PUFAs levels, especially docosahexaenoic acid (DHA, a n-3 PUFA) levels in the prefrontal cortex (PFC) and in the nucleus accumbens (NAc). We showed that dietary n-3 PUFA is able to modulate endocannabinoid (eCB) dependent plasticity since DHA reduction in PFC and NAc is accompanied with eCB dependent long term depression (eCB-LTD) and eCB signaling impairment in the PFC (Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). Our data indicate that LTD alteration results from region-specific uncoupling of CB1 receptor from its effector Gi/o protein. In addition, n-3 deficient mice display behavioral deficits in several tests measuring emotional behavior. To further understand the mechanisms underlying DHA decrease in the PFC and emotional behavior alteration, we thoroughly investigated neuronal morphology and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in n-3 deficient mice. We showed that n-3 deficient diet induced dendritic atrophy in pyramidal neurons within the PFC. The dendritic atrophy was comparable to the one measured in control diet mice submitted to chronic social defeat stress (CSDS). No additional effect of CSDS on both neuronal morphology and emotional behavior was measured in n-3 deficient mice. We therefore investigated the role of the HPA axis deregulation in the development of behavioral and neurobiological alterations of n-3 deficient mice. We found a decreased expression of glucocorticoid receptor (GR) in the PFC of n-3 deficient mice together with increased circulating levels of corticosterone. Collectively, we unraveled one crucial mechanism underlying n-3 deficiency-induced alterations. Our results show that low dietary n-3 PUFAs can alter eCB-dependent plasticity and neuronal dendritic atrophy within the PFC leading to emotional behavior impairment. Importantly, we further demonstrated that corticosterone elevation in *n*-3 deficient mice was involved in the *n*-3 deficiency-induced emotional behavior and dendritic arborization alterations.

---

## Résumé

---

Un faible apport alimentaire en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 a été associé à la prévalence des troubles de l'humeur chez l'Homme. Chez les rongeurs, les approches nutritionnelles visant à modéliser une alimentation pauvre en AGPI n-3 ont largement été développées au siècle dernier. En effet, un régime alimentaire carencé en AGPI n-3 sur une ou plusieurs générations induit chez le rongeur des altérations des comportements émotionnels tels que des comportements de type dépressif ou anxieux. Nous avons montré au laboratoire Nutrineuro que des souris nourries avec un régime déficient en AGPI n-3 présentent des niveaux d'AGPI n-3, en particulier l'acide docosahexaénoïque (DHA, un AGPI n-3) plus faible dans le cortex préfrontal (PFC) et dans le noyau accumbens (NAc) par rapport aux souris contrôle. De plus, nous avons pu mettre en évidence qu'une alimentation déficiente en AGPI n-3 est capable de moduler la plasticité synaptique dépendante du système endocannabinoïde (eCB). De fait, la réduction de DHA dans le CPF et le NAc est accompagnée d'une altération de la dépression à long terme (LTD-eCB) et des voies de signalisation dépendantes du système eCB au niveau du CPF (Lafourcade et al., 2011 ; Larrieu et al, 2012). Nos données indiquent que ces altérations sont dues à un découplage entre le récepteur cannabinoïde 1 (CB1R) et la protéine Gi/o. De plus, les souris déficientes en AGPI n-3 présentent des déficits comportementaux dans plusieurs tests évaluant les comportements émotionnels. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la diminution du DHA dans le CPF et les altérations des comportements émotionnels, nous avons étudié la morphologie neuronale dans le CPF et l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) chez les souris déficientes en AGPI n-3. Nous avons montré que le régime alimentaire déficient en AGPI n-3 induit une atrophie de l'arborisation dendritique dans les neurones pyramidaux du CPF. L'atrophie dendritique est semblable à celle mesurée chez les souris soumises au régime équilibré en AGPI n-3 et soumises à un stress chronique de défaite sociale (CSDS). Aucun effet additionnel du CSDS sur la morphologie neuronale et le comportement émotionnel n'a été observé chez les souris déficientes en AGPI n-3. Nous avons ensuite étudié le rôle de l'axe HPA dans le développement des altérations comportementales et neurobiologiques chez les souris déficientes en AGPI n-3. Ces souris présentent une diminution de l'expression des récepteurs des glucocorticoïdes (GR) dans le CPF associée à une augmentation des taux circulants de corticostérone. Dans leur ensemble, nos résultats montrent qu'un faible apport alimentaire en AGPI n-3 peut modifier la plasticité synaptique dépendante du système eCB ainsi que l'arborisation dendritique des neurones du CPF. Nous

avons également pu montrer que l'élévation des niveaux de corticostérone était impliquée dans l'altération des comportements émotionnels observée chez des souris nourries avec un régime déficient en AGPI n-3.

---

# Sommaire

---

# **I. SOMMAIRE**

|              |                                                                                                       |            |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.</b>    | <b>SOMMAIRE .....</b>                                                                                 | <b>2</b>   |
| <b>II.</b>   | <b>ABREVIATIONS .....</b>                                                                             | <b>4</b>   |
| <b>III.</b>  | <b>CONTEXTE NUTRITIONNEL GENERAL .....</b>                                                            | <b>9</b>   |
| 1.           | LES ACIDES GRAS POLYINSATURES (AGPI) .....                                                            | 9          |
| 2.           | AGPI DANS LE CERVEAU .....                                                                            | 11         |
| A.           | Statut lipidique cérébral .....                                                                       | 11         |
| B.           | Les AGPI s'accumulent dans le cerveau au cours du développement .....                                 | 12         |
| C.           | Conséquences d'une baisse d'apport alimentaire en AGPI sur la composition lipidique<br>cérébrale..... | 13         |
| D.           | Fonctions biochimiques et physiologiques .....                                                        | 14         |
| E.           | AGPI et nutrition lipidique .....                                                                     | 17         |
| <b>IV.</b>   | <b>AGPI N-3 ET TROUBLES DE L'HUMEUR.....</b>                                                          | <b>20</b>  |
| 1.           | ETUDES CLINIQUES .....                                                                                | 20         |
| 2.           | ETUDES PRECLINIQUES .....                                                                             | 22         |
| <b>V.</b>    | <b>AGPI N-3 ET MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES TROUBLES EMOTIONNELS 27</b>                         |            |
| 1.           | AGPI N-3 ET SYSTEMES DE NEUROTRANSMISSION.....                                                        | 27         |
| 2.           | AGPI N-3 ET PLASTICITE CEREBRALE.....                                                                 | 28         |
| 3.           | AGPI N-3 ET AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE.....                                                        | 31         |
| A.           | L'axe hypothalamo-hypophysaire.....                                                                   | 31         |
| B.           | Axe HPA, troubles de l'humeur et AGPI n-3.....                                                        | 35         |
| 4.           | AGPI N-3 ET SYSTEME ENDOCANNABINOÏDE (ECB) .....                                                      | 37         |
| A.           | présentation du système eCB.....                                                                      | 37         |
| B.           | Système eCB et modulation de l'axe HPA.....                                                           | 43         |
| C.           | Système eCB et comportements émotionnels .....                                                        | 45         |
| D.           | Système eCB et arborisation dendritique.....                                                          | 47         |
| <b>VI.</b>   | <b>HYPOTHESE ET OBJECTIF.....</b>                                                                     | <b>50</b>  |
| <b>VII.</b>  | <b>RESULTATS .....</b>                                                                                | <b>52</b>  |
| 1.           | ETUDE DE L'OBJECTIF 1 (ARTICLE 1).....                                                                | 52         |
| 2.           | ETUDE DE L'OBJECTIF 2 (ARTICLE 2).....                                                                | 66         |
| 3.           | ETUDE DE L'OBJECTIF 3 (ARTICLE 3).....                                                                | 80         |
| <b>VIII.</b> | <b>DISCUSSION GENERALE .....</b>                                                                      | <b>109</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>CONCLUSION.....</b>                                                                                | <b>121</b> |

---

# Abréviations

---

## II. ABREVIATIONS

| Acronymes       | Sens                                      |
|-----------------|-------------------------------------------|
| <b>SNC</b>      | Système nerveux central                   |
| <b>PL</b>       | Phospholipide                             |
| <b>AGS</b>      | Acide gras saturé                         |
| <b>AGMI</b>     | Acide gras monoinsaturé                   |
| <b>AGPI</b>     | Acide gras polyinsaturé                   |
| <b>ALA</b>      | Acide alpha linoléique                    |
| <b>LA</b>       | Acide linoléique                          |
| <b>AGPI-LC</b>  | Acide gras polyinsaturé à longues chaînes |
| <b>AA</b>       | Acide arachidonique                       |
| <b>EPA</b>      | Acide eicosapentaénoïque                  |
| <b>DHA</b>      | Acide docosahexaénoïque                   |
| <b>DHEA</b>     | Docosahexaenoylethanolamide               |
| <b>AGT</b>      | Acides gras totaux                        |
| <b>CPF</b>      | Cortex préfrontal                         |
| <b>DPA</b>      | Acide docosapentaénoïque                  |
| <b>HC</b>       | Hippocampe                                |
| <b>AG</b>       | Acide gras                                |
| <b>RCPG</b>     | Récepteurs couplés aux protéines G        |
| <b>PLA2</b>     | Phospholipase A2                          |
| <b>COX</b>      | Cyclooxygénases                           |
| <b>LOX</b>      | Lipoxygénases                             |
| <b>PGE2</b>     | Prostaglandine E2                         |
| <b>PGE3</b>     | Prostaglandine E3                         |
| <b>LTB4</b>     | Leucotriène B4                            |
| <b>LTB5</b>     | Leucotriène B5                            |
| <b>RvE1</b>     | Résolvine E1                              |
| <b>RvD1</b>     | Résolvine D1                              |
| <b>NPD1</b>     | Neuroprotéctine D1                        |
| <b>NFkappaB</b> | Nuclear factor kappa B                    |
| <b>LPS</b>      | Lipopolysaccharide                        |

|                                |                                                        |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>IL-1 <math>\beta</math></b> | Interleukine-1 $\beta$                                 |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>  | Tumor necrosis factor $\alpha$ »                       |
| <b>IL-6</b>                    | Interleukine-6                                         |
| <b>cPLA2</b>                   | Cytosolic phospholipases A2                            |
| <b>COX-2</b>                   | Cyclooxygénases-2                                      |
| <b>AEA</b>                     | Anandamide                                             |
| <b>2-AG</b>                    | 2-arachidonoyl glycérol                                |
| <b>eCB</b>                     | Endocannabinoïde                                       |
| <b>ANSES</b>                   | Agence nationale de sécurité sanitaire                 |
| <b>DSM IV</b>                  | Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders |
| <b>MDD</b>                     | Major depressive disorder                              |
| <b>ESPT</b>                    | Etat de stress post-traumatique                        |
| <b>SAD</b>                     | social anxiety disorders                               |
| <b>EPM</b>                     | Elevated plus maze                                     |
| <b>FST</b>                     | Forced swimming test                                   |
| <b>BDNF</b>                    | Brain Derived Neurotrophic Factor                      |
| <b>CREB</b>                    | Cyclic AMP-dependent response element binding protein  |
| <b>MAPK</b>                    | Mitogen-activated protein kinase                       |
| <b>LTP</b>                     | Long term potentiation                                 |
| <b>NMDA</b>                    | N-méthyl-D-aspartate                                   |
| <b>PKC</b>                     | Protéine kinase C                                      |
| <b>5-HT2</b>                   | Récepteurs sérotonine-2                                |
| <b>VMAT<sub>2</sub></b>        | Vesicular Monoamine Transporteur                       |
| <b>PI3K</b>                    | Phosphoinositdide-3 kinase                             |
| <b>PKB</b>                     | Protéine kinase B                                      |
| <b>AMY</b>                     | Amygdale                                               |
| <b>GCs</b>                     | Glucocorticoïdes                                       |
| <b>CA3</b>                     | Corne d'Ammon 3                                        |
| <b>PVN</b>                     | Paraventriculaire nucleus                              |
| <b>POMC</b>                    | Pro-opiomelanocortin                                   |
| <b>CRH</b>                     | Corticotropine hormone                                 |
| <b>ACTH</b>                    | Adrenocorticotropine hormone                           |
| <b>GR</b>                      | Glucocorticoid receptor                                |

|                                  |                                                  |
|----------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>MR</b>                        | Mineralocorticoid receptor                       |
| <b>HSP90</b>                     | Heat shock protein, 90                           |
| <b>ADN</b>                       | Acide désoxyribonucléique                        |
| <b>GRE</b>                       | Glucocorticoid response element                  |
| <b>nGRE</b>                      | negative Glucocorticoid response element         |
| <b>BSA</b>                       | Bovine serum albumin                             |
| <b>HPA</b>                       | Hypothalamo-pituitary axis                       |
| <b>CB1R</b>                      | Cannabinoid 1 receptor                           |
| <b>ARNm</b>                      | Acide ribonucléique messenger                    |
| <b>BLA</b>                       | Noyau Basolatéral de l'amygdale                  |
| <b>HT</b>                        | Hypothalamus                                     |
| <b>SGK1</b>                      | Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1      |
| <b><math>\Delta^9</math>-THC</b> | $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol                  |
| <b>NAc</b>                       | Noyau accumbens                                  |
| <b>GABA</b>                      | Acide gamma-aminobutyrique                       |
| <b>AC</b>                        | Adenylate cyclase                                |
| <b>AMPC</b>                      | Adénosine monophosphate cyclique                 |
| <b>JNK</b>                       | c-jun N-terminal kinase                          |
| <b>K<sub>IR</sub></b>            | Canaux potassiques de la rectification entrante  |
| <b>GRK</b>                       | G proteins regulated kinases                     |
| <b>PC</b>                        | Phosphatidylecholine                             |
| <b>PE</b>                        | Phosphatidyléthanolamine                         |
| <b>NAT</b>                       | N-acyltransférase                                |
| <b>NArPE</b>                     | N-arachidonoylphosphatidyléthanolamine           |
| <b>PI</b>                        | Phosphatidylinositol                             |
| <b>DAG</b>                       | Diacylglycerol                                   |
| <b>FAAH</b>                      | Fatty acid amide hydrolase                       |
| <b>EtNH2</b>                     | Ethanolamine                                     |
| <b>MAGL</b>                      | Monoacylglycérol lipase                          |
| <b>DSI</b>                       | Depolarization induced suppression of inhibition |
| <b>DSE</b>                       | Depolarization induced suppression of excitation |
| <b>LTD</b>                       | Long term depression                             |
| <b>NT</b>                        | Neurotransmetteurs                               |

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| <b>TST</b>  | Tail suspension test            |
| <b>CUS</b>  | Chronic unpredictable stress    |
| <b>EGR1</b> | Early growth response protein 1 |

---

# Contexte nutritionnel général

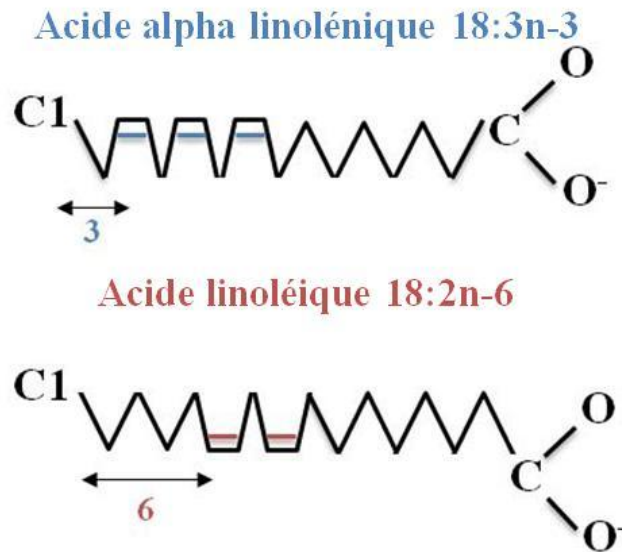
---

### III. CONTEXTE NUTRITIONNEL GENERAL

#### 1. LES ACIDES GRAS POLYINSATURES (AGPI)

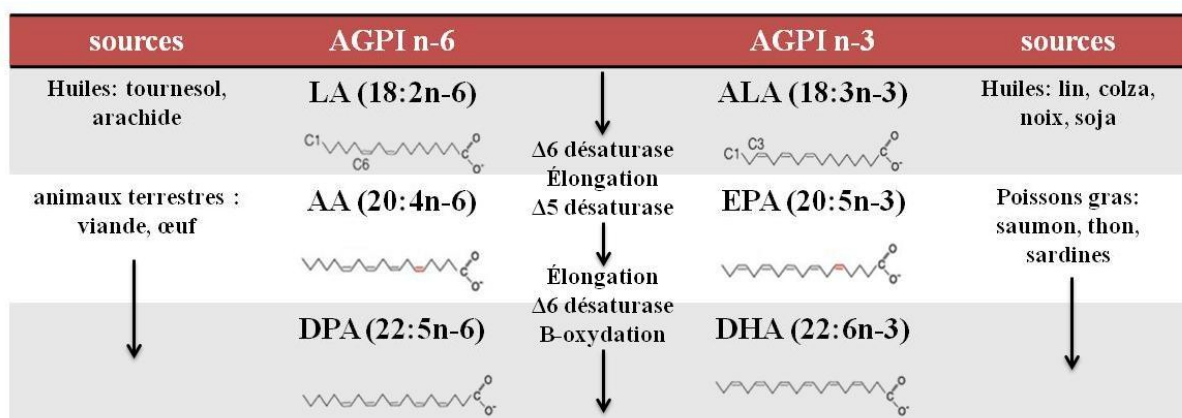
Les lipides alimentaires sont non seulement des substrats énergétiques pour l'organisme mais également des éléments clés de la structure membranaire et les précurseurs de médiateurs lipidiques et des hormones. L'importance des lipides dans le fonctionnement cérébral relève du fait que le système nerveux central (SNC) possède, après le tissu adipeux, la plus forte concentration de lipides de l'organisme (30-50% du poids sec du cerveau) principalement sous forme de phospholipides (PL) (Sastry, 1985). Les PLs sont des esters d'un alcool phosphorylé et d'acides gras. Ces acides gras sont classés en fonction du nombre d'insaturation: les acides gras saturés (AGS) dont tous les atomes de carbones sont saturés en hydrogène et ne présentent aucune insaturation (ou double liaison). Les acides gras mono-insaturés (AGMI) se caractérisent par une insaturation carbone-carbone alors que les acides gras polyinsaturés (AGPI) comprennent au moins 2 insaturations au niveau de leur chaîne hydrocarbonée. La nomenclature des AGPI indique le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturation et la position de la 1<sup>ère</sup> double liaison à partir de l'extrémité méthyle de la chaîne carbonée. Ainsi, l'acide alpha-linolénique (ALA), un AGPI à 18 atomes de carbone et 3 doubles liaisons, est nommé 18:3 n-3 (**Figure 1**).

Il existe 2 séries d'AGPI, les AGPI de la série n-6 (ou oméga 6) et ceux de la série n-3 (ou oméga-3) qui se distinguent par la position de la première insaturation (première insaturation en 6<sup>ème</sup> position pour les n-6 et en 3<sup>ème</sup> pour les n-3). L'acide linoléique (18:2n-6, LA) et l'acide alpha-linolénique (18:3n-3, ALA) sont des acides gras essentiels car les mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour leur synthèse, contrairement aux végétaux (Sprecher, 2000). Le caractère « indispensable » des AGPI a été décrit pour la première fois par George Burr et Mildred Burr en 1929 pour ceux de la série n-6 (Burr and Burr, 1929, 1930). Il faudra attendre un demi-siècle et une étude de cas pour aussi classer l'ALA en AGPI indispensable. Des travaux conduits chez le rongeur par Holman et collaborateurs en 1982 montrent que la carence en ALA provoque des troubles neurologiques qui sont réversibles par la consommation d'ALA (Holman et al., 1982). L'ALA et le LA sont exclusivement apportés par l'alimentation car les vertébrés ne les produisent pas (Su et al., 1999). Les sources alimentaires du LA et de l'ALA sont végétales. Les huiles de tournesol et d'arachide sont riches en LA, alors que l'ALA est majoritairement présent dans les huiles de noix, de colza, de soja et de lin.



**Figure 1 :** Les acides gras polyinsaturés précurseurs de la famille n-3, l'acide alpha linolénique (ALA; en bleu) et de la famille n-6, l'acide linoléique (LA; en rouge). La nomenclature et les positions des insaturations sont représentées par les barres de couleur.

Les AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) sont issus des précurseurs LA et ALA après une série de désaturations (ajout de doubles liaisons) et d'élongations (ajout d'atomes de carbones). L'acide arachidonique (20:4n-6, AA) est le principal métabolite de LA. Les 2 AGPI principaux formés par la métabolisation de ALA sont l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (22:6n-3, DHA) (**Figure 2**). La dernière étape de biosynthèse du DHA a lieu dans le réticulum endoplasmique et les péroxysomes. Les AGPI-LC sont issus de la conversion de leur précurseur ou proviennent directement de l'alimentation. Ainsi, les produits animaux terrestres tels que la viande ou les œufs sont riches en AGPI-LC de la famille n-6. Le DHA et l'EPA sont quant à eux présents dans les poissons gras (hareng, maquereau, saumon, thon, sardines). Notons que la viande, les volailles et les œufs contiennent majoritairement des formes n-6 (précurseurs et chaîne longue) et des quantités variables de n-3.



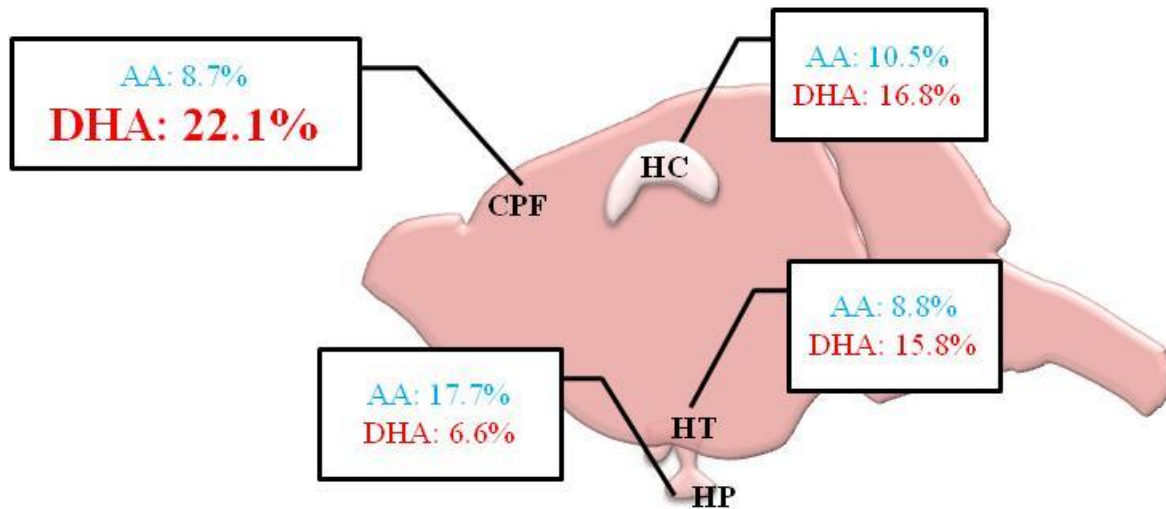
**Figure 2 :** Biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne à partir de leur précurseur respectif. Le symbole  $\Delta$  représente une désaturation, le numéro qui le suit correspond à la place de la double liaison qui sera introduite à partir du groupe carboxyle COOH.

## 2. AGPI DANS LE CERVEAU

### A. Statut lipidique cérébral

L'AA et le DHA sont des constituants fondamentaux des PLs des membranes cellulaires et représentent respectivement 30% et 50% des AGPI totaux dans les PLs des membranes neuronales (Yehuda et al., 1999; Alessandri et al., 2004). Les précurseurs quant à eux sont à l'inverse très faiblement incorporés dans les PLs membranaires puisque 76% de LA sont  $\beta$ -oxydés, 3% sont convertis en AGPI-LC n-6 et 19% sont incorporés dans les phospholipides (Cunnane and Anderson, 1997). L'analyse de la composition en AGPI du cortex frontal chez l'Homme adulte sain montre que les AGPI n-6 et n-3 représentent respectivement 17% et 14% des acides gras totaux (AGT) (McNamara and Carlson, 2006). Parmi les AGPI n-3, le DHA est le principal AGPI-LC dans la substance grise, représentant environ 15% des AGT du cortex préfrontal (CPF) d'un Homme adulte (McNamara et al., 2008a). L'EPA quant à lui n'est que très faiblement incorporé dans le cerveau (McNamara and Carlson, 2006). Dans le cerveau, les contenus en AGPI-LC ne sont pas homogènes d'une région à l'autre. Des travaux menés chez le rongeur et chez le primate non humain ont mis en évidence une certaine spécificité régionale dans les teneurs en AGPI. Ainsi, chez le rongeur les teneurs en AA sont élevées au niveau de l'hypophyse et de l'hippocampe alors que le DHA est abondant au sein du CPF (de 16 à 22 %) (Carrie et al., 2000a; Xiao et al., 2005) (**Figure 3**). Chez le primate non humain, le striatum et le cortex frontal présentent les taux les plus élevés de DHA (Diau et al., 2005). Au niveau subcellulaire, le DHA est enrichi dans les PLs des dendrites

neuronales au niveau des synapses (Grandgirard et al., 1994) et des vésicules synaptiques (Breckenridge et al., 1972; Marszalek and Lodish, 2005).

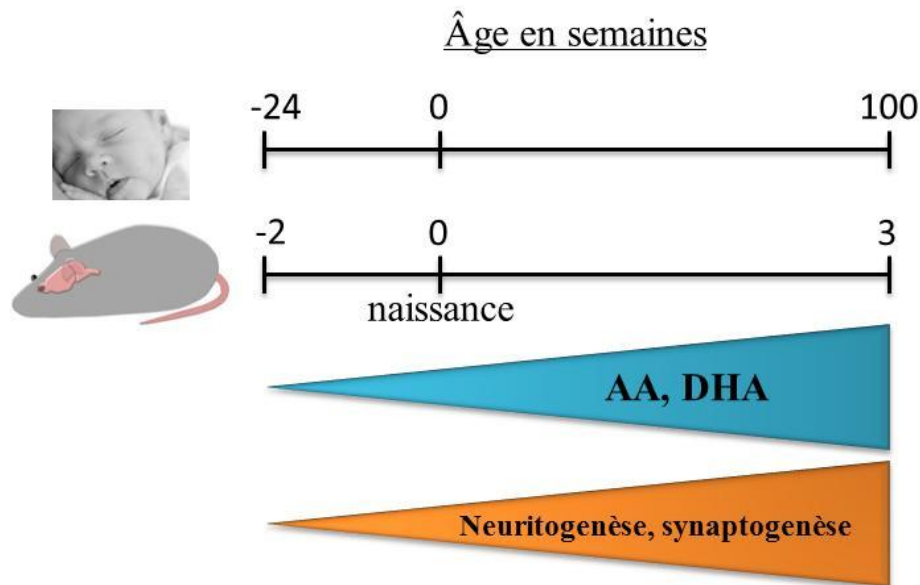


**Figure 3 :** teneurs en DHA et en AA dans les structures cérébrales de la souris. AA : acide arachidonique, DHA : acide docosahexaénoïque, CPF : cortex préfrontal, HC : hippocampe, HT : hypothalamus, HP : hypophyse. Les valeurs sont données en % d'acides gras totaux (adapté de Carrie et al., 2000a)

### B. Les AGPI s'accumulent dans le cerveau au cours du développement

L'enrichissement en AGPI-LC dans les membranes des cellules du SNC se produit pendant les périodes développementales (**Figure 4**). Chez l'Homme, l'incorporation des AGPI dans les membranes neuronales est maximale lors de la période périnatale, comprise entre le 6<sup>ème</sup> mois de grossesse et les deux premières années de vie (Clandinin et al., 1980; Martinez, 1992; Martinez and Mougan, 1998; Clandinin, 1999). Ainsi, l'incorporation de DHA dans le cerveau est estimée à 3mg/jour pendant le dernier trimestre de la grossesse et 5mg/jour pendant la période d'allaitement. Le DHA est fourni au fœtus par l'intermédiaire du placenta puis au nouveau-né par le lait maternel. C'est donc l'alimentation de la mère pendant la période périnatale qui influence l'incorporation du DHA dans le cerveau de l'enfant (Innis, 2004, 2005). Chez le rongeur, la concentration de DHA des membranes neuronales augmente fortement à partir du 14<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire (E14) pour atteindre un plateau au sevrage (P21) (Green and Yavin, 1996; Green et al., 1999). De manière intéressante, cette incorporation massive d'AGPI au niveau du cerveau est concomitante avec la phase active de neurogenèse, neuritogenèse, et synaptogenèse. Ceci a conduit certains auteurs à suggérer un

rôle crucial des AGPI dans ces processus (Green and Yavin, 1996; Martinez and Mougan, 1998).



**Figure 4 :** Représentation schématique de la cinétique d'accumulation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne et de la concordance avec la maturation post-migratoire des neurones (neuritogenèse et synaptogenèse) dans le cerveau au cours du développement. AA : acide arachidonique, DHA : acide docosahexaénoïque.

### C. Conséquences d'une baisse d'apport alimentaire en AGPI sur la composition lipidique cérébrale

Les nourrissons ont une capacité très limitée à convertir le LA en AA et l'ALA en DHA, d'où l'importance de leurs apports sous forme AGPI-LC lors de la lactation. Des nouveau-nés humains nourris avec des laits infantiles dépourvus de DHA présentent des niveaux en DHA dans le tissu adipeux et dans les globules rouges diminués de moitié par rapport à des nourrissons nourris au lait maternel (Cunnane and Francescutti, 1999; Jensen and Heird, 2002). Afin de comprendre comment les apports alimentaires en AGPI n-6 et n-3 ont des conséquences sur le cerveau et son fonctionnement, des études ont été menées sur des animaux de laboratoires (rat, souris, hamster, primate non humain) soumis à des régimes aux teneurs contrôlées en AGPI pendant une ou plusieurs générations. L'utilisation de diètes pauvres en précurseur ALA et riches en précurseurs LA a permis de montrer que le DHA diminue drastiquement dans le cerveau des animaux soumis à ces diètes (jusqu'à -50%). Cette baisse est associée à une augmentation en acide docosapentaénoïque (DPA) n-6 et en AA (Bourre et al., 1984; Frances et al., 1995; Favreliere et al., 1998; Carrie et al., 2000b;

McNamara and Carlson, 2006). Ce phénomène d'incorporation compensatrice du DPA n-6 et de l'AA est dû au matériel enzymatique que se partagent les précurseurs LA et l'ALA pour la synthèse des AGPI-LC. En conséquence, un apport important de LA favorise la biosynthèse des AGPI-LC de la série n-6 au détriment de la métabolisation de l'ALA, réduisant la production de DHA et d'EPA. Ainsi, la consommation de diètes pauvres en précurseurs ALA et riches en LA réduit le DHA et augmente le DPA n-6 et l'AA dans les PLs membranaires de l'ensemble des structures cérébrales, et plus particulièrement dans l'hippocampe (HC) et le CPF (Delion et al., 1994; Guesnet et al., 1997). A contrario les niveaux d'EPA et de DHA augmentent, et les niveaux d'AA diminuent dans les PLs des membranes neuronales du cerveau de la descendance de rates nourries pendant la gestation avec des AGPI-LC n-3 (Childs et al., 2010). A l'instar de la déficience en AGPI n-3, l'apport d'huile de poisson à des animaux déficients en AGPI n-3 n'affecte pas de la même façon les structures cérébrales. Ainsi, il a été montré que l'HC recouvrait 90% de son statut lipidique en DHA et seulement 60% pour le CPF qui se trouve plus affecté par la déficience en AGPI n-3 (Carrie et al., 2000b; Chung et al., 2008).

## **D. Fonctions biochimiques et physiologiques**

### **a. Fluidité des membranes**

Les AGPI sont des constituants fondamentaux des membranes. La teneur membranaire en AGPI varie en fonction de l'apport alimentaire et joue par voie de fait sur les propriétés physico-chimiques des membranes. La membrane des cellules n'est pas figée et est soumise à de nombreux mouvements qui dépendent en partie de l'environnement lipidique. La fluidité des membranes est directement liée au degré d'insaturation des AG. Plus le nombre d'insaturation d'un AGPI est élevé, plus celui-ci confère à la membrane des propriétés de flexibilité (Marszalek and Lodish, 2005). Ainsi, les AGPI augmentent la fluidité des membranes et agissent directement sur la fonctionnalité et l'interaction des protéines insérées dans la membrane et notamment des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Indirectement, ils participent à la ségrégation de radeaux lipidiques (domaines membranaires enrichis en acides gras saturés et en cholestérol) auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (Yaqoob, 2009; Levental et al., 2010). Des études suggèrent notamment que la faible affinité des AGPI à longue chaîne tel que le DHA pour le cholestérol favoriserait la ségrégation latérale de microdomaines riches en cholestérol.

b. Conversion en molécules bioactives

Les AGPI de la série n-6 et n-3 sont également des précurseurs de médiateurs lipidiques. Par l'action de la phospholipase A2 (PLA2), l'AA, l'EPA et le DHA sont libérés des PLs pour être métabolisés par les cyclooxygénases (COX) ou lipoxygénases (LOX) en médiateurs lipidiques oxygénés appelés eicosanoïdes (Simopoulos, 2002). Le niveau de conversion est faible puisque qu'environ 97% d'AA et 90% de DHA libérés sont réincorporés dans les PLs membranaires (Bazinet et al., 2005; Lee et al., 2005; Bazinet et al., 2006; Chen et al., 2008). Les AGPI libérés sont métabolisés en prostanoïdes par la voie COX et en leucotriènes par la voie LOX. Plus précisément, les prostanoïdes de la série 2 comme les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et les leucotriènes de la série 4 comme les leucotriènes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) sont issus de l'AA et ont des activités pro-inflammatoires de forte intensité (Samuelsson, 1983a, b; Funk, 2001). A l'opposé, les prostanoïdes de la série 3 (PGE<sub>3</sub>) et les leucotriènes de la série 5 (LTB<sub>5</sub>) issus de l'EPA et du DHA ont des propriétés pro-inflammatoires de faible intensité (Terano et al., 1984; Bagga et al., 2003). L'EPA et le DHA, sont aussi métabolisés en d'autres médiateurs lipidiques aux activités anti-inflammatoires : les résolvines de la série E (RvE1) et les docosanoïdes (RvD1 et neuroprotectines D1 (NPD1)) respectivement (Serhan and Savill, 2005). Ces dérivés sont impliqués dans la résolution de l'inflammation. Une carence alimentaire en AGPI n-3, conduit à l'augmentation d'AA et de ses médiateurs lipidiques et une diminution de DHA, d'EPA et de leurs médiateurs lipidiques. Ce déséquilibre pourrait conduire à une altération des mécanismes de résolution de l'inflammation. Ces mécanismes, décrits dans un premier temps au sein du système immunitaire, commencent à être également mis en évidence dans le cerveau (Serhan et al., 2002; Orr and Bazinet, 2008)

Dans le cerveau, les microglies, qui sont les cellules de l'immunité cérébrale, produisent des facteurs inflammatoires (cytokines, prostaglandines, etc) en réponse à un stimulus immun. L'expression et l'action des facteurs inflammatoires produits par les cellules microgliales sont modulées par les AGPI (Laye, 2010). Ainsi, l'expression induite de l'interleukine-6 (IL-6), une cytokine inflammatoire, est exacerbée dans le cerveau de souris soumises à un régime déficient en AGPI n-3 en comparaison aux souris nourries avec un régime enrichi en AGPI n-3 (Mingam et al., 2008). *In vitro*, le DHA limite la synthèse des cytokines inflammatoires IL-1b et TNFα par les microglies (De Smedt-Peyrusse et al., 2008). De plus l'expression de TNFα au niveau de la rétine est réduite chez des souris supplémentées en DHA ou capables de convertir de manière endogène les AGPI n-6 en AGPI n-3 grâce au gène *Fat-1* (Connor et al.,

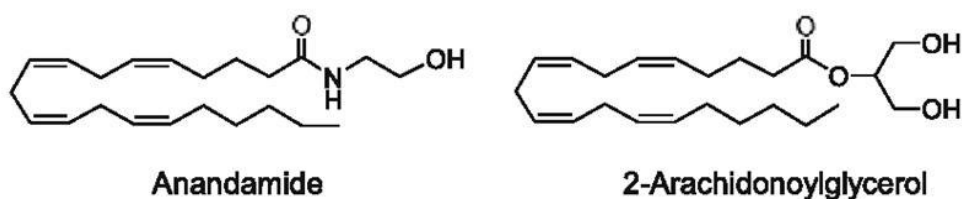
2007). Les données de la littérature suggèrent un effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 (Orr et al., 2012).

#### c. Croissance neuronale ou neuritogenèse

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des AGPI n-3 dans les processus de neuritogenèse et synaptogenèse. Le DHA, dont les taux sont élevés dans les PLs des dendrites neuronales au niveau des synapses (Grandgirard et al., 1994) et des vésicules synaptiques (Breckenridge et al., 1972; Marszalek and Lodish, 2005), joue un rôle particulièrement important dans ces processus de maturation post-migratoire. Ainsi, les taux de DHA augmentent dans les synaptosomes préparés à partir du cerveau des descendants de rates nourries avec un régime riche en ALA. A ce niveau, le DHA pourrait ainsi améliorer l'efficacité des événements de fusion membranaire lors de la transmission synaptique. En outre, au cours de la croissance des neurites, des niveaux élevés de DHA sont retrouvés dans les cônes de croissance (Martin and Bazan, 1992), suggérant un rôle de cet AGPI dans la mise en place des réseaux neuronaux.

#### d. Précurseurs des endocannabinoïdes

Les AGPI-LC et particulièrement l'AA sont les précurseurs des principaux endocannabinoïdes (eCB) trouvés dans le cerveau (Mackie, 2008), l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG). Ces eCB appartiennent à la famille des AGPI et se caractérisent par la présence de 20 à 22 atomes de carbones et de 3 à 4 doubles liaisons (**Figure 5**). Le système endocannabinoïde est impliqué dans une constellation de fonctions qui seront présentées ultérieurement.



**Figure 5 :** Structures chimiques de l'anandamide (AEA) et du 2-arachidonoyl glycérol (2-AG).

### E. AGPI et nutrition lipidique

Au siècle dernier, l'expansion rapide des pays occidentaux a été associée à des changements drastiques dans les habitudes alimentaires. En effet, la consommation d'huile végétale et de poissons gras riches en AGPI n-3 a diminué au profit des huiles et des viandes de bœuf, porc et poulet riches en AGPI n-6. Ce changement nutritionnel a entraîné un déséquilibre dans le rapport n-6/n-3 dans les pays occidentaux (**Figure 6**). Les recommandations de l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) préconisent que les acides gras totaux (AGT) consommés constituent 30% de l'apport énergétique total (ANSES, 2011). En ce qui concerne les AGPI, les recommandations préconisent un ratio strictement inférieur à 5/1 ce qui équivaut à 4,4 g/jour de LA (2% de l'apport énergétique) et 1,8 g/jour d'ALA (0.8% de l'apport énergétique) pour un apport énergétique total de 2000 Kcal/jour. Ces recommandations sont basées sur des études révélant qu'un ratio LA/ALA de 4/1 diminue les risques de développer certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires (de Lorgeril et al., 1994). En France, le ratio AGPI n-6/n-3 alimentaire se situe entre 11/1 et 14/1 (Astorg et al., 2004). En effet l'apport de LA est de 10,6 g / jour chez les hommes et 8,1 g / jour chez les femmes, ce qui représente 4,2% de l'apport énergétique. L'apport en ALA est de 0,94 g / jour chez les hommes et 0,74 g / jour chez les femmes, ce qui représente 0,37 % de l'apport énergétique, avec un ratio LA/ALA de approximativement 11,3 quel que soit l'âge et le sexe. Concernant l'ALA, les recommandations préconisent un apport de 0,8% de l'énergie totale alors que seulement 0.5% est consommé. Le déséquilibre alimentaire entre les AGPI n-6 et n-3 est aussi retrouvé dans d'autres pays industrialisés tels que l'Australie (Meyer et al., 2003) et les Etats-Unis (Kris-Etherton et al., 2000) et certains pays émergents (Chine, Inde, Mexique).

| Population                     | Ratio AGPI n-6/n-3 |
|--------------------------------|--------------------|
| Paléolithique                  | 0.79               |
| Grèce avant 1960               | 1-2                |
| Japon                          | 4                  |
| Inde rurale                    | 5-6.1              |
| Inde urbaine                   | 38-50              |
| Royaume Unis et Europe du Nord | 15                 |
| Etats-Unis                     | 16.74              |
| France                         | 11-14              |

**Figure 6 :** Ratios n-6/n-3 de l'alimentation de différents pays. Acide gras polyinsaturés (AGPI). Adapté de (Simopoulos, 2008)

**Résumé :** Après le tissu adipeux, le cerveau possède les teneurs en lipides les plus élevées de l'organisme, particulièrement l'AA, un AGPI-LC oméga-6 et le DHA, un AGPI-LC oméga-3. Les précurseurs de l'AA et du DHA, le LA et l'ALA respectivement sont essentiels : les vertébrés ne les synthétisent pas et ils sont donc exclusivement apportés par l'alimentation. Les AGPI-LC sont incorporés dans les membranes neuronales auxquelles ils confèrent des propriétés physico-chimiques, notamment de fluidité. Ces AGPI sont des acteurs moléculaires des processus de neuritogenèse et influencent la morphologie dendritique. Enfin, les AGPI sont à l'origine de nombreux dérivés lipidiques (prostanoïdes, endocannabinoïdes, etc.) qui jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et l'inflammation. La teneur membranaire de ces AGPI dans le cerveau est directement liée à l'apport alimentaire en AGPI. L'alimentation des pays industrialisés se caractérise par un profond déséquilibre entre les AGPI n-6 et n-3 depuis plusieurs décennies. Ces changements nutritionnels ont été associés à l'augmentation de la prévalence de pathologies neuropsychiatriques qui feront l'objet des prochains chapitres.

---

# **AGPI n-3 et troubles de l'humeur**

---

## IV. AGPI n-3 ET TROUBLES DE L'HUMEUR

Ce chapitre est consacré aux relations entre les AGPI n-3 et les troubles de l'humeur dont la prévalence en France et dans le monde est importante et a un impact considérable sur la santé publique (Le Pape and Lecomte, 1999). En effet, la prévalence de troubles psychiatriques majeurs comme la dépression ou l'anxiété généralisée est respectivement de 13.7% et 11.9% en France selon l'organisation mondiale de la santé (OMS).

### 1. ETUDES CLINIQUES

De nombreuses études cliniques et épidémiologiques ont mis en évidence le lien entre les troubles de l'humeur et le changement des teneurs en acides gras dans les membranes cellulaires. Ces observations ont conduit à « l'hypothèse des phospholipides » selon laquelle les AGPI sont des facteurs d'étiologie des troubles de l'humeur. Ainsi, des sujets diagnostiqués pour des troubles de l'humeur ont un niveau significativement plus faible d'AGPI-LC n-3 et un ratio d'AGPI n-6:n-3 plus élevé dans le sang et dans le cerveau par rapport à des sujets sains de même âge et de même sexe (Adams et al., 1996; Maes et al., 1996; Edwards et al., 1998; Peet et al., 1998; Tiemeier et al., 2003; Frasurre-Smith et al., 2004; Green et al., 2006; McNamara et al., 2007; McNamara et al., 2010; McNamara and Liu, 2011). L'acide eicosapentaénoïque (EPA; 20:5 n-3) (Adams et al., 1996; Green et al., 2006) et le DHA (Edwards et al., 1998; Frasurre-Smith et al., 2004; Green et al., 2006; McNamara et al., 2010) sont ainsi plus faiblement concentrés dans les membranes des érythrocytes de patients souffrant de troubles de l'humeur entraînant une augmentation du ratio n-6:n-3 (Adams et al., 1996; Green et al., 2006). Dans certaines de ces études, la sévérité des symptômes dépressifs et anxieux est négativement corrélée à la concentration des AGPI n-3 total dans le sang (Adams et al., 1996; Maes et al., 1996; Edwards et al., 1998; Green et al., 2006). Une étude a permis de révéler chez des individus ayant attenté à leur vie que les niveaux d'EPA et de DHA dans les PLs totaux du plasma sont significativement plus faibles que ceux de sujets témoins admis pour des blessures accidentelles (Huan et al., 2004). D'autres études post-mortem menées chez des patients suicidés qui souffraient de troubles affectifs (dépression majeure et trouble bipolaire) ont rapporté des diminutions des taux de DHA dans la substance grise du CPF (McNamara et al., 2007; McNamara et al., 2008b). Ces observations cliniques soulèvent une question cruciale : existe-t-il un lien de causes à effets entre les teneurs en AGPI n-3 dans le sang/cerveau et les troubles de l'humeur? Si oui, les faibles niveaux d'AGPI n-3 en sont-ils la cause ou la conséquence? Ces relations de causalités

ont été abordées par des études précliniques, où les ratios alimentaires n-6:n-3 sont contrôlés et par des études d'intervention nutritionnelle chez l'Homme.

Les résultats des études d'interventions nutritionnelles réalisées chez des patients avec des troubles de l'humeur sont hétérogènes. Les raisons de cette hétérogénéité de résultats pourraient être dues à (i) la nature et la dose des AGPI utilisés dans les suppléments alimentaires (EPA ou DHA ou un cocktail des deux en proportions variables), (ii) l'absence de prise en compte du statut nutritionnel et/ou génétique des sujets étudiés, (iii) la méthode de diagnostic utilisée pour évaluer la sévérité des symptômes de dépression et d'anxiété, (iv) la durée des supplémentations (de 4 semaines à 6 mois) et enfin (v) la prise conjointe ou non de traitements antidépresseurs et/ou anxiolytiques. Trois études menées sur des patients souffrant de dépression majeure et n'étant pas traités par des antidépresseurs ne montrent pas effet significatif de la supplémentation en AGPI n-3 (Marangell et al., 2003; Freeman et al., 2008; Rees et al., 2008) alors que trois études révèlent un effet bénéfique (Jazayeri et al., 2008; Nemets et al., 2006; Su et al., 2008). Chez les patients traités mais résistants aux antidépresseurs (inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI) tels que la Fluoxétine), la sévérité des symptômes de dépression diminue dans le groupe supplémenté en AGPI n-3 (Nemets et al., 2002; Peet and Horrobin, 2002; Su et al., 2003; Jazayeri et al., 2008). Dans une autre étude, l'équipe de Yehuda en 2005 a recherché si l'administration d'un cocktail d'AGPI n-3 (90 mg d'ALA) et n-6 (360 mg de LA) sur une durée de 3 semaines, pouvait améliorer chez des étudiants les comportements anxieux liés aux périodes d'examens universitaires. Ces auteurs ont mis en évidence une amélioration de plusieurs symptômes (appétit, humeur, concentration et fatigue) par rapport au groupe placebo. Ces améliorations sont associées à des niveaux de cortisol salivaire diminués (Yehuda et al., 2005). De plus, des étudiants ayant reçu une supplémentation en DHA et EPA pendant 12 semaines présentent une réduction de 20% des symptômes anxieux par rapport aux étudiants traités avec un placebo (Kiecolt-Glaser et al., 2011). Chez les étudiants traités avec les AGPI n-3, une augmentation des teneurs plasmatiques en DHA et EPA est observée dès la troisième semaine de traitement. Enfin, cette augmentation de DHA et d'EPA est négativement corrélée avec une diminution de symptômes anxieux. Cette étude met en évidence les effets anxiolytiques d'un régime supplémenté en AGPI n-3 chez l'Homme. En conclusion, les études d'interventions nutritionnelles dans le but d'augmenter les taux d'EPA et/ou de DHA donnent des résultats discordants sur l'amélioration des symptômes des troubles de l'humeur. D'autres études sont donc nécessaires pour montrer que les AGPI administrés par voie alimentaire

améliorent les troubles de l'humeur chez des patients atteints de cette pathologie neuropsychiatrique.

Une des hypothèses avancée par les chercheurs est qu'un apport alimentaire faible en AGPI n-3 est un facteur de risque du développement de troubles de l'humeur. Puisque le poisson est la principale source d'AGPI n-3 à longue chaîne, plusieurs études épidémiologiques ont été menées dans différents pays (Finlande, Nouvelle-Zélande, France, Irlande du Nord, Norvège ou encore Pays-Bas) dans le but de rechercher des associations entre les troubles de l'humeur et la consommation de poisson (Tanskanen et al., 2001; Silvers and Scott, 2002; Timonen et al., 2004; Barberger-Gateau et al., 2005; Kamphuis et al., 2006; Appleton et al., 2007; Raeder et al., 2007). Les sujets ayant une consommation faible de poisson (inférieur à une fois par semaine) présentent des scores élevés de dépression (Timonen et al., 2004; Barberger-Gateau et al., 2005). Comparés aux individus consommant peu d'AGPI n-3 (21 mg par jour environ) ceux qui consomment en moyenne 407 mg par jour d'AGPI n-3 ont un risque diminué de développer des symptômes dépressifs. Une étude écologique transnationale menée sur une large cohorte incluant des individus de différents pays a mis en évidence une forte corrélation inverse entre la consommation de poisson et la prévalence de la dépression (Hibbeln, 1998). En effet, cette étude épidémiologique de grande ampleur (170 000 individus) observe que les pays asiatiques comme le Japon, la Corée et Taiwan ont une consommation de poisson élevée associée à une faible prévalence de dépression. A l'inverse, les pays occidentaux comme la Nouvelle Zélande, le Canada, les Etats-Unis, l'Allemagne ou encore la France font partie des pays qui consomment le moins de poissons avec une prévalence de dépression plus élevée. Il est important de noter que cette étude ne peut pas s'affranchir d'éventuels facteurs de confusions. En France par exemple, le poisson est un met couteux et quelques études ont montré que la consommation régulière de poisson est aussi associée à des niveaux d'éducation et de revenus élevés (Galobardes et al., 2001; Barberger-Gateau et al., 2005; Appleton et al., 2007). Dans leur ensemble les données de la littérature suggèrent que la consommation de poisson est inversement corrélée aux troubles de l'humeur et que d'autres facteurs tels que le niveau de vie pourrait contribuer à cette corrélation.

## 2. ETUDES PRECLINIQUES

Pour comprendre si les modifications du ratio AGPI n-6/n-3 alimentaire ont une incidence sur le cerveau et le comportement, des études ont été menées sur des animaux de laboratoire (rat, souris, hamster, primate non humain) soumis à des régimes aux teneurs contrôlées en AGPI

pendant une ou plusieurs générations. Tous les régimes utilisés sont isocaloriques et les teneurs en protéines, glucides, vitamines et antioxydants sont identiques. La période périnatale étant cruciale pour l'accumulation des AGPI dans les structures cérébrales, les régimes alimentaires sont imposés aux mères 15 jours avant l'accouplement et maintenus à la descendance (F1) ou aux générations suivantes (F2, F3). L'utilisation de diètes très déséquilibrées en ALA (huile de colza) au profit du LA (huile de tournesol ou d'arachide) a permis de montrer que le DHA diminue drastiquement dans le cerveau des animaux soumis à ces diètes alors que le DPA n-6 et l'AA augmentent et ce, quel que soit l'espèce. Ainsi, la consommation de diètes déséquilibrées en n-6/n-3 apportés sous forme de précurseurs réduit le DHA et augmente le DPA n-6 et l'AA dans les PLs membranaires de l'ensemble des structures cérébrales, et plus particulièrement dans l'HC et le CPF (Delion et al., 1994; Frances et al., 1995; Favreliere et al., 1998; Carrie et al., 2000b; McNamara and Carlson, 2006).

Les études chez l'animal ont ainsi pu mettre en évidence les relations entre la nutrition, la diminution du DHA au niveau cérébral et l'altération des comportements émotionnels comme les comportements de type anxieux et dépressifs (Carrie et al., 2000b; Takeuchi et al., 2003; DeMar et al., 2006; Fedorova and Salem, 2006). Chez le rongeur, l'une des méthodes les plus utilisées pour mesurer le comportement de type anxieux de l'animal est le labyrinthe en croix surélevé (EPM de l'anglais « Elevated Plus Maze »); L'EPM est construit en forme de croix avec 2 bras ouverts et 2 bras fermés, le tout surélevé au-dessus du sol. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Un animal considéré comme ayant un comportement de type anxieux aura naturellement tendance à préférer les bras fermés et sombres aux bras ouverts et éclairés (zones anxiogène) (Walf and Frye, 2007). Le comportement de type anxieux est mesuré par le degré d'évitement des bras ouverts de l'EPM et calculé comme le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts. Nakashima et collaborateurs en 1993 ont mené la première étude chez le rongeur visant à déterminer l'effet d'une déficience en AGPI n-3 sur les comportements de type anxieux évalués en EPM (Nakashima et al., 1993). Cette étude montre que le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts a tendance à augmenter chez des souris femelles adultes soumises à un régime déficient en AGPI n-3 depuis 2 générations par rapport aux souris témoins. Dans une autre étude, le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts est similaire chez des souris femelles âgées de 45 jours, soumises au régime déficient ou équilibré pendant 1 génération (Frances et al., 1995). Ces résultats ne sont pas en accords avec

ceux rapportés par l'équipe de Carrié (Carrié et al., 2000b). Dans cette étude, les souris mâles âgées de 4 mois et soumises au régime déficient en AGPI n-3 pendant 1 génération présentent des comportements de type anxieux par rapport aux animaux soumis à un régime équilibré en AGPI n-3. Ce comportement se traduit par une diminution du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts de l'EPM chez les souris déficientes. Cette observation a été corroborée dans une autre étude menée en 2002 chez des rats mâles âgés de 2 mois (Takeuchi et al., 2003). De plus, les souris déficientes en AGPI n-3 et supplémentées à 7 semaines d'âge pendant 2 mois avec 40 mg de DHA/100 mg de régime passent plus de temps dans les bras ouverts que les souris déficientes en AGPI n-3 (Carrié et al., 2000b). L'effet des AGPI alimentaires sur le comportement de type dépressif a été étudié par le test de la nage forcée (ou FST pour « Forced Swimming Test »), un test prédictif des activités antidépressives (Porsolt et al., 1977b; Porsolt et al., 1977a). Ce test consiste à placer l'animal dans un cylindre rempli d'eau dont il ne peut s'échapper. L'animal commence par nager vigoureusement puis s'immobilise par périodes de temps plus ou moins longues. La durée d'immobilité des rongeurs mesurée dans ce test est interprétée comme un indice de comportement de type dépressif car l'administration périphérique d'antidépresseurs tels que l'Imipramine (20 mg/kg) ou la Fluoxétine (20 mg/kg) le diminue. Une étude a révélé qu'une déficience sur une génération en AGPI n-3 diminue le temps d'immobilité chez la descendance mâle dans le FST (Raygada et al., 1998). A l'inverse, des rats soumis à un régime déficient en AGPI n-3 depuis le sevrage (P21) pendant 15 semaines présentent un temps d'immobilité plus important par rapport aux rats soumis à un régime équilibré en AGPI n-3 révélant un comportement de type dépressif chez ces animaux (DeMar et al., 2006). De plus, quelques études menées chez le rat indiquent qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 par de l'huile de poisson réduit significativement le temps d'immobilité (Naliwaiko et al., 2004; Carlezon et al., 2005; Huang et al., 2008). Cependant l'immobilité de l'animal dans le FST peut être interprétée comme un signe d'inhibition motrice et non de comportement de type dépressif. Une autre hypothèse de cette immobilité est que l'animal adopte un comportement adaptatif dans une situation où les réponses actives (la nage) ne sont pas efficaces. Par ailleurs, le temps d'immobilité de l'animal dans le FST est réduit avec l'administration aiguë d'antidépresseurs (Imipramine ou Fluoxétine). Cet effet immédiat des antidépresseurs pose problème puisqu'en clinique leur efficacité ne se manifeste qu'après un traitement répété. D'autres tests sont donc utilisés afin d'évaluer les comportements de type dépressif chez l'animal. Ainsi l'anhédonie, qui se caractérise dans la dépression par une perte d'intérêt pour des événements plaisants a été étudié pour mesurer les comportements de type dépressif chez le rongeur. Francès et

collaborateurs ont montré que des souris nourries avec un régime déficient en AGPI n-3 présentent une préférence réduite pour une solution sucrée par rapport aux souris équilibrées (Frances et al., 2000).

Les données de la littérature concernant les effets d'un apport alimentaire pauvre en AGPI n-3 sur les comportements émotionnels sont assez contradictoires. Ces disparités de résultats pourraient être liées aux différences de conditions expérimentales (durée d'exposition à la déficience en AGPI n-3, composition des diètes, âge, sexe et espèce animale, procédures de réalisation des tests comportementaux, etc.). Si les recherches chez l'animal tendent à suggérer qu'un régime alimentaire pauvre en AGPI n-3 peut induire des altérations des comportements émotionnels, elles nécessitent d'être d'avantage approfondies.

**Résumé :** Les résultats disponibles des études cliniques et épidémiologiques permettent d'inférer l'importance d'un niveau suffisant en AGPI n-3 pour la prévention des troubles de l'humeur. En effet, les études cliniques décrivent des niveaux en AGPI n-3 plus faibles chez des patients souffrant de troubles de l'humeur dans le sang et le cerveau. Cette diminution des teneurs en AGPI n-3 est d'autant plus marquée que la sévérité des symptômes est importante. Les études épidémiologiques ont émis l'hypothèse selon laquelle la faible consommation de poisson (principale source d'AGPI n-3) peut être un facteur de risque dans le développement de troubles de l'humeur. Ces études ont en effets mis en évidence une forte corrélation inverse entre la consommation de poisson et la prévalence des troubles de l'humeur.

Les études chez l'animal sont venues corroborer les études chez l'Homme et ont révélé qu'un régime pauvre en AGPI n-3 pendant une ou plusieurs générations induit chez l'animal des altérations comportementales mesurées dans différents test évaluant les comportements émotionnels. Ainsi, la diminution de DHA dans le cerveau des animaux de laboratoire qui consomment des diètes déséquilibrées en AGPI n-3 a des conséquences sur les comportements de type dépressif et anxieux. Les études de supplémentation ont permis de mettre en évidence un lien causal entre les AGPI n-3 alimentaires et les comportements émotionnels chez l'animal. Les parties suivantes exposeront les données de la littérature sur certains mécanismes neurobiologiques pouvant rendre compte des effets d'une déficience en AGPI n-3 sur les troubles de l'humeur.

---

# **AGPI n-3 et mécanismes physiopathologiques des troubles émotionnels**

---

## **V. AGPI N-3 ET MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES TROUBLES EMOTIONNELS**

### **1. AGPI N-3 ET SYSTEMES DE NEUROTRANSMISSION**

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la relation entre les AGPI n-3 et les comportements émotionnels. La théorie des monoamines dans les troubles de l'humeur est issue d'observations cliniques. En effet, les substances pharmacologiques comme la réserpine diminuent les niveaux de monoamines extracellulaires et entraînent l'apparition de symptômes de type dépressifs (Schildkraut, 1965). Pour étayer cette hypothèse, les concentrations de monoamines ont été mesurées dans le cerveau de patients atteints de troubles de l'humeur et décédés par suicide. Chez ces derniers, les concentrations de sérotonine (5-HT) au sein du PFC ventromédian diminuent (Mann et al., 1996; Mann, 2003). Il a été proposé en 1994 que l'altération des comportements induits par un appauvrissement d'apport alimentaire en AGPI n-3 pouvait être due à une perturbation des systèmes de neurotransmission monoaminergiques (dopamine et sérotonine) (Delion et al., 1994; Delion et al., 1996; Zimmer et al., 1998; Zimmer et al., 1999; Zimmer et al., 2000a; Zimmer et al., 2000b; Chalon et al., 2001; Zimmer et al., 2002; Kuperstein et al., 2005). Ainsi, la libération basale de dopamine diminue dans le CPF de rats soumis à un régime déficient en AGPI n-3 pendant deux générations. La libération de dopamine nouvellement synthétisée, induite par l'ajout de KCL, n'est pas différente entre les groupes de rats déficients ou équilibrés en AGPI n-3 (Zimmer et al., 1998). En revanche, la libération de dopamine issue du pool de réserve vésiculaire est diminuée tant au niveau du CPF que dans le noyau accumbens (NAc) de rats déficients en AGPI n-3 (Zimmer et al., 1998; Zimmer et al., 2000a). L'hypothèse selon laquelle le pool vésiculaire de dopamine est réduit par la déficience en AGPI n-3 a été étayée par des résultats obtenus sur la régulation de l'expression du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT<sub>2</sub> de l'anglais « Vesicular Monoamine Transporteur ») (Zimmer et al., 1998). Cette étude montre une réduction de la densité de VMAT<sub>2</sub> dans le CPF et le NAc de rats nourris avec un régime déficient en AGPI n-3. Des études de microdialyse ont révélé que la libération de dopamine, stimulée pharmacologiquement par un inhibiteur du transporteur de la dopamine ou amphétamine, est plus faible dans le CPF des animaux déficients en AGPI n-3 (Zimmer et al., 2002). La densité des récepteurs sérotonine-2 (5-HT<sub>2</sub>) mesurée par autoradiographie est plus importante dans le CPF de rats nourris avec un régime déficient en AGPI n-3 par rapport aux rats témoins alors que la densité des récepteurs à la dopamine D2

est réduite dans le CPF (Delion et al., 1994). Cependant, l'altération de la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique peut être améliorée par un régime équilibré en AGPI n-3 si et seulement si ce régime est apporté avant l'âge du sevrage (p21). Cette spécificité d'effet révèle l'importance de l'incorporation périnatale d'AGPI n-3 dans le cerveau dans ces processus de neurotransmission (Kodas et al., 2002; Kodas et al., 2004). Dans leur ensemble, ces résultats apportent des éléments en faveur du rôle des AGPI n-3 dans la neurotransmission monoaminergique qui apportent un éclairage sur les mécanismes pathophysiologiques des perturbations comportementales qui se développent chez les animaux déficients en AGPI n-3.

## 2. AGPI N-3 ET PLASTICITE CEREBRALE

L'incorporation massive de DHA dans les membranes des cellules nerveuses au cours du développement est concomitante avec la phase active de neurogenèse, neuritogenèse, et synaptogenèse (Green and Yavin, 1998; Green et al., 1999). Ces étapes sont essentielles à la mise en place des réseaux nécessaires au fonctionnement cérébral du futur adulte (Innis, 2008). Au cours des dernières années, des études ont éclairé le rôle que pouvait jouer les AGPI n-3 dans les processus de neuritogenèse et synaptogenèse post-migratoire.

*In vitro*, les AGPI activent la formation et la croissance des neurites de neurones hippocampiques (Calderon and Kim, 2004; Cao et al., 2009) et corticaux (Cao et al., 2005) en culture primaire. De plus, dans ces mêmes cultures, un appauvrissement en DHA entraîne la réduction de la taille des neurites (Ikemoto et al., 1997; Furuya et al., 2002; Calderon and Kim, 2004; Cao et al., 2009). L'accrétion du DHA dans le cerveau facilite considérablement la formation des épines dendritiques dans l'hippocampe de Gerbilles supplémentées en DHA (Sakamoto et al., 2007). De même, des souris transgéniques *fat-1*, capables de convertir de manière endogène les AGPI n-6 en AGPI n-3 de même longueur de chaîne, ont une densité des épines exacerbée dans l'HC en comparaison aux souris WT (Kang et al., 2004; He et al., 2009). Les épines dendritiques reçoivent les informations synaptiques et jouent par conséquent un rôle central dans la transmission synaptique. Des altérations de la morphologie et/ou de la densité des épines dendritiques ont été associées à de nombreuses neuropathologies telles que la schizophrénie, l'autisme et le retard mental (Fiala et al., 2002). L'augmentation de la densité des épines dans l'HC chez les animaux *Fat-1* a été associée à de meilleures performances cognitives évaluées dans le test de piscine de Morris (He et al., 2009). Cette étude a notamment permis de mettre en évidence l'importance du DHA dans la morphologie dendritique dans l'HC et la mémoire spatiale. Enfin, la densité des épines sur les dendrites est

corrélée avec le degré de connexions entre les neurones suggérant une modulation de la transmission neuronale (Cowan et al., 1998). D'autres auteurs se sont intéressés à la LTP (de l'anglais « long term potentiation »), phénomène de plasticité synaptique permettant de renforcer la transmission synaptique. Les auteurs d'une étude *in vitro* menée sur des neurones hippocampiques de souris nourries pendant 1 génération avec un régime dépourvu d'AGPI n-3 ont observé une altération de LTP dans ces cultures (Cao et al., 2009). En outre, une supplémentation en EPA pendant 8 semaines entraîne chez le rat adulte une augmentation de la LTP dans l'hippocampe par rapport aux rats témoins nourris avec un régime standard (Kawashima et al., 2010). La diminution de la LTP dans l'hippocampe de rats soumis à un régime déficient en AGPI n-3 est associée à une réduction d'expression des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) dont l'activation est cruciale pour l'induction de la LTP (Cao et al., 2009). Enfin, d'autres recherches ont montré que l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique pouvait être régulée par les AGPI n-3. Ainsi, des rats déficients en AGPI n-3 pendant 15 semaines ont une réduction du niveau de transcription et d'expression de BDNF (de l'anglais « Brain Derived Neurotrophic Factor ») au niveau du CPF (Rao et al., 2007b). De même, l'activation des voies de signalisation associées au BDNF telles que CREB (de l'anglais « cyclic AMP-dependent response element binding protein ») et p38 MAPK (de l'anglais « mitogen-activated protein kinase ») est réduite chez les rats déficients en AGPI n-3 (Rao et al., 2007b). Les propriétés neurotrophiques des AGPI n-3 sur l'arborisation et les épines dendritiques observées chez l'animal ont aussi été démontrées chez l'Homme. De fait, une étude de 2007 a mis en relation les habitudes alimentaires concernant les AGPI n-3 et le volume de la matière grise dans des régions impliquées dans la régulation de l'humeur (amygdale, hippocampe et le cortex cingulaire antérieur) (Conklin et al., 2007). Les participants de cette étude, hommes et femmes en bonne santé, ont été divisés en trois groupes selon la quantité en mg d'EPA et DHA consommés par jour. Il ressort de cette étude que le groupe qui consommait le plus d'AGPI n-3 (80-1600 mg par jour) présentait une matière grise plus volumineuse dans ces trois structures cérébrales par rapport aux deux autres groupes. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence un lien étroit entre AGPI n-3 alimentaire et volume de la substance grise. D'autres études ont révélé que des patients atteints de désordres affectifs présentent des atteintes structurelles au niveau du CPF, caractérisées par une réduction de l'arborisation dendritique (Rajkowska et al., 1999; Cotter et al., 2005; Rajkowska et al., 2005; Van Otterloo et al., 2009). Dans leur ensemble, ces données suggèrent que les désordres affectifs sont associés à (i) une diminution du DHA dans le CPF, (ii) un

volume réduit de la substance grise et (iii) une réduction de l'arborisation dendritique, en particulier dans le CPF.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la modification des microstructures neuronales dans le CPF de patients souffrant de troubles de l'humeur, des études précliniques ont été menées chez le rongeur. Un modèle largement utilisé pour identifier les mécanismes neurobiologiques des troubles de l'humeur est le stress chronique. Contrairement à un stress aigu qui entraîne une réponse comportementale transitoire et une élévation de corticostérone ponctuelle, le stress chronique provoque des changements comportementaux et physiologiques robustes dans le temps (Berton et al., 2006). Les rongeurs soumis à un stress chronique (défaite sociale ou stress de contention) développent des altérations du comportement de type dépressif et anxieux et un remodelage de la structure des neurones dans le CPF, l'HC et l'amygdale (AMY) (Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004; Brown et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Liston et al., 2006; Radley et al., 2006; Dias-Ferreira et al., 2009; Blugeot et al., 2011; Eiland et al., 2011; Hill et al., 2011a; Hill et al., 2012). En particulier, une réduction de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de la région CA3 (Corne d'Ammon 3) de l'HC est observée (Blugeot et al., 2011). Une atrophie de l'arborisation dendritique a également été rapportée dans les neurones pyramidaux des couches II/III du CPF (Brown et al., 2005; Hill et al., 2011a), alors que ces mêmes neurones sont hypertrophiés dans le noyau basolatéral de l'AMY (Hill et al., 2011a; Hill et al., 2012). Les mécanismes par lesquels le stress chronique entraîne un remodelage de l'arborisation dendritique sont complexes. Ils feraient intervenir les glucocorticoïdes (GCs) ainsi que la neurotransmission glutamatergique (McEwen, 2007). Les effets d'un stress chronique sur l'arborisation dendritique dans le CPF sont reproduits par l'administration chronique de corticostérone à des concentrations élevées alors qu'ils sont bloqués par l'administration chronique d'antagonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes (Welman, 2001; Liu and Aghajanian, 2008). La libération de GCs affecte le système glutamatergique. Chez le rat, l'administration chronique de corticostérone provoque une augmentation d'expression des ARNm des sous unités NR2A et NR2B (Weiland et al., 1997). De plus, le blocage des récepteurs NMDA prévient les effets du stress chronique sur l'atrophie des neurones pyramidaux de l'HC (McEwen, 1995). Enfin, les GCs régulent aussi la libération d'acide tels que le glutamate car une surrénalectomie chez le rongeur atténue la libération de glutamate dans l'HC et le CPF engendré par un stress (Moghaddam et al., 1994). Le CPF joue un rôle central dans des processus émotionnels (Gamo and Arnsten, 2011) et régule

l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Diorio et al., 1993). Ainsi, l'atrophie des neurones du CPF peut conduire à des altérations des comportements de type anxieux chez le rongeur et provoquer une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire en exacerbant les réponses au stress (Diorio et al., 1993).

### 3. AGPI N-3 ET AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE

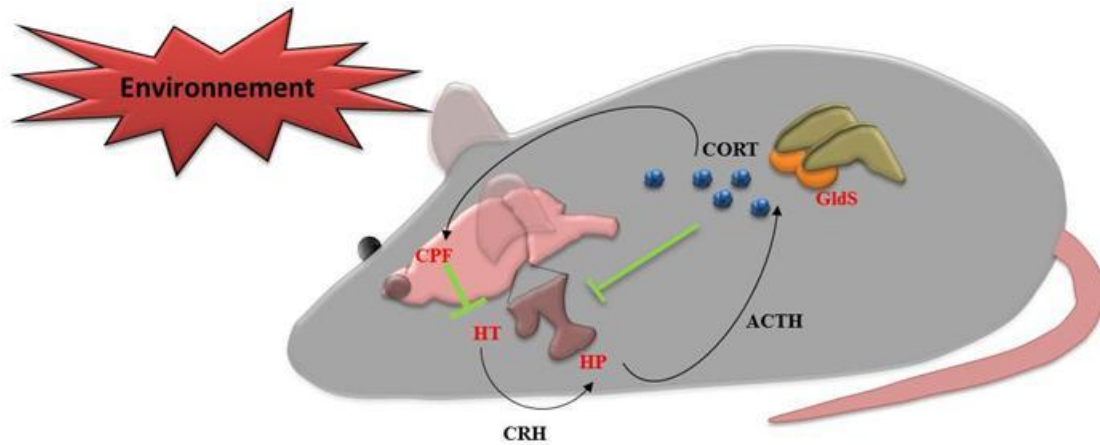
Dans les années 1940, l'endocrinologue Hans Selye défini le stress comme « une réponse non spécifique que donne le corps à toute demande qui lui est faite » (Selye, 1937, 1973) et la réponse de l'organisme comme un « syndrome général d'adaptation ». Ce dernier se compose de plusieurs phases, l'alarme, la résistance et l'épuisement. La première correspond aux réponses physiologiques et comportementales face au stimulus stressant alors que la résistance est l'ensemble des réponses de l'organisme mis en place quand la perturbation perdure (allostasie). La phase d'épuisement correspond à la phase où le corps n'est plus capable de s'adapter et augure des complications du stress, souvent caractérisées par des maladies inflammatoires. D'un point de vue biologique, l'axe hypothalamo-hypophysaire (ou HPA, de l'anglais « hypothalamo-pituitary axis ») est alors décrit comme clé dans l'axe du stress, auquel ont été rajouté depuis les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques, le système immunitaire et enfin le cerveau, notamment les régions impliquées dans les émotions, la mémorisation et la régulation de l'humeur (McEwen, 1998, 2000; Dantzer, 2010).

#### A. L'axe hypothalamo-hypophysaire

L'axe hypothalamo-hypophysaire (ou HPA, de l'anglais « hypothalamo-pituitary axis ») est composé de trois structures principales que sont le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (HT), l'antéhypophyse et les glandes surrénales. Face à un stress, l'axe HPA est activé entraînant la libération accrue de l'hormone corticotropine (CRH) par les neurones du PVN dans le système porte hypophysaire. Cette libération dans les capillaires irriguant l'antéhypophyse induit la sécrétion de l'hormone adrenocorticotropine (ACTH) par les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure. L'ACTH est une hormone peptidique, composée de 39 acides aminés synthétisée à partir d'un peptide précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC) (Riniker et al., 1972). POMC est aussi à l'origine de la synthèse d'autres peptides, opiacés ( $\beta$ -endorphine), lipotrophines et l'hormone stimulante des mélanocytes ( $\gamma$ -MSH). L'ACTH provoque la synthèse et libération de GCs (cortisol chez l'Homme, corticostérone chez le rongeur), par les cellules de la zone fasciculaire de la

corticosurrénale (Slavinski et al., 1976; Nestler et al., 2002). L'ACTH stimule des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés à des protéines G et localisés à la surface des cellules surréaliennes productrices de cortisol, dans les zones fasciculaires et réticulaires. Leur activation par l'ACTH conduit à une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc passant par la stimulation de l'adénylate cyclase. Cet effet aboutit à une entrée de calcium et à la translocation du cholestérol vers la membrane interne mitochondriale et amorce ainsi toute la voie de la biosynthèse des GCs. Les GCs sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production stimulée par l'ACTH est libérée selon un cycle nycthémal par le lobe antérieur de l'hypophyse (de Kloet and Sarabdjitsingh, 2008). En retour, la production et de l'excrétion de l'ACTH est sous l'influence des GC, qui exercent un rétrocontrôle négatif (Jacobson and Sapolsky, 1991; Herman et al., 2003; Cullinan et al., 2008). Dans leurs tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent sur des récepteurs intracellulaires dont l'activation aboutit à la régulation de gènes spécifiques (induction ou répression).

Les GCs permettent à l'organisme de répondre de manière adaptée au stress *via* des modifications biologiques comme l'augmentation du tonus vasculaire, de la pression artérielle, de la fréquence respiratoire et de la gluconéogenèse et comportementale. Ces processus d'ajustements ont été regroupés sous le terme de « coping » (Lazarus, 1993). Face au stress, l'organisme continue à s'adapter pour le maintenir dans un état d'équilibre, défini par McEwen comme l'allostasie (McEwen, 1998). Pourtant, lorsque la charge allostatique devient trop importante, le stress est délétère pour l'organisme (Chrousos, 2009). D'un point de vue biologique, le contrôle des effets des GC est donc finement régulé (McEwen and Wingfield, 2010). Les GCs sont capables de contrôler leur propre sécrétion en agissant sur l'hypothalamus, l'hypophyse ainsi que sur des structures supérieures telles que l'HC, l'AMY ou encore le CPF. Ce rétrocontrôle inhibiteur a pour but de limiter la libération du CRH et de l'ACTH et donc des GCs afin de contrôler les réponses de stress (**Figure 9**).



**Figure 9 :** L'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA). Cortex préfrontal (CPF), hypothalamus (HT), hypophyse (HP), glandes surrénales (GldS), corticostérone (CORT), corticotrophin-releasing hormone (CRH), adreno-corticotrophin hormone (ACTH). Les flèches noires représentent une stimulation et les flèches vertes représentent le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA.

Les récepteurs des GCs sont intracellulaires (Reul and de Kloet, 1985; De Kloet et al., 1998) et membranaires (Tasker et al., 2006). Deux types de récepteurs ont été identifiés : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) lie le cortisol ou la corticostérone et l'aldostérone avec une forte affinité représentée par une constante de dissociation ( $K_d$ ) d'environ 0.5 nM. Le récepteur aux GCs (GR) quant à lui lie spécifiquement les GCs avec une affinité moindre puisque le  $K_d$  est d'environ 5nM. Ainsi, en condition basale, les GCs se fixent préférentiellement sur les MR alors qu'en condition de stress, les MR sont rapidement saturés et les GR vont progressivement être occupés du fait de la libération accrue de GCs (McEwen et al., 1986; Reul et al., 1987a, b; De Kloet et al., 1998). Ces différences ont conduit à l'hypothèse selon laquelle les GR seraient impliqués dans des contextes de stress avec une libération accrue de GCs et les MR dans l'action « basale » des GCs en condition physiologique (de Kloet et al., 2005).

Les récepteurs aux GCs appartiennent à une famille permettant la transcription de gènes. Cette caractéristique a donné le nom d' « action génomique » des récepteurs aux GCs. Cette action génomique est dite lente puisqu'elle nécessite une transcription génique. En effet, cette réponse lente intervient entre 15 et 30 minutes après l'activation des récepteurs (Roumestan et al., 2004; Datson et al., 2008). Les GCs, hormones lipophiles, diffusent passivement à travers la membrane plasmique de la cellule pour se lier aux GR et MR. En l'absence de GCs les récepteurs sont inactifs sous l'effet d'un complexe de protéines chaperones dont la HSP90.

Une fois les récepteurs activés, la protéine HSP90 se dissocie du complexe. Ceci entraîne la translocation nucléaire des récepteurs leur permettant de réguler directement la transcription de gènes en se fixant à des sites spécifiques de l'ADN ou indirectement en interagissant avec d'autres facteurs de transcriptions. Certains gènes sont activés, alors que d'autres sont réprimés quand les GR se lient sous forme de dimère directement à l'ADN, au niveau d'un élément de réponse positif (GRE ; activation) ou négatif (nGRE ; répression). Bien que la répression soit moins fréquente que l'activation, elle joue un rôle important dans le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA. Ainsi, au niveau de l'HT, l'action des GCs mène à l'inhibition de la transcription du CRH *via* la fixation des récepteurs sur l'élément de réponse nGRE proche du promoteur de la CRH (Malkoski and Dorin, 1999). La même action des GCs a été observée au niveau de l'hypophyse (Nakai et al., 1991).

Dès les années 1970, les glucocorticoïdes ont fait l'objet d'études concernant leur capacité à réguler de manière rapide leur propre libération (5 à 10 minutes) en inhibant la libération de CRH et de d'ACTH (Dallman and Yates, 1969; Hinz and Hirschelmann, 2000; Evanson et al., 2010). La médiation de cette réponse rapide se réalise à travers l'activation d'un récepteur membranaire distinct des GR et des MR nucléaires. Ces récepteurs membranaires ont été mis en évidence par l'utilisation de la BSA (de l'anglais « bovine serum albumine ») conjuguée à un agoniste des récepteurs GR formant un complexe qui ne peut pas pénétrer la membrane plasmique (Evanson et al., 2010). De plus cette action non-génomique se traduit par une réponse comportementale rapide (moins de 10 minutes) à la suite de l'administration de corticostérone (Sandi et al., 1996) qui n'implique pas les GR et les MR nucléaires. Enfin, Tasker et collaborateurs ont mis en évidence que le rétrocontrôle inhibiteur rapide non-génomique de l'axe HPA nécessite l'intervention des récepteurs cannabinoïdes de type CB1.

En conclusion, les GCs freinent l'activité de l'axe HPA via un mécanisme à réponse lente, génomique nécessitant une transcription génique faisant intervenir les GR et les MR. Les GCs peuvent également inhiber en quelques minutes l'activation de l'axe HPA par une modulation faisant intervenir des récepteurs membranaires non-génomiques et ainsi promouvoir une réponse rapide et adaptée à une situation de stress.

Le PVN est considéré comme le noyau central dans le contrôle de l'axe HPA, cependant certaines structures extrahypothalamiques ont émergé comme pouvant jouer un rôle important dans le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe, notamment l'HC (McEwen et al., 1986) et le CPF (Diorio et al., 1993; Sullivan and Gratton, 2002). Si l'hippocampe a été beaucoup étudié dans

la régulation de l'axe HPA en raison de la forte densité des deux types de récepteurs MR et GR, le CPF a longtemps été délaissé. Les études de relation ligand-récepteur ont permis de déterminer que le pourcentage de fixation de la dexaméthasone tritiée (GC de synthèse) aux GR dans la région antérieure du néocortex équivaut à 80% de celui mesuré dans l'HC (Meaney et al., 1985). D'autres études ont montré que l'administration chronique de corticostérone dans le CPF réduit l'expression des GR alors qu'une surrénalectomie l'augmente. Des rats soumis à un stress de séparation maternelle présentent 24 heures après une diminution de l'expression des ARNm des GR dans le CPF et l'HC (Avishai-Eliner et al., 1999). La mise en évidence du rôle des GR exprimés dans le CPF dans le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA a été confirmée par l'étude de Diorio en 1993 (Diorio et al., 1993). Chez le rat, la lésion du CPF médian s'accompagne de l'augmentation d'ACTH et de corticostérone plasmatique 20 minutes après un stress de contention alors que l'activité basale de l'axe HPA n'est pas altérée. De plus, l'administration de corticostérone au niveau du CPF médian entraîne une réduction d'ACTH et de corticostérone plasmatique à la suite d'un stress aigu de contention. Sans l'activation du CPF par les GCs, une levée d'inhibition de l'axe en réponse à un stress aigu est observée. Ces résultats indiquent que le CPF joue un rôle crucial dans le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA. Puisque les GR interviennent dans des contextes de stress, la régulation de l'axe HPA par le CPF impliquerait donc les GR. Des études ont montré par l'administration d'un traceur antérograde que le CPF médian projette vers différentes régions limbiques et corticales comme le CPF lui-même, le NAc, le striatum, le noyau basolatéral de l'AMY ou BLA et l'hypothalamus (HT) (Sesack et al., 1989). Même si le CPF médian ne projette pas directement sur le PVN, il semblerait qu'il ait des efférences au niveau du septum (Swanson, 1976) qui à son tour projette sur le PVN (Sawchenko and Swanson, 1983). Une élévation de GCs pourrait donc activer le CPF qui atténuerait la réponse de l'axe HPA via une communication CPF-PVN.

### **B. Axe HPA, troubles de l'humeur et AGPI n-3**

Les dysfonctions de l'axe HPA participent aux mécanismes physiopathologiques de la dépression et de l'anxiété. Il est maintenant admis que le fonctionnement de l'axe HPA est altéré chez des patients atteints de troubles de l'humeur. En effet, les patients souffrant de dépression majeure présentent des niveaux élevés de cortisol dans le sang, de cortisol libre dans les urines, et d'une augmentation de la CRH dans le liquide céphalo-rachidien (Carpenter and Bunney, 1971; Carroll et al., 1976; Nemeroff et al., 1984; Holsboer and Barden, 1996; Holsboer, 2000). Chez l'animal, l'exposition à un stress chronique provoque

l'augmentation des comportements de types dépressifs et anxieux et s'accompagne d'une libération accrue et prolongée de corticostérone (Sapolsky et al., 1986; Blugeot et al., 2011). En outre, il est bien établi que la libération de corticostérone module l'architecture dendritique des neurones pyramidaux au niveau du CPF et de l'HC. L'administration prolongée de corticostérone reproduit les effets de l'exposition à un stress chronique chez le rongeur sur la morphologie de ces neurones dans le CPF et sur les comportements dépendants de cette structure (Wellman, 2001; Liu and Aghajanian, 2008). A l'inverse, un traitement par des antagonistes des récepteurs à la progestérone et GR (mifepristone) bloque les effets du stress chronique sur l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux dans le CPF (Liu and Aghajanian, 2008). L'altération de la fonction et de l'expression des récepteurs aux GCs comme dans le CPF, est aussi incriminée dans le développement de troubles comportementaux de type dépressif (Holsboer and Barden, 1996; Holsboer, 2000; Sapolsky, 2000; Nestler et al., 2002). Chez l'animal, des souris hétérozygotes génétiquement modifiées pour le GR expriment 50% de GR et ont une plus grande vulnérabilité au stress (Ridder et al., 2005). De plus, des rats exposés à un stress chronique présentent une réduction de l'expression des GR au niveau de l'HC (Wright et al., 2006; Hageman et al., 2009) et du CPF (Chiba et al., 2012). L'expression de GR et de ses cibles, SGK1, FKBP5 et BDNF, est diminuée dans l'HC et le cortex de souris déficientes pour le gène Ube3a, un co-activateur des récepteurs GR. Ces altérations de la voie de signalisation des GR sont associées à une élévation des niveaux de corticostérone plasmatique en condition basale (Godavarthi et al., 2012).

Des rats nourris avec un régime déficient en AGPI n-3 ont une hyper-réactivité de l'axe HPA face à un stress traduite par une élévation de corticostérone plus importante que chez des rats équilibrés en AGPI n-3 (Levant et al., 2008). A l'inverse, l'augmentation des niveaux de corticostérone induite par l'administration d'IL-1 $\beta$  est atténuée chez des rats nourris avec un régime enrichi en AGPI n-3 (Song et al., 2003). Une étude récente a montré que l'hypersécrétion de corticostérone induite par un stress chronique est diminuée chez des animaux supplémentés en AGPI n-3 depuis le sevrage (P21). En effet, ces animaux présentaient des niveaux de corticostérone comparables à ceux observés dans le groupe de rats témoins (Ferraz et al., 2011). Des données obtenues chez l'Homme montrent une corrélation entre le faible niveau de DHA dans le plasma et des concentrations élevées de CRH dans le liquide céphalo-rachidien (Hibbeln et al., 2004) et de cortisol dans le plasma (Nieminen et al., 2006). Dans leur ensemble ces données suggèrent qu'une déficience en AGPI n-3

exacerbe les réponses au stress caractérisées par une hyperactivité de l'axe HPA (Harauma and Moriguchi, 2011; Hennebelle et al., 2012).

#### 4. AGPI n-3 ET SYSTEME ENDOCANNABINOÏDE (eCB)

Le rôle du système eCB dans les altérations du comportement émotionnel associées à la faible consommation d'AGPI n-3 repose sur le fait que (i) les AGPI-LC sont les précurseurs des principaux eCB trouvés dans le cerveau (Mackie, 2008). L'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) sont les dérivés métaboliques de l'AA et le N-Docosahexaénoylethanolamide (DHEA) est un dérivé métabolique du DHA (Kim et al., 2011, 2012). (ii) Le système eCB est le système neuromodulateur le plus important du SNC et est impliqué dans les processus émotionnels et motivationnels (Hill and Gorzalka, 2009).

##### A. présentation du système eCB

Le système eCB comprend des récepteurs, des ligands endogènes (eCB) de ces récepteurs et les enzymes impliquées dans la biosynthèse, la dégradation et le transport des eCB (Piomelli, 2003; Venance et al., 2004; Di Marzo, 2008). L'identification des molécules qui composent le système eCB repose sur la mise en évidence en 1964 du principe actif du cannabis (*cannabis sativa*), le  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol ou  $\Delta^9$ -THC (Sondheimer et al., 1964).

##### *Les récepteurs cannabinoïdes (CB)*

Les récepteurs CB appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires. Ils ont été mis en évidence par des approches de liaison sur coupe de ligands radiomarqués puis séquencés et clonés dans les années 1990 (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). L'analyse de leur structure moléculaire a révélé l'existence de deux récepteurs, CB1R et CB2R qui diffèrent de par leurs activités et de leurs localisations. Bien que CB1R et CB2R soient les récepteurs les plus connus et les mieux caractérisés, plusieurs études pharmacologiques ont suggéré l'existence de deux autres récepteurs CB. Parmi eux, TRPV1 (de l'anglais « transient receptor potential vanilloïde 1 ») qui est activé par l'AEA (Starowicz et al., 2007) et GPR55 (de l'anglais « G protein-coupled receptor 55 ») activé par l'AEA, le 2-AG et le  $\Delta^9$ -THC (Brown, 2007).

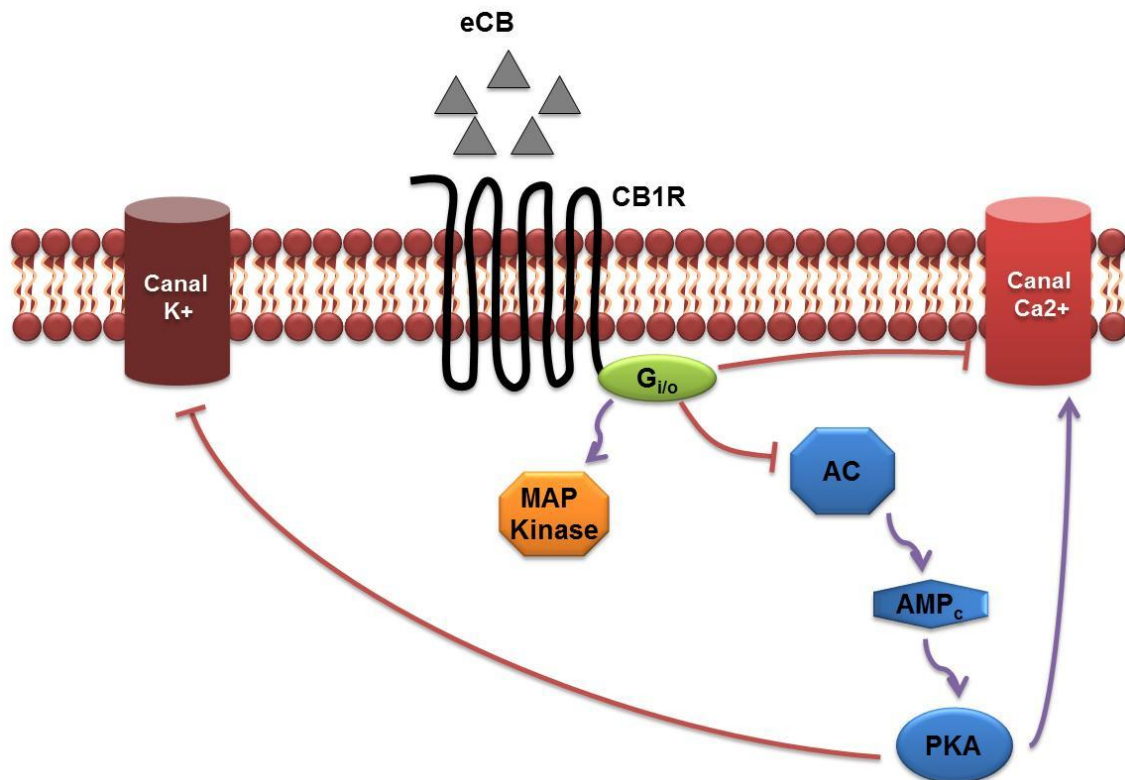
Par des approches d'anticorps dirigés spécifiquement contre CB1R, l'équipe de Ken Mackie a pu établir une carte d'expression de CB1R, pour revue (Mackie, 2005). Ainsi, CB1R est très abondant dans le SNC. Les régions cérébrales dans lesquelles les récepteurs CB1 sont le plus

fortement exprimés sont le cortex, l'HC, l'AMY, le cervelet, le striatum et l'aire tegmentale ventrale (Mackie, 2005). De plus, l'intensité de l'immunoréactivité CB1R positive est très marquée dans les couches II/III du CPF (Lafourcade et al., 2007). CB1R est également exprimé par les cellules gliales (astrocytes, microglies et oligodendrocytes) mais dans des proportions plus faibles (10 à 100 fois moins que dans les neurones) (Arevalo-Martin et al., 2003; Guzman, 2003; Carrier et al., 2004). L'utilisation de souris transgéniques CB1R<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence que ces récepteurs sont exclusivement localisés dans les boutons présynaptiques des neurones excitateurs (Glutamate) et inhibiteurs (GABA pour acide gamma-aminobutyrique) (Freund et al., 2003). La localisation présynaptique de CB1R a été identifiée dans l'HC, l'HT, le néocortex, le cervelet et le noyau accumbens (NAc) (Katona et al., 2000; Robbe et al., 2001; Kawamura et al., 2006; Wittmann et al., 2007). Les ARNm du CB2R sont essentiellement exprimés par les cellules du système de l'immunité périphérique (lymphocytes, monocytes et macrophages) et cérébrale (cellules microgliales) (Stella, 2004; Atwood and Mackie, 2010). La différence de localisation d'expression des CB1R et CB2R renforce l'idée que le CB1R est impliqué dans les effets neuronaux des CB alors que le CB2R est impliqué dans les effets immunomodulateurs des CB.

#### *Les voies de signalisation intracellulaires du CB1R*

La fixation des ligands synthétiques ou endogènes aux récepteurs CB1 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (AC) (Selley et al., 1996; Griffin et al., 1998). En 1984, Howlett montre que le  $\Delta^9$ -THC empêche la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de fractions de membranes plasmiques issues de cellules hybrides de neuroblastome de souris N18TG2 (Howlett and Fleming, 1984). Cette inhibition disparaît en présence de toxine pertussique, connue pour augmenter la production d'AMPc, démontrant ainsi l'intervention d'une protéine G de type Gi/o dans le couplage récepteur (CB1R)/enzyme (Gi/o) (Felder et al., 1992; Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002). En condition basale, les protéines G forment un hétérodimère constitué des sous unités  $\alpha\beta\gamma$  et  $G\alpha$  liée au GDP. L'activation du récepteur par son ligand se traduit par l'échange du GDP par une GTP au niveau de  $G\alpha$ . Cet échange entraîne la dissociation du complexe hétérodimérique et l'activation/l'inhibition de différents effecteurs. Ainsi, l'activation de la protéine Gi/o induit le blocage de la production de l'AMPc par l'AC et une moindre activité de la protéine kinase A (PKA). Cette signalisation en cascade diminue en outre la sensibilité au potentiel de membrane des canaux potassiques de type A (KA) aboutissant, in fine, à l'augmentation des courants potassiques sortants (hyperpolarisants) au niveau du neurone présynaptique. L'activation de CB1R va

induire l'inhibition des canaux calciques dépendant du voltage (Chemin et al., 2001; Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002). Les agonistes des CB1R inhibent la perméabilité des canaux calciques et favorisent celle des canaux potassiques au niveau présynaptique entraînant l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs. L'expression de plusieurs membres de la superfamille des MAPK (de l'anglais « mitogen-activated protein kinase) tels que ERK1/2 (Bouaboula et al., 1995a; Bouaboula et al., 1995b) ou encore AKT peuvent également être modulés *via* l'activation des CB1R. Les MAPK ont un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. La plupart des études montrent que les agonistes des récepteurs cannabinoïdes entraînent l'activation de la voie des MAPK (Bouaboula et al., 1995a; Bouaboula et al., 1995b). Cependant, d'autres études indiquent une diminution significative de la phosphorylation de ERK1/2 à la suite d'une stimulation par le WIN55,212-2 (Wu et al., 2011) ou par l'AEA (Rueda et al., 2002). (**Figure 10**).



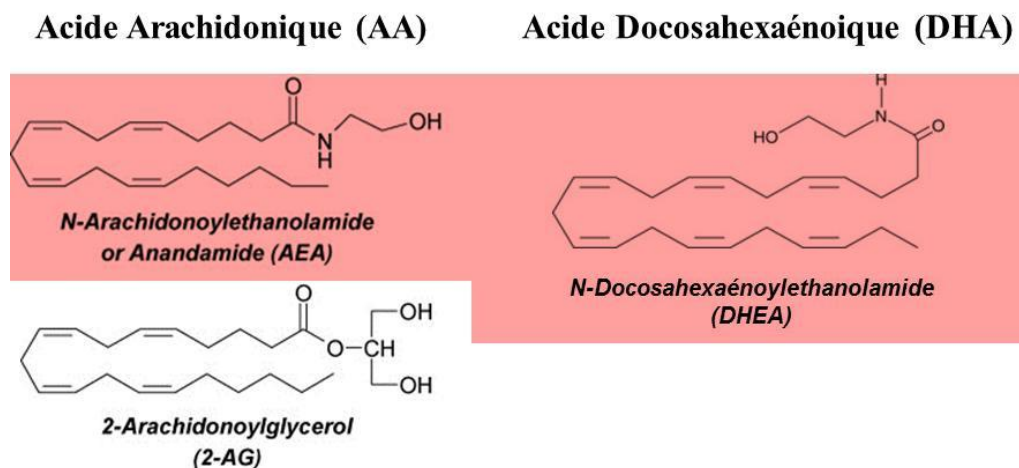
**Figure 10 :** Principales voies de signalisation des récepteurs des cannabinoïdes. Les flèches rouges représentent les inhibitions, les flèches violettes représentent les activations. Endocannabinoïdes (eCB) ; adenylate cyclase (AC) ; adénosine monophosphate cyclique (AMP<sub>c</sub>) ; protéine kinase A (PKA) ; mitogen-activated protein (MAP) kinase

La fixation des agonistes CB1 sur ces récepteurs provoque la désensibilisation de ces derniers (Dill and Howlett, 1988). Ce mécanisme de régulation négative a pour objectif de contrôler la durée d'activation du CB1 de manière à éviter les effets délétères d'une stimulation prolongée du récepteur. La désensibilisation des RCPG est dépendante des kinases à protéines G (GRK de l'anglais « G proteins regulated kinases ») par phosphorylation des résidus sérine/thréonine de l'extrémité C-terminale du récepteur (Bouvier et al., 1988; Jin et al., 1999). La phosphorylation conduit à la fixation de la protéine  $\beta$ -arestine sur le récepteur entraînant le découplage fonctionnel récepteur/protéine G permettant ainsi la désensibilisation mais aussi l'internalisation du récepteur. En effet, la surexpression d'un mutant dominant négatif de la  $\beta$ -arestine (Kouznetsova et al., 2002) ou l'invalidation du gène codant pour cette protéine (Bohn et al., 2000) empêchent la désensibilisation des récepteurs RCPG. In vivo, l'administration chronique de  $\Delta^9$ -THC à des rats empêche le WIN55,212-2 (un agoniste des CBR) de stimuler le couplage récepteur/protéine G dans l'HC et le cortex (Sim et al., 1996). Cet effet est robuste car il persiste jusqu'à 14 jours après la fin du traitement par le  $\Delta^9$ -THC dans l'HC (Sim-Selley et al., 2006). De plus, la désensibilisation et le découplage CB1R/protéine G observés à la suite d'un traitement chronique avec le  $\Delta^9$ -THC sont associés à des altérations comportementales chez le rat (Rubino et al., 2008). Les auteurs de cette étude rapportent que des rats traités pendant 11 jours au  $\Delta^9$ -THC présentent des comportements de type dépressifs mesurés par le FST et le test de préférence au sucrose (anhédonie). Ces données suggèrent que les altérations des comportements émotionnels induites par l'exposition prolongée aux CB pourraient être dues en partie à la désensibilisation des CB1R.

### *Les endocannabinoïdes*

Contrairement aux neurotransmetteurs, les eCB ne sont pas stockés dans des vésicules présynaptiques. Ils sont produits "à la demande" par la dépolarisation des neurones postsynaptiques et par l'augmentation de calcium intracellulaire (Freund et al., 2003) menant à l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires. En effet, les eCB sont d'un point de vue moléculaire des produits de la métabolisation des AGPI possédant 20 atomes de carbone comme l'AA (20:4n-6) ou 22 atomes de carbone comme le DHA (22:6n-3) (Mackie, 2008; Wood et al., 2010; Kim et al., 2011, 2012). Les 2 ligands les plus largement étudiés sont l'AEA (Devane et al., 1992) et le 2-AG (Sugiura et al., 1995) (**figure 11**). La synthèse de l'AEA s'initie par le transfert de l'AA issu du phosphatidylecholine (PC) vers une phosphatidyléthanolamine (PE) via la N-acyltransférase (NAT) qui génère le N-arachidonoylphosphatidyléthanolamine (NArPE). L'intervention de la phospholipase D est la

dernière étape de la production de l'AEA (Di Marzo et al., 2007). Le 2-AG quant à lui se forme à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol (PI) riche en AA via une phospholipase C qui conduit à la formation de diacylglycerol (DAG). Le DAG est ensuite hydrolysé par la DAG lipase en 2-AG (Hillard, 2000; Sugiura et al., 2002; Di Marzo, 2008). La demi-vie des eCB dans la fente synaptique est très courte (Di Marzo, De Petrocellis et al., 2005). Les eCB sont hydrolysés par la FAAH (de l'anglais « fatty acid amide hydrolase ») pour former deux composés : l'éthanolamine (EtNH<sub>2</sub>) et l'AA (Deutsch et al., 2002; Ueda, 2002). Le 2-AG est principalement catabolisé par une monoacylglycérol lipase (MAGL) en glycérol et en AA (Karlsson et al., 1997; Dinh et al., 2002; Ueda, 2002). L'AEA et le 2-AG sont également des substrats pour les cyclooxygénases (COX) 2.



**Figure 11 :** Structures chimiques des endocannabinoïdes : Anandamide (AEA), 2-arachidonoyl glycérol (2AG) et N-Docosahexaénylethanolamide (DHEA). L'AEA et le 2-AG sont des dérivés métaboliques de l'acide arachidonique (AA). Le DHEA est un dérivé métabolique de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et appartient à la famille des N-acyléthanolamine comme l'AEA, cette famille est colorée en rouge.

Puisque les eCB sont issus de précurseurs d'AGPI n-3 et n-6, certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle la manipulation par les régimes alimentaires des niveaux d'AGPI n-3 et n-6 engendre des modifications des teneurs en endocannabinoïdes (Berger et al., 2001; Watanabe et al., 2003; Artmann et al., 2008; Wood et al., 2010). Des porcelets nourris 18 jours avec une diète contenant du LA, de l'ALA, de l'AA et du DHA depuis la naissance ont non seulement des teneurs en AA et en DHA augmentées dans le cerveau mais également d'AEA et de Docosahexaenylethanolamide (DHEA). Une déficience en acides gras

essentiels perturbe donc profondément le métabolisme des eCB (Berger et al., 2001). L'impact des AGPI alimentaires sur les taux d'eCB n'est pas identique d'une structure cérébrale à l'autre. Ainsi, les teneurs en AEA et DHEA sont égales dans l'HC quel que soit le groupe alors que le DHEA augmente dans le cortex auditif et le striatum. Le DHEA augmente et l'AEA diminue dans des homogénats de cerveaux de souris supplémentées en DHA pendant 2 semaines (Wood et al., 2010), mais pas pendant 1 semaine (Artmann et al., 2008). Le DHA n'augmente pas dans le cerveau des souris dans cette dernière étude ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet du régime sur les eCB. Le 2-AG augmente alors que le DHA diminue dans les homogénats de cerveaux de souris déficientes en AGPI n-3. Cependant, aucune modification dans les niveaux d'AA n'a été observée chez les souris déficientes en AGPI n-3 (Watanabe et al., 2003). Ces résultats suggèrent que le DHA inhibe certaines étapes de biosynthèse du 2-AG, mais ce mécanisme reste à mettre en évidence. Dans leur ensemble, ces études montrent que les AGPI alimentaires influencent les niveaux d'eCB dans le cerveau. En revanche, les conséquences physiologiques de ces modifications sont encore méconnues et nécessitent des études plus approfondies.

#### *Modulation de la neurotransmission*

Le système eCB joue un rôle primordial dans la plasticité synaptique. L'activation des CB1R présynaptiques par les eCB entraîne l'hyperpolarisation du neurone présynaptique via l'ouverture de canaux potassiques et le blocage de canaux calciques empêchant ainsi de dépolariiser la membrane. En conséquence, l'activation des CB1R inhibe la libération des neurotransmetteurs (GABA, glutamate, sérotonine...) des terminaisons présynaptiques (Wilson and Nicoll, 2001, 2002 ; Freund et al., 2003).

En dépolariisant pendant 5 à 10 secondes les neurones du cervelet, les courants spontanés postsynaptiques GABAergique sont momentanément réduits (Pitler and Alger, 1992). Ce phénomène de plasticité à court terme (quelques secondes) a été nommé DSI (pour « depolarization induced suppression of inhibition »). Cette inhibition a aussi été retrouvée au niveau des synapses glutamatergiques excitatrices (Kreitzer and Regehr, 2002) et a été appelée DSE (pour « depolarization induced suppression of excitation »). Le fait que les courants postsynaptiques présentent des fréquences d'apparitions réduites après dépolariisation mais une amplitude non affectée suggère que ces phénomènes de DSI/DSE sont d'origine présynaptique. Par la suite la DSI/DSE a été décrit dans d'autres structures que le cervelet, notamment, le striatum (Uchigashima et al., 2007) et l'HC (Wilson and Nicoll, 2001; Straiker

and Mackie, 2005). La signalisation dépendante du système eCB représente donc un mécanisme par lequel les neurones peuvent communiquer *via* un signal rétrograde pour moduler leur activité.

La capacité d'un neurone à modifier la force de sa transmission synaptique d'une manière durable (de quelques heures à plusieurs jours) a été nommée plasticité synaptique à long terme et est considérée comme étant la base moléculaire de l'apprentissage et de la mémoire (Sanderson et al., 2008). Le système eCB joue un rôle crucial dans les phénomènes de plasticité synaptique à long terme. A l'instar de la plasticité à court terme, les modifications à long terme dépendante des endocannabinoïdes se traduisent par une diminution de la force synaptique ou dépression à long terme (LTD de l'anglais « long term depression »). D'un point de vue fonctionnel, la LTD peut être expérimentalement induite par une stimulation à basse fréquence (13 Hz) pendant 10 minutes. La LTD dépendante du système eCB (LTD-eCB) et notamment du CB1R a d'abord été observée au niveau des synapses excitatrices du striatum dorsal (Gerdeman et al., 2002). Par la suite de nombreuses études ont permis de mettre en évidence que le CB1R était nécessaire à l'induction de la LTD-eCB dans d'autres structures cérébrales. En effet, l'administration d'antagoniste du CB1R chez des souris sauvages ou bien la délétion génétique du CB1R empêche l'induction de la LTD-eCB dans le NAc (Robbe et al., 2002), le CPF (Lafourcade et al., 2007) et l'HC (Yasuda et al., 2008) au niveau des synapses excitatrices. La LTD-eCB a également été observée au niveau des synapses inhibitrices GABAergiques dans l'AMY (Marsicano et al., 2002; Azad et al., 2004; Chevalleyre et al., 2007) et l'HC (Chevalleyre et al., 2003; Zhu et al., 2007). En conclusion, la LTD-eCB est un phénomène de plasticité largement présent dans le cerveau et peut être observé au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices. L'abondance de ce phénomène de plasticité dans des structures cérébrales impliquées dans certains comportements suggère que la LTD-eCB pourrait être un mécanisme fondamental dans la transmission synaptique des réseaux neuronaux et des comportements complexes.

## **B. Système eCB et modulation de l'axe HPA**

Le système eCB *via* son récepteur CB1 est mis en jeu lors du rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA (Hill and Tasker, 2012). L'altération du système eCB par des approches transgéniques ou pharmacologiques augmente l'activité de l'axe HPA. Par exemple, l'administration intraventriculaire de l'antagoniste spécifique du CB1R Rimonabant chez le rat (12.5 et 50 µg par rat) ou intraveineux (0.1, 0.3, 1, 3 et 10 mg par kg) chez la souris augmente l'ACTH et la

corticostérone plasmatique avec un pic de réponse 60 minutes après l'injection (Manzanares et al., 1999; Gonzalez et al., 2004; Patel et al., 2004; Wade et al., 2006; Atkinson et al., 2010; Newsom et al., 2012). L'inactivation du gène codant pour CB1R induit une augmentation des concentrations de corticostérone (Steiner et al., 2008a), des niveaux d'ACTH (Haller et al., 2004b) et des ARN messagers de CRH dans le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (Cota et al., 2003; Cota et al., 2007) en conditions basales corroborant ainsi les études d'inactivation pharmacologique. Ces résultats suggèrent que les eCBs jouent un rôle dans le rétrocontrôle inhibiteur de l'axe HPA en condition basale. CB1R serait impliqué dans ces changements neuroendocriniens puisque son inactivation entraîne une hyperactivité de l'axe HPA. L'augmentation des concentrations de corticostérone induit par le Rimonabant chez le rat a été observée pendant la phase diurne spécifiquement (Atkinson et al., 2010). L'inactivation du gène codant pour le récepteur CB1 entraîne une augmentation d'ACTH et de corticostérone quelle que soit la période de la journée (Cota et al., 2007). Malgré 2 études qui ne montrent pas de modification neuroendocrine chez les souris déficientes pour le récepteur CB1 (Fride et al., 2005; Aso et al., 2008), il existe un large consensus en faveur d'une régulation de l'activité de l'axe HPA par le système eCB en condition basale. Le système eCB jouerait aussi un rôle important dans la réponse au stress par un rétrocontrôle négatif rapide de l'axe HPA. Sur des tranches de PVN, l'application de GCs supprime l'activité synaptique des neurones glutamatergiques en inhibant la libération du glutamate dans le PVN (Di et al., 2003). Cette suppression présynaptique est rapide (3 à 5 minutes post-administration) et fait intervenir un récepteur aux glucocorticoïdes membranaire. L'application d'antagonistes des GR et MR ou encore l'infusion de GCs directement dans le cytoplasme du neurone ne suppriment pas la libération de glutamate suggérant que ces récepteurs ne sont pas impliqués. En revanche, l'activité synaptique des neurones glutamatergiques du PVN est bloquée lorsque la dexaméthasone est conjuguée à la BSA empêchant la dexaméthasone de traverser la membrane plasmique (Di et al., 2005). Au niveau du PVN, les CB1R sont localisés sur les terminaisons synaptiques des neurones glutamatergiques. L'inhibition de l'activité des neurones glutamatergiques par les GCs est dépendante de l'activation de CB1R puisque l'ajout d'antagoniste CB1R bloque les effets des GCs sur l'activité glutamatergique (Di et al., 2003; Malcher-Lopes et al., 2006). Ces résultats indiquent que les GCs agiraient en mobilisant le système eCB dans le PVN afin de réduire rapidement l'activité des synapses excitatrices qui projettent sur les neurones à CRH. Les GCs augmentent les niveaux de 2-AG et d'AEA sur des tranches de PVN *in vitro* (Malcher-Lopes et al., 2006) et dans l'HT de rat *in vivo* (Hill et al., 2010). Afin de tester l'hypothèse selon

laquelle le stress est suffisant pour augmenter les niveaux d'eCB dans l'HT, Evanson et collaborateurs ont soumis des rats à un stress de contention (Evanson et al., 2010). Le stress de contention entraîne une élévation des niveaux de 2-AG dans l'HT immédiatement après le stress et 60 minutes après la fin du stress. L'administration de dexaméthasone dans le PVN réduit les niveaux de corticostérone à la suite du stress de contention (rétrocontrôle négatif). De plus l'antagoniste CB1 (AM251) empêche le rétrocontrôle négatif rapide de l'axe HPA induit par l'administration dans le PVN de GCs avant le stress de contention. De manière générale, toutes ces études suggèrent que les GCs au niveau du PVN de l'HT mènent à l'activation de CB1R qui à son tour exercerait un rétrocontrôle négatif rapide de l'axe HPA après un stress aigu. Le rétrocontrôle négatif rapide de l'axe HPA par le système eCB a également été décrit dans des structures extrahypothalamiques qui communiquent avec le PVN comme le CPF par exemple. L'exposition à un stress de contention entraîne une élévation des niveaux de 2-AG au niveau du CPF (Hill et al., 2011). La micro-injection d'antagoniste CB1R dans le CPF 10 minutes avant le stress n'affecte pas les niveaux de corticostérone mesurés immédiatement après le stress. En revanche, 30 minutes après la fin du stress, l'antagoniste CB1R administré dans le CPF provoque l'augmentation de libération de corticostérone. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du 2-AG dans le CPF sous l'effet du stress contribue à inhiber la réponse au stress. L'élévation de 2-AG par les GCs serait due à une action génomique des GCs puisque l'administration dans le CPF de Mifépristone bloque la synthèse de 2-AG induite par le stress (Hill et al., 2011). Des approches d'immunohistochimie et de microscopie électronique ont permis de montrer que les CB1R sont en grande partie exprimés par les neurones GABAergiques du CPF au niveau de la couche V. *In vitro*, la corticostérone entraîne une diminution de l'activité des neurones GABAergiques dans des tranches de CPF. Dans leur ensemble ces données suggèrent que la libération de GCs à la suite d'un stress active CB1R par le 2-AG. Il s'ensuit une inhibition de l'activité des neurones GABAergiques qui projettent localement sur les neurones pyramidaux du CPF entraînant l'arrêt de la réponse au stress.

### C. Système eCB et comportements émotionnels

Le rôle du système eCB dans la régulation des comportements anxieux et dépressifs a été révélé par des études cliniques. Ainsi, des patients souffrant de dépression majeure présentent une diminution des niveaux d'eCB par rapport à des individus sains (Hill et al., 2008a). Une méta-analyse des essais étudiant l'efficacité et l'innocuité de l'antagoniste des CB1R, le Rimonabant, un traitement contre l'obésité, révèle que sa prise prolongée (20 mg par jour)

augmente le risque de développer des troubles neuropsychiatriques et notamment une dépression et une anxiété (Christensen et al., 2007a; Christensen et al., 2007b). Des études précliniques montrent que la manipulation pharmacologique ou génétique du système eCB chez les rongeurs engendre des altérations du comportement émotionnel (Bambico et al., 2009). De fait, l'administration aiguë ou chronique d'antagonistes des CB1R comme le Rimonabant provoque des comportements de type dépressifs mesurés en FST (Beyer et al., 2010) et anxieux mesurés en EPM (Haller et al., 2002) chez le rongeur. De plus, l'inactivation du gène codant pour CB1R entraîne une augmentation du temps d'immobilité dans le FST par rapport aux souris sauvages (Aso et al., 2008; Steiner et al., 2008b). De même, des comportements de type anxieux mesurés dans le test de la « light-dark box » ou encore l'EPM ont été décrits chez des souris « knock out » pour le gène CB1R (Haller et al., 2004b; Haller et al., 2004a; Hill et al., 2011a; Hill et al., 2011b). Enfin, l'activation pharmacologique aiguë des CB1R induit des effets antidépresseurs (Rutkowska and Jachimczuk, 2004; Hill and Gorzalka, 2005; Bambico et al., 2007). En effet, une seule injection périphérique de l'agoniste CB1R ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) (Rutkowska and Jachimczuk, 2004) ou de WIN55,212-2 (Bambico et al., 2007) diminue le temps d'immobilité dans le FST. Chez le rat, l'effet antidépresseur du WIN55,212-2 est dépendant de CB1R puisque l'injection de Rimonabant bloque l'effet comportemental du WIN55,212-2. Cet effet n'est obtenu qu'à de faibles doses (0.1 et 0.2mg/kg) alors qu'à de plus fortes doses (1 et 2mg/kg) le WIN55,212-2 est dépressogène (Bambico et al., 2007). De plus, l'injection à des rats d'une dose faible de 1µg/kg de CP55,940 (agoniste des récepteurs CB) augmente le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. A l'opposé, une dose forte de 50µg/kg de CP55,940 diminue le temps passé dans les bras ouverts reflétant un comportement de type anxieux chez le rat (Marco et al., 2004). Ainsi, l'administration de doses faibles de cannabinoïdes induits des effets antidépresseurs et anxiolytiques alors que des doses plus élevées sont toujours de types dépresseurs et anxiogéniques (Dewey, 1986; Rodriguez de Fonseca et al., 1996; Hill and Gorzalka, 2004; Marco et al., 2004; Celerier et al., 2006; Moreira and Wotjak, 2010). Les effets bidirectionnels des cannabinoïdes pourraient être dus à la saturation des CB1R dans des régions spécifiques du cerveau. En effet, les effets anxiolytiques et antidépresseurs des cannabinoïdes sont dépendants de l'activation des CB1R du CPF et de la partie ventrale de l'HC (Bambico et al., 2007; Rubino et al., 2008). Les effets anxiogéniques des CB quant à eux sont associés à l'activation des CB1R de l'AMY (Rubino et al., 2008) et de l'HC dorsal (Roohbakhsh et al., 2007).

Le traitement prolongé par des antagonistes CB1R reproduit les effets d'un stress chronique chez le rongeur (Beyer et al., 2010). L'administration de 10mg/kg de Rimonabant pendant 21 jours ou l'exposition à un stress chronique augmentent de la même manière le temps d'immobilité mesuré dans le test du FST et réduisent la préférence au sucre. De plus, les niveaux de sérotonine et de BDNF qui sont altérés à la suite d'un stress chronique, sont tous deux réduits dans le CPF des rats traités au Rimonabant suggérant un lien entre le stress chronique et l'altération du système eCB (Beyer et al., 2010). Le stress chronique altère le système eCB chez le rongeur. Ainsi, un stress chronique non prévisible (CUS de l'anglais « chronic unpredictable stress ») diminue les taux d'AEA dans le CPF, l'AMY et l'HC (Bortolato et al., 2007; Hill et al., 2008b). Une étude clinique a mis en évidence des niveaux d'AEA plus faibles dans le sang de patients souffrant de troubles anxieux par rapport à des sujets sains (Hill et al., 2008). Dans leur ensemble ces études révèlent l'importance du système eCB dans la régulation de l'axe du stress et des comportements émotionnels.

#### **D. Système eCB et arborisation dendritique**

Le blocage pharmacologique ou génétique des récepteurs CB1 provoque un remodelage de l'arborisation dendritique dans le CPF et l'AMY (Kolb et al., 2006; Hill et al., 2011a; Hill et al., 2012) à l'instar d'un stress chronique chez le rongeur. Ainsi les souris déficientes pour le récepteur CB1 présentent une réduction de l'arborisation dendritique des couches II/III du CPF similaire à celle observée chez des rongeurs soumis à un stress chronique (Hill et al., 2011a). L'exposition prolongée à l'agoniste des CB1R  $\Delta^9$ -THC induit une expansion de l'arborisation dendritique dans le CPF (Kolb et al., 2006). Inversement, la délétion génétique de CB1 entraîne une expansion de l'arborisation dendritique de l'AMY (Hill et al., 2011a). Certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation d'acides aminés excitateurs pourrait rendre compte de ces remodelages de l'arborisation dendritique dans le CPF et l'AMY. En effet, des souris « knock out » pour le gène CB1R présentent une altération dans la clairance du glutamate accompagnée d'une réduction du transporteur du glutamate au sein des astrocytes du CPF (Zoppi et al., 2011). De plus, l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA bloque l'atrophie neuronale à la suite d'un stress chronique (McEwen et al., 1995). A l'opposé, l'augmentation de la transmission excitatrice dans le noyau basolatéral (BLA) de l'AMY entraîne une expansion de l'arborisation dendritique. Il a été montré que la délétion du gène codant le récepteur NR2A induit une atrophie de l'arborisation neuronale dans le BLA (Mozhui et al., 2010). La surexpression des canaux potassiques SK2, impliqués dans la réduction de l'excitabilité intrinsèque des

neurones du BLA, provoque une atrophie dendritique (Mitra et al., 2009). Dans leur ensemble, ces données démontrent que l'altération du système eCB provoque des remaniements dendritiques dans le CPF et l'AMY similaires à ceux observés à la suite d'un stress chronique.

**Résumé** : en modulant la fluidité membranaire des cellules, les AGPI agissent directement sur la fonctionnalité des protéines qui y sont insérées. Ainsi les systèmes de signalisations cellulaires, de neurotransmissions, de plasticité neuronale, notamment l'architecture dendritique ou encore des systèmes neurobiologiques complexes tels que le système eCB ou HPA peuvent être altérés par des changements de statut lipidique. Le développement de comportements de type dépressif et anxieux chez les rongeurs soumis à un régime pauvre en AGPI n-3 pourrait être lié à l'altération de ces systèmes neurobiologiques.

---

# Hypothèse et objectif

---

## VI. HYPOTHESE ET OBJECTIF

L'ensemble des données bibliographiques nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la consommation de diètes déséquilibrées en AGPI n-3 entraîne une altération du fonctionnement **du système endocannabinoïde et/ou de l'axe hypothalamo-hypophysaire qui sont impliqués dans le développement des comportements de type dépressif et anxieux.**

**L'objectif général de mon travail de thèse** a été de d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels un régime déficient en AGPI n-3 induit les comportements de type dépressif et anxieux chez le rongeur.

Les sous-objectifs sont:

1. Etudier les effets de l'exposition à long terme à un régime déséquilibré en AGPI n-3 sur les **comportements de type dépressif et anxieux** et sur la **plasticité synaptique dépendante du système endocannabinoïde dans le cortex préfrontal** (article 1).
2. Etudier les effets de l'exposition à long terme à un régime déséquilibré en AGPI n-3 sur les comportements de type dépressif et anxieux et sur les **voies de signalisation associées au système endocannabinoïde dans le cortex préfrontal** (article 2).
3. Etudier l'importance relative de l'**axe hypothalamo-hypophysaire** dans les effets de la consommation de diètes déséquilibrées en AGPI n-3 sur la **plasticité de l'arborisation dendritique dans le cortex préfrontal** et les comportements de type dépressif et anxieux (article 3).

---

# Résultats

---

## VII. RESULTATS

### 1. ETUDE DE L'OBJECTIF 1 (ARTICLE 1)

#### **Une carence nutritionnelle en AGPI n-3 altère les fonctions neuronales dépendantes du système endocannabinoïde.**

Des études épidémiologiques ont mis en relation une faible consommation d'AGPI n-3 et la prévalence de développer des troubles neuropsychiatriques. Cependant, les mécanismes cellulaires par lesquels une consommation déséquilibrée en AGPI n-3 conduit à des altérations de ces comportements sont peu connus. Des études récentes ont montré chez les rongeurs que les comportements de type dépressif et anxieux sont modulés par le système endocannabinoïde, un régulateur majeur des synapses excitatrices et inhibitrices. D'un point de vue moléculaire les AGPI-LC sont les précurseurs de la synthèse des 2 ligands endogènes des récepteurs endocannabinoïdes, l'AEA et le 2-AG. Ce lien étroit entre les AGPI et les eCB a été renforcé par une étude montrant que la supplémentation en AGPI n-3 réduit les niveaux de 2-AG chez la souris alors qu'une déficience en AGPI n-3 augmente les niveaux dans le cerveau. Dans ce travail, nous avons examiné le rôle potentiel des AGPI n-3 sur les comportements dépressif et anxieux ainsi que sur la plasticité synaptique dépendante des eCB. Nos résultats montrent que les effets comportementaux d'un agoniste des récepteurs des endocannabinoïdes (WIN55,212-2) ne se développent pas chez les souris déficientes en AGPI n-3. Ces résultats suggèrent que le récepteur CB1 n'est pas fonctionnel dans le cerveau des souris déficientes en AGPI n-3. Ces données mettent en évidence un lien direct entre l'alimentation, le système eCB et la modification des comportements de type dépressif et anxieux. Par des approches électrophysiologiques sur des tranches de CPF préparées à partir des différents groupes expérimentaux de souris, nous avons pu montrer que la eCB-LTD (Long Term Depression) est abolie chez les souris déficientes en AGPI n-3. Cette altération serait due à une réduction de la fonction du récepteur CB1 au niveau du CPF via un découplage du récepteur avec sa voie de signalisation (protéine Gi/o). L'altération de la plasticité synaptique CB1 dépendante s'accompagne en outre d'altérations des comportements de type dépressifs et anxieux. Les mécanismes par lesquels l'apport alimentaire en AGPI n-3 contribue au développement de troubles neuropsychiatriques sont encore mal connus. Ces résultats suggèrent qu'un déséquilibre entre AGPI n-6 et n-3 induit des comportements de type dépressif et anxieux chez la souris par une altération de la plasticité synaptique corticale dépendante des eCB. En accord avec cette hypothèse, il est maintenant bien admis que le

système eCB comme le CPF sont impliqués dans les troubles de l'humeur. Ce travail a été publié en 2011 « Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions » par M. Lafourcade, T. Larrieu, S. Mato, A. Dufaud, M. Sepers, I. Matias, V. De Smedt Peyrusse, V. Labrousse, L. Bretilon, C. Matute, R. Rodriguez-Puertas, S. Layé et O. Manzoni, *Nature Neuroscience*, 2011, 14(3):345-50. M. Lafourcade, T. Larrieu et S. Mato partagent le statut de premier auteur. S. Layé et O. Manzoni partagent le statut de dernier auteur. Mes contributions dans ce travail ont été de concevoir et de réaliser la majorité des expériences de comportement ainsi que l'analyse, l'interprétation des données et l'écriture d'une partie du manuscrit. Une copie de cet article publié ainsi que les données supplémentaires constituent le présent chapitre de mon travail de thèse.

# Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions

Mathieu Lafourcade<sup>1,2,10</sup>, Thomas Larrieu<sup>2,3,10</sup>, Susana Mato<sup>4,10</sup>, Anaïs Duffaud<sup>2,3</sup>, Marja Sepers<sup>1,2</sup>, Isabelle Matias<sup>1,2</sup>, Veronique De Smedt-Peyrusse<sup>2,3</sup>, Virginie F Labrousse<sup>2,3</sup>, Lionel Bretillon<sup>5</sup>, Carlos Matute<sup>4</sup>, Rafael Rodríguez-Puertas<sup>6</sup>, Sophie Layé<sup>2,3,11</sup> & Olivier J Manzoni<sup>1,2,7–9,11</sup>

The corollaries of the obesity epidemic that plagues developed societies are malnutrition and resulting biochemical imbalances. Low levels of essential n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) have been linked to neuropsychiatric diseases, but the underlying synaptic alterations are mostly unknown. We found that lifelong n-3 PUFAs dietary insufficiency specifically ablates long-term synaptic depression mediated by endocannabinoids in the prelimbic prefrontal cortex and accumbens. In n-3-deficient mice, presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors (CB<sub>1</sub>Rs) normally responding to endocannabinoids were uncoupled from their effector G<sub>i/o</sub> proteins. Finally, the dietary-induced reduction of CB<sub>1</sub>R functions in mood-controlling structures was associated with impaired emotional behavior. These findings identify a plausible synaptic substrate for the behavioral alterations caused by the n-3 PUFAs deficiency that is often observed in western diets.

Human deficiency diseases are the results of a lack of essential nutrients in the diet. In developed countries, inexpensive high-calorie high fat foods are also low in essential nutrients and malnutrition is often a corollary of obesity. In the United States, about 30% of all pregnancies are carried by obese women, but the functional long-term consequences of maternal malnutrition on the brains and behavior of their progeny are mostly unknown.

Lipid molecules are the building blocks of the CNS. In contrast with other tissues, the CNS and retina are enriched in PUFAs: arachidonic acid (20:4n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). These long chain PUFAs are indispensable to the normal development and function of the CNS<sup>1</sup>. Linoleic acid (18:2n-6, the precursor of arachidonic acid) and  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3, the precursor of DHA) are not synthesized *de novo* by mammals and a balanced diet containing appropriate amounts of these precursors is necessary to maintain sufficient brain levels of long chain PUFAs<sup>1,2</sup>. Brain and retina DHA decrease resulting from nutritional deficiency or aging are associated with reduced cognitive ability, increased emotional behavior and decreased vision<sup>3</sup>.

Despite their high-caloric contents, western diets are poor in essential nutrients and notorious for their low levels of n-3 and high levels of n-6 PUFAs<sup>4</sup>. Fetuses and newborns rely exclusively on their mother's diet for their intake of PUFAs. Indeed, major structural fatty acids such as DHA that cannot be efficiently metabolized by developing babies must be received from the mother through the placenta during pregnancy and through breast milk during nursing. Finally, the deleterious consequences of maternal malnutrition on the progeny are further aggravated by a lifetime of nutrient-poor diet.

Given the epidemiological and clinical data linking n-3 PUFAs deficiency and mood disorders<sup>5</sup>, we hypothesized that lifelong malnutrition may influence synaptic functions in brain areas controlling mood. We used a specific diet to mimic lifelong n-3/n-6 imbalance of essential PUFAs in mice and discovered that reducing n-3 levels markedly diminished the synaptic and behavioral functions of the cannabinoid CB<sub>1</sub>R.

## RESULTS

### Effect of n-3 dietary deficiency on brain lipids

To evaluate the consequences of maternal malnutrition on the brains of their offspring, we fed female C57BL/6J mice a diet containing 6% fat in the form of African peanut oil rich in linoleic acid (n-3-deficient diet) or an isocaloric diet composed of African peanut oil and rapeseed oil naturally rich in  $\alpha$ -linolenic acid (n-3 diet) throughout gestation and lactation<sup>6</sup>. After weaning, the offspring received the same diet throughout the rest of their life to model a lifetime of malnutrition.

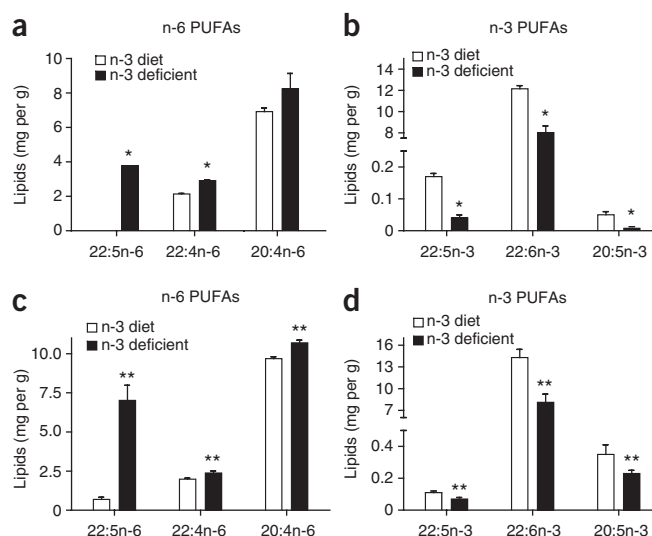
We found that lifelong dietary imbalance in the ratio of n-3/n-6 PUFAs had a major effect on total brain PUFAs levels (Fig. 1a,b). The n-3-deficient diet did not change saturated or mono-unsaturated fatty acids levels (data not shown), but it specifically decreased the brain levels of the major n-3 PUFAs, such as DHA, docosapentaenoic acid (22:5n-3) and eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA), and it increased n-6 PUFAs such as docosapentaenoic acid (22:5n-6; Fig. 1)<sup>6</sup>.

### n-3 deficiency ablates endocannabinoid synaptic plasticity

How could synaptic functions be perturbed by those changes in brain PUFA? Dietary PUFA disproportion modifies the brain lipid

<sup>1</sup>INSERM U862, Physiopathology of Synaptic Plasticity Group, Neurocentre Magendie, Bordeaux Cedex, France. <sup>2</sup>INRA UMR 1286, CNRS UMR 5226, Nutrition and Integrative Neurobiology, Bordeaux Cedex, France. <sup>3</sup>University of Bordeaux, Bordeaux, France. <sup>4</sup>Department of Neuroscience, University of the Basque Country, Bizkaia, Spain. <sup>5</sup>UMR1324 CGSA, INRA, Dijon, France. <sup>6</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, Bizkaia, Spain. <sup>7</sup>INSERM U901, Marseille, France. <sup>8</sup>Université de la Méditerranée UMR S901, France. <sup>9</sup>INMED, Marseille, France. <sup>10</sup>These authors contributed equally to this work. <sup>11</sup>These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to S.L. (sophie.laye@bordeaux.inra.fr) and O.J.M. (olivier.manzoni@inserm.fr).

Received 1 October 2010; accepted 15 December 2010; published online 30 January 2011; doi:10.1038/nn.2736



**Figure 1** n-3/n-6 PUFA dietary imbalance alters PUFAs level in mouse brain. Fatty acids are expressed as percentage of total lipids (mg per 100 g of lipids). (a) The n-3 deficient diet significantly increased brain levels of the n-6 PUFAs 22:5n-6 (docosapentaenoic acid; n-3 diet,  $0.14 \pm 0.03$ ; n-3-deficient diet,  $3.8 \pm 1.25$ ) and 22:4n-6 (tetraenoic acid; n-3 diet,  $2.14 \pm 0.03$ ; n-3-deficient diet,  $2.91 \pm 0.05$ ) compared with the n-3 diet group. The increase of arachidonic acid did not reach statistical significance (n-3 diet,  $6.92 \pm 0.21$ ; n-3-deficient diet,  $8.24 \pm 0.905$ ;  $P = 0.186$ ).  $*P < 0.05$ . (b) n-3 deficiency decreased the brain levels of three crucial n-3 PUFAs (22:5n-3 (docosapentaenoic acid): n-3 diet,  $0.17 \pm 0.01$ ; n-3-deficient diet,  $0.04 \pm 0.1$ ; 22:6n-3 (DHA): n-3 diet,  $12.15 \pm 0.3$ ; n-3-deficient diet,  $8.03 \pm 0.62$ ; 20:5n-3 (EPA): n-3 diet,  $0.05 \pm 0.01$ ; n-3-deficient diet,  $0.01 \pm 0.003$ ). (c,d) Analysis of fatty acids in the PFC ( $n = 6$  in each group). The n-3-deficient diet augmented PFC levels of the n-6 PUFAs 22:5n-6 (n-3 diet,  $0.69 \pm 0.14$ ; n-3-deficient diet,  $7.02 \pm 0.96$ ) and 22:4n-6 (n-3 diet,  $1.98 \pm 0.07$ ; n-3-deficient diet,  $2.38 \pm 0.13$ ) and arachidonic acid (n-3 diet,  $9.68 \pm 0.12$ ; n-3-deficient diet,  $10.69 \pm 0.18$ ) compared with the n-3 diet group (c).  $**P < 0.005$ . Dietary n-3 deficiency reduced n-3 PUFAs levels in the PFC (docosapentaenoic acid: n-3 diet,  $0.11 \pm 0.01$ ; n-3-deficient diet,  $0.07 \pm 0.1$ ; DHA: n-3 diet,  $14.3 \pm 1.13$ ; n-3-deficient diet,  $8.12 \pm 1.13$ ; EPA: n-3 diet,  $0.35 \pm 0.06$ ; n-3-deficient diet,  $0.23 \pm 0.02$ ; d). Error bars represent s.e.m.

biochemistry<sup>1</sup>, affects monoaminergic neurotransmitter and glutamate receptors, and impairs rodents' behavior (reviewed in refs. 1,7). Furthermore, convergent epidemiological and clinical studies have linked deficits in dietary n-3 PUFAs and mood disorders<sup>5</sup>.

The endocannabinoid (eCB) system is in a unique position to link food lipids, synaptic activity and behavior. The two principal eCBs, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), are signaling lipids produced from membrane long-chain fatty acids in response to neuronal activity that bind the G protein-coupled receptor (GPCR) CB<sub>1</sub>R<sup>8</sup>. The eCB system is involved in synaptic plasticity<sup>9</sup> and its deregulation has been postulated to contribute to the etiology of mood disorders<sup>10–12</sup>.

The prefrontal cortex (PFC) is normally implicated in executive tasks and reward and has recently been proposed to be involved in emotional behavior and the pathophysiology of depression<sup>13,14</sup>. We focused our attention on the PFC. After verifying that n-3 deficiency modified PUFAs levels in the PFC (Fig. 1c,d), we evaluated how dietary PUFAs influence eCB-mediated synaptic plasticity in our animal model. In PFC slices prepared from mice that had received an n-3 diet, tetanic stimulation induced a robust eCB-mediated long-term depression (eCB-LTD) of excitatory synapses onto layer V/VI pyramidal neurons in the prelimbic area (PrPFC) (Fig. 2a)<sup>15</sup>. This form of synaptic plasticity, normally mediated by eCB, was totally ablated in mice that were fed the n-3-deficient diet (Fig. 2a,b).

The medial PrPFC sends major excitatory projections to the accumbens, an anatomical substrate for reward and motivation. Notably, eCB-LTD was initially described in the accumbens<sup>16</sup> and synaptic dysfunctions in the accumbens may contribute to the

etiology of mood disorders<sup>13,14</sup>. As in the PrPFC, eCB-LTD was lacking in the accumbens of mice on the n-3-deficient diet (Fig. 2c), indicating that n-3 deficiency may abolish eCB-mediated plasticity in different areas.

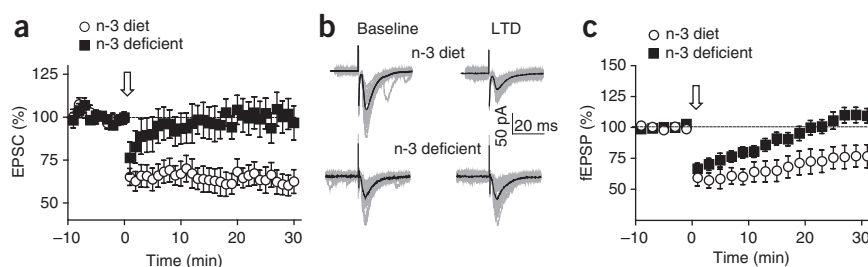
### n-3 deficiency does not perturb other types of synaptic plasticity

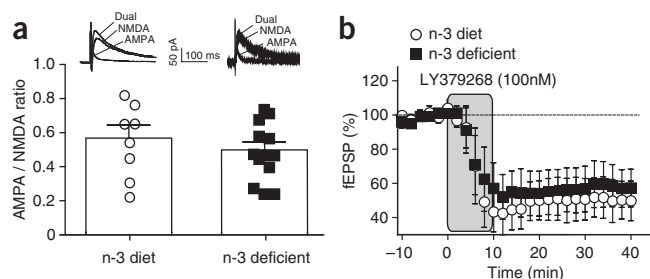
We next asked whether the nutritional-induced impairment of eCB-LTD generalized to other forms of plasticity at PrPFC synapses. Input-output relationships were similar in the two mice groups, ruling out the possibility that the inability of mice on the n-3-deficient diet to trigger eCB-LTD was caused by decreased excitability of glutamatergic PrPFC synapses (Supplementary Fig. 1). The ratio between AMPA receptor (AMPA)-mediated and NMDA receptor (NMDAR)-mediated components of evoked excitatory currents is an indicator of previous long-term synaptic plasticity<sup>17,18</sup>. This index was indistinguishable between the two groups of mice, showing that the conventional long-term potentiation or LTD mechanisms have not been expressed in the PrPFC following n-3 deficiency (Fig. 3a).

To determine whether n-3 deficiency acted on the transduction pathways downstream of presynaptic CB<sub>1</sub>R, we took advantage of the existence of another presynaptic type of LTD that is triggered by mGluR2/3 receptors<sup>19</sup> and is mediated by the same presynaptic transduction pathways<sup>19,20</sup>. The LTD induced by the mGluR<sub>2/3</sub> agonist LY379268 (100 nM) was normal in the n-3-deficient group (Fig. 3b), strongly suggesting that n-3 deficiency had no effect on the signaling cascades downstream of mGluR<sub>2/3</sub> or CB<sub>1</sub>R. Taken together, these data suggest that the deleterious effects of the unbalanced diet

**Figure 2** Endocannabinoid-dependent synaptic plasticity is absent in n-3-deficient mice.

(a) In n-3 diet mice, stimulation of deep-layer PrPFC synapses (arrow, 10 min at 10 Hz) induced normal eCB-mediated LTD (white circles,  $n = 15$ ). In contrast, LTD was completely ablated in n-3-deficient mice (black squares,  $n = 12$ ). (b) Representative current traces showing normal LTD in a voltage-clamped (−70 mV) PrPFC layer V–VI pyramidal neuron from a mouse on the n-3 diet (top) and impaired plasticity in a cell from a mouse on the n-3-deficient diet (bottom). (c) eCB-mediated LTD was abolished in the accumbens of mice on the n-3-deficient diet (black squares,  $n = 5$ ) compared with n-3 diet mice (white circles,  $n = 7$ ). Error bars represent s.e.m.





**Figure 3** Nutritional n-3 deficiency did not alter other forms of synaptic plasticity. (a) n-3 deficiency neither enhanced nor depressed basal synaptic efficacy; the AMPAR/NMDAR ratio was similar in both groups (n-3 diet, white circles,  $n = 8$ ; n-3-deficient, black squares,  $n = 13$ ). (b) Bath application of the mGluR<sub>2/3</sub>-specific agonist LY379268 (100 nM) triggered similar LTD in both groups (n-3 diet, white circles,  $n = 7$ ; n-3-deficient, black squares,  $n = 8$ ). Error bars represent s.e.m.

are not the results of unspecific or generalized alteration of synaptic transmission and plasticity, but instead result from the specific ablation of eCB-mediated synaptic plasticity.

### n-3 deficiency desensitizes and uncouples CB<sub>1</sub>Rs

A number of different mechanisms may explain the observed lack of eCB plasticity in mice on the n-3-deficient diet. Altered PUFA environment may directly impair CB<sub>1</sub>Rs functionality. Previously, we found that the eCB system is exquisitely sensitive to agonist-induced desensitization of CB<sub>1</sub>R *in vivo* and *in vitro*<sup>21,22</sup>. To determine the effects of n-3 deficiency on CB<sub>1</sub>Rs presynaptic functions, we built dose-response curves for the cannabinoid agonist CP55,940 in the two groups. In mice on the n-3 diet, CP55,940 inhibited synaptic transmission similar to what we previously found in mice fed with standard chow<sup>15</sup>. In contrast, there was a massive reduction in the maximum inhibitory effects of CP55,940 in the n-3-deficient group (Fig. 4a). We tested whether this impairment was associated with reduced coupling of CB<sub>1</sub>Rs to their effector G<sub>i/o</sub> proteins using [<sup>35</sup>S]GTPγS autoradiography<sup>23</sup>. Basal [<sup>35</sup>S]GTPγS binding levels in PrPFC were similar between mice on the n-3 diet and those on the n-3-deficient diet (data not shown). However, the ability of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 (WIN) to stimulate [<sup>35</sup>S]GTPγS binding was substantially reduced in PrPFC layers V-VI of mice on the n-3-deficient diet (Fig. 4b and Supplementary Fig. 2).

To determine whether the n-3-deficient diet impairs CB<sub>1</sub>R coupling in different areas, we analyzed WIN-induced stimulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the motor cortex in the same brain sections (Fig. 4b). We detected no difference in the ability of CP55,940 to stimulate [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in motor cortex between mice on the n-3 diet and those on the n-3-deficient diet. Thus, brain region-specific

**Figure 4** Nutritional n-3 deficiency reduces synaptic CB<sub>1</sub>R efficiency and CB<sub>1</sub>R coupling to G<sub>i/o</sub>-proteins. (a) Concentration-response curve for CB<sub>1</sub>R-dependent inhibition of synaptic transmission in PFC slices from n-3 and n-3-deficient mice. There was a marked reduction in the ability of the cannabinoid agonist CP55,940 to inhibit EPSC size in the PrPFC of n-3-deficient mice.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$ . (b) n-3 deficiency uncoupled CB<sub>1</sub>R from G<sub>i/o</sub> proteins in PrPFC layer V-VI. The efficacy of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 (1 μM) to stimulate [<sup>35</sup>S]GTPγS binding was reduced in the n-3-deficient group (n-3 diet,  $n = 5$ ; n-3-deficient,  $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ ). (c) CB<sub>1</sub>R density in prelimbic and motor cortices, measured as the specific binding of CP55,940, was similar in n-3 diet and n-3-deficient mice. (d) n-3 deficiency did not alter CB<sub>1</sub>R protein levels in the PFC compared with the normal n-3 diet. Error bars represent s.e.m.

uncoupling of CB<sub>1</sub>R to G<sub>i/o</sub> proteins may underlie the impairment of CB<sub>1</sub>R function in PrPFC of mice on the n-3 deficient diet. Desensitization of CB<sub>1</sub>Rs at the G<sub>i/o</sub> protein level may ensue from receptor down-regulation<sup>24</sup>. Thus, we analyzed the effects of n-3-deficient diet on CB<sub>1</sub>R expression in the PFC by means of receptor autoradiography and western blot. The density of CB<sub>1</sub>Rs, measured by specific binding of [<sup>3</sup>H]CP55940 in the prelimbic and motor cortices, was similar between mice on the n-3 diet and those on the n-3-deficient diet (Fig. 4c). Consistently, total protein levels of CB<sub>1</sub>R in PFC remained unaffected by the diet ( $0.090 \pm 0.005$ ,  $n = 8$  in the n-3 diet, and  $0.085 \pm 0.009$ ,  $n = 9$  in n-3-deficient diet). Collectively, our data strongly argue against the idea that reduced CB<sub>1</sub>R expression levels underlie the diminished CB<sub>1</sub>R function seen in mice on the n-3-deficient diet (Fig. 4d).

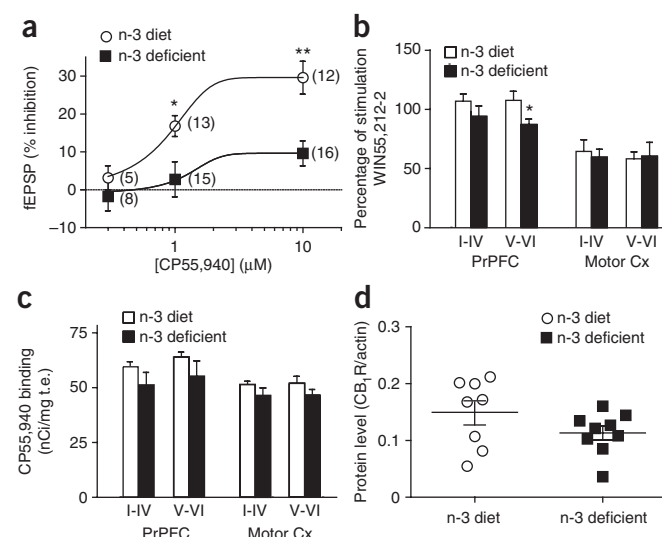
### Effects of n-3 deficiency on circulating and synaptic eCB levels

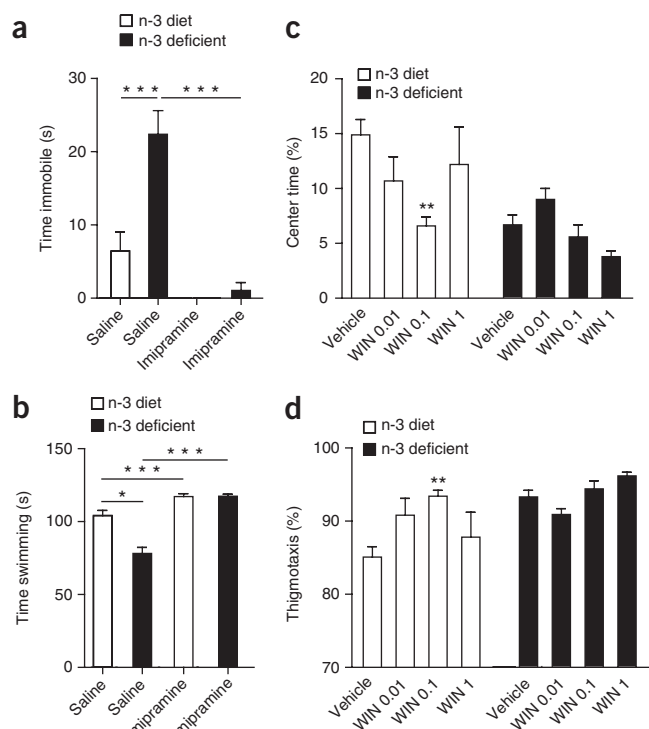
As membrane-bound PUFAs are the precursors of eCB, it is possible that dietary PUFAs elevate circulating eCB levels, which in turn saturate and/or desensitize CB<sub>1</sub>Rs<sup>25</sup>. However, the bulk levels of AEA and 2-AG in the brain were similar in both groups (Supplementary Fig. 3). The apparent discrepancy with previous data showing interactions between diets and circulating eCBs could be a result of homeostatic adaptations restoring normal eCB during a lifetime of n-3 deficiency<sup>26–28</sup>. An alternative explanation is that bulk measurements cannot accurately report the eCB concentration near synapses.

To estimate the synaptic levels of eCB, we compared the effects of the specific CB<sub>1</sub>R antagonist AM251 on baseline excitatory post-synaptic currents (EPSCs) in both groups. Bath application of the selective CB<sub>1</sub>R antagonist AM-251 (4 μM, 30 min) did not increase baseline synaptic transmission in the PrPFC of mice on the n-3 diet (99.31% of control,  $n = 13$ ). In contrast, the same treatment caused a small, but significant, increase in the n-3-deficient group (112.5%,  $n = 11$ ; unpaired  $t$  test,  $P = 0.0358$ ). These data suggest that, in mice on the n-3-deficient diet, the inability to induce eCB plasticity is a result of the partial occupation of CB<sub>1</sub>R by enhanced eCB levels near synapses, combined with CB<sub>1</sub>R desensitization.

### Behavioral correlates of diet-induced CB<sub>1</sub>R functional antagonism

What are the behavioral correlates of the diet-induced CB<sub>1</sub>R functional antagonism and the associated ablation of eCB-mediated synaptic plasticity? The most obvious denominator between n-3 PUFAs, CB<sub>1</sub>R





**Figure 5** Anxiogenic and prodepressant-like effects of dietary n-3 deficiency. (a,b) n-3-deficient mice ( $n = 24$ ) spent more time immobile (a) and less time swimming (b) than n-3 diet mice ( $n = 19$ ). Imipramine (20 mg per kg, intraperitoneal) induced antidepressant-like effects in both groups: decreased immobility time (a) and increased time swimming (b). There was a diet effect on immobility (diet,  $F_{1,42} = 7.03$ ,  $P < 0.05$ ) and swimming time (diet,  $F_{1,41} = 10.027$ ,  $P < 0.01$ ) and a treatment effect on immobility (imipramine,  $F_{1,42} = 18.45$ ,  $P < 0.001$ ) and swimming (imipramine,  $F_{1,41} = 39.094$ ,  $P < 0.001$ ) with an interaction (diet  $\times$  treatment on immobility  $F_{1,42} = 5.37$ ,  $P < 0.05$ ) and on swimming ( $F_{1,41} = 7.65$ ,  $P < 0.01$ ). n-3-deficient mice spent more time immobile ( $P < 0.001$ ) and swam less ( $P < 0.05$ ) than n-3 diet mice in the saline group. Imipramine decreased immobility ( $P < 0.001$ ) and increased swimming ( $P < 0.001$ ) time in the n-3-deficient mice. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (c,d) WIN (0.01, 0.1, 1.0 mg per kg, intraperitoneal) differentially affected time spent in the center and thigmotaxis. There was a significant interaction between the treatment and diet factors ( $F_{3,27} = 3.799$ ,  $P < 0.05$ ) for the time spent in the center and thigmotaxis. WIN (0.1 mg per kg) significantly decreased the time spent in the center ( $P < 0.01$ ) and increased thigmotaxis ( $P < 0.01$ ) in n-3 diet mice, in contrast with the n-3-deficient group (n-3/vehicle,  $n = 3$ ; n-3/WIN 0.01,  $n = 5$ ; n-3/WIN 0.1,  $n = 4$ ; n-3/WIN 1,  $n = 4$ ; n-3-deficient/vehicle,  $n = 4$ ; n-3-deficient/WIN 0.01,  $n = 5$ ; n-3-deficient/0.1,  $n = 5$ ; n-3-deficient/WIN 1,  $n = 5$ ). \*\* $P < 0.005$ . Error bars represent s.e.m.

and PrPFC/accumbens is their involvement in mood disorders and emotional behaviors<sup>5,10,13,14,29</sup>. Indeed, rats subjected to n-3 PUFA deficiency during 15 weeks from weaning<sup>30</sup> display higher depressive-like symptoms in the Porsolt forced swimming test (FST)<sup>31</sup>.

We confirmed these data<sup>31</sup> in n-3-deficient mice. There was an increase in the time spent immobile (Fig. 5a) and a reduction of the swimming time (Fig. 5b) in n-3 deficient diet mice compared to the n-3 diet group. Building on previous findings<sup>30</sup>, we found that the tricyclic antidepressant imipramine reversed immobility in both groups (Fig. 5a,b).

Exploratory behaviors with emotional load (open-field and social exploration) are impaired in mice lacking the CB<sub>1</sub>R<sup>32,33</sup>. We found that n-3 deficiency decreased the number of social exploration (that is, new congener investigation; n-3 diet,  $77.1 \pm 1.3$  per 5 min,  $n = 28$ ; n-3-deficient diet,  $60.2 \pm 1.9$ ,  $n = 16$ ;  $P < 0.001$ ) and increased the number of litter scratching, an index of anxiety (n-3 diet,  $16.9 \pm 1.4$  per 5 min; n-3-deficient diet,  $44.2 \pm 3.7$ ;  $P < 0.001$ ) with no significant effect on locomotion (n-3 diet,  $2,958.3 \pm 61.9$  cm; n-3-deficient diet,  $2,945.8 \pm 73.0$ ;  $n = 16$ ;  $P = 0.999$ ). Furthermore, in the open-field test, n-3-deficient mice spent significant less time in the center on the arena ( $11.0 \pm 0.6\%$  of total time,  $n = 26$ ) than n-3 diet mice ( $8.0 \pm 0.5\%$  of total time,  $n = 16$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, thigmotaxis, the tendency to remain close to the wall, a widely accepted index of anxiety<sup>34</sup>, was significantly higher in mice on the n-3-deficient diet than in mice on the n-3 diet (n-3 diet,  $88.8 \pm 0.6\%$  of total time; n-3-deficient diet,  $91.8 \pm 0.5\%$  of total time;  $P < 0.01$ ). Increased despair behavior was not linked to impaired total motor locomotion (total distance explored: n-3 diet,  $2,814.1 \pm 57.4$  cm; n-3-deficient diet,  $2,757.5 \pm 135.1$  cm).

We then evaluated whether the behavioral effect of a cannabinoid agonist was altered in n-3-deficient mice. We tested the effect of WIN (0.01–1 mg per kg of body weight) on emotional behavior, measured in the open-field test<sup>35</sup>, immediately after the injection (Fig. 5c,d). In n-3 mice, WIN (0.1 mg per kg) reduced the time spent in the center of the arena and increased thigmotaxis. This anxiogenic effect of WIN

(0.1 mg per kg) was ablated in n-3-deficient mice, consistent with our biochemical and synaptic data showing impaired CB<sub>1</sub>R functionality in n-3 deficient mice.

## DISCUSSION

There is a considerable interest in understanding how food participates to health and disease. The obesity epidemic illustrates how food, particularly low-cost food with high sugar and fat contents and low essential nutrients levels, shapes our bodies and determines our general health status.

PUFA precursors of the n-3 or n-6 families are essential nutrients that cannot be generated *de novo* in mammals. They exist in plants as precursors 18:2n-6 (linoleic acid) and 18:3n-3 ( $\alpha$ -linolenic acid) and are metabolized by elongations and desaturations into arachidonic acid, EPA and DHA in mammals<sup>2</sup>. The conversion of these precursors into long-chain PUFAs is mostly hepatic, although other organs such as the brain express the necessary enzymatic equipment<sup>2</sup>. Because the two series of PUFAs compete for their biosynthetic enzymes, and because they have distinct physiological properties, the dietary n-6/n-3 ratio is of fundamental importance.

In contrast to hunting and gathering food products rich in n-3 PUFAs that composed human diet in the past, modern diets are notoriously poor in these nutrients. Most notably, since the dawn of the industrial revolution, the ratio of n-6/n-3 PUFAs in the diet has steadily increased from 1 to almost 15 in industrialized countries, leading to a significant deficiency in n-3 PUFAs<sup>4</sup>. Modern western diets are characterized by high saturated fat and sugar contents associated with low n-3 PUFAs levels. Such dietary customs critically contribute to the high prevalence of chronic diseases such as obesity and metabolic disorders in westernized countries. Obesity is associated with psychological morbidity, including major depression<sup>36</sup>, but the underlying pathophysiological mechanisms remain poorly understood.

Here, we used a specific diet to mimic lifelong n-3/n-6 imbalance of essential PUFAs in mice. We discovered that reducing the n-3 levels markedly reduced the function of the most abundant G protein-coupled receptor of the CNS, the cannabinoid CB<sub>1</sub>R receptor. At the mechanistic level, our data indicate that CB<sub>1</sub>R functional antagonism<sup>25</sup> results from its region-specific uncoupling from effector G<sub>i/o</sub> proteins and its partial occupation by enhanced eCB levels near synapses. This impairment had functional consequences and

was reflected by behavioral modifications: the anxiogenic effect of a cannabinoid agonist, WIN, did not occur in n-3-deficient mice.

Dietary n-3 deficiency modifies CB<sub>1</sub>R functions in a way that is reminiscent of that of classical agonist desensitization<sup>21,22,24</sup>. Although we were not able to detect changes in circulating eCB levels in the brains of the adult mice used in our physiology and behavioral experiments, one cannot exclude the possibility that durable modifications in CB<sub>1</sub>R coupling were caused by transient, but sizeable, elevation of eCB levels at earlier stages. Previous reports of enhanced eCBs levels, particularly 2-AG (the natural full agonist of CB<sub>1</sub>R) in response to short-term diets, as well as on the ability of chronically elevated levels of this eCB to induce functional antagonism of brain CB<sub>1</sub>R via uncoupling from G<sub>i/o</sub> proteins<sup>25</sup>, favor such a scenario<sup>26–28</sup>.

Functionally, an important consequence of CB<sub>1</sub>R desensitization is to abolish eCB-mediated synaptic plasticity in two brain regions that have been implicated in emotional behavior and mood disorders: the PrPFC and the accumbens<sup>13,14</sup>. Our data strongly suggest that the deleterious effect of n-3 deficiency on eCB plasticity does not generalize to other forms of synaptic plasticity, including mGluR2/3-LTD, that share the signaling pathway of CB<sub>1</sub>R-LTD. Furthermore, in contrast with our observations following *in vivo* agonist desensitization of CB<sub>1</sub>R, there is no homeostatic rescue of LTD by autocrine activation of presynaptic mGluR2/3 (ref. 37).

Preclinical data indicate that CB<sub>1</sub>R and the eCB system are important for the control of mood and emotionality<sup>10–12,29</sup>. In many aspects, the emotional disturbances observed in n-3 PUFA-deficient mice resemble the ones measured in CB<sub>1</sub>R null mice: increased thigmotaxis in the open-field test and lower social interactions were measured in CB<sub>1</sub>R null mice as compared with wild-type littermates<sup>38</sup>. Consistent with this, the floating time measured in the FST was higher in CB<sub>1</sub>R null mice<sup>39</sup>. However, it should also be noted that some studies report no significant differences in immobility in the Porsolt FST between CB<sub>1</sub>R knockout and wild-type controls except when mice were exposed several times to the test<sup>38</sup>. Finally, mice lacking CB<sub>1</sub>R in cortical glutamatergic neurons showed decreased immobility in the FST, in contrast with n-3 PUFA-deficient mice, whereas mice lacking CB<sub>1</sub>R in GABAergic neurons display the same immobility time as littermate controls<sup>40</sup>. Fundamental biochemical differences between CB<sub>1</sub>R knockouts and n-3-deficient mice may explain these behavioral discrepancies.

The selling and clinical trials of Rimonabant, a CB<sub>1</sub>R antagonist and anorectic anti-obesity drug was suspended because of the increased risks of serious psychiatric problems, including depression<sup>37</sup>. The fact that we found that n-3 deficiency profoundly affects emotional behaviors in rodents might not come as a surprise. Rather, our findings further support the clinical and epidemiological associations between n-3/n-6 imbalance and mood disorder<sup>5</sup>.

In all cases, to help define whether dietary n-3 PUFA deficiency in rodents are responsible for behaviors underlying depression, further evaluation in a number of additional depression-related animal procedures is required<sup>13</sup>. Thus, whether n-3 PUFA CB<sub>1</sub>R reported here could be targeted with specific dietary supplementation to improve mood disorders remains a subject of debate<sup>41</sup>. In conclusion, by linking diet to altered synaptic functions of CB<sub>1</sub>R in relevant brain areas, our data provide the first synaptic substrate for the impairment of emotional behavior, including depression, associated with the low levels of n-3 PUFAs that are frequently observed in western diets.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank O. Lassalle for helping with illustrations, P. Chavis and M. Darnaudéry for helpful discussions, P. Birac and C. Tridon for taking care of the mice and S. Grégoire for technical help. This work was supported by INSERM (O.J.M.), Institut National de la Recherche Agronomique (S.L.), Région Aquitaine (O.J.M. and S.L.), Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and the Spanish Ministry of Health (FIS 070628, ISCIII, C.M.M., R.R.P. and S.M.).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.L. performed the electrophysiology experiments, conducted the data analyses and contributed to the design of the experiments. T.L. and A.D. performed the behavioral experiments, conducted the data analyses and contributed to the design of the experiments. S.M. performed the cannabinoid biochemical experiments, conducted the data analyses and contributed to the design of the experiments. M.S. participated in the electrophysiology experiments. R.R.-P. and C.M. participated in the cannabinoid biochemical experiments. I.M. performed the endocannabinoid measurements and conducted the data analyses. V.D.S. performed the western blot experiments and conducted the data analyses. V.F.L. participated in the behavioral experiments. L.B. performed the lipid biochemistry experiments and conducted the data analyses. S.L. and O.J.M. equally supervised the project and wrote the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

- Bourre, J.M. Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health Aging* **9**, 31–38 (2005).
- Rapoport, S.I., Rao, J.S. & Igarashi, M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **77**, 251–261 (2007).
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H. & Michaelsen, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* **40**, 1–94 (2001).
- Simopoulos, A.P. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev. Nutr. Diet.* **100**, 1–21 (2009).
- Parker, G. *et al.* Omega-3 fatty acids and mood disorders. *Am. J. Psychiatry* **163**, 969–978 (2006).
- Mingam, R. *et al.* Uncoupling of interleukin-6 from its signaling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1877–1886 (2008).
- Chalon, S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **75**, 259–269 (2006).
- Mackie, K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, S60–S65 (2008).
- Heifets, B.D. & Castillo, P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 283–306 (2009).
- Leweke, F.M. & Koethe, D. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict. Biol.* **13**, 264–275 (2008).
- Lutz, B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 46–52 (2009).
- Hill, M.N. *et al.* The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 484–493 (2009).
- Krishnan, V. & Nestler, E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894–902 (2008).
- Nestler, E.J. & Carlezon, W.A. Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry* **59**, 1151–1159 (2006).
- Lafourcade, M. *et al.* Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* **2**, e709 (2007).
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J. & Manzoni, O.J. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8384–8388 (2002).
- Kauer, J.A. & Malenka, R.C. LTP: AMPA receptors trading places. *Nat. Neurosci.* **9**, 593–594 (2006).
- Hayton, S.J., Lovett-Barron, M., Dumont, E.C. & Olmstead, M.C. Target-specific encoding of response inhibition: increased contribution of AMPA to NMDA receptors at excitatory synapses in the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **30**, 11493–11500 (2010).
- Robbe, D., Alonso, G., Chaumont, S., Bockaert, J. & Manzoni, O.J. Role of p/q-Ca<sup>2+</sup> channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *J. Neurosci.* **22**, 4346–4356 (2002).
- Mato, S., Lafourcade, M., Robbe, D., Bakiri, Y. & Manzoni, O.J. Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* **54**, 87–94 (2008).

21. Mato, S. *et al.* A single *in vivo* exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **7**, 585–586 (2004).
22. Mikasova, L., Groc, L., Choquet, D. & Manzoni, O.J. Altered surface trafficking of presynaptic cannabinoid type 1 receptor in and out synaptic terminals parallels receptor desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 18596–18601 (2008).
23. Mato, S., Robbe, D., Puente, N., Grandes, P. & Manzoni, O.J. Presynaptic homeostatic plasticity rescues long-term depression after chronic Delta 9-tetrahydrocannabinol exposure. *J. Neurosci.* **25**, 11619–11627 (2005).
24. Martin, B.R., Sim-Selley, L.J. & Selley, D.E. Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 325–330 (2004).
25. Schlosburg, J.E., Sim-Selley, L.J., Liu, Q.S., Lichtman, A.H. & Cravatt, B.F. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* **13**, 1113–1119 (2010).
26. Berger, A. *et al.* Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl-ethanolamines in piglets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6402–6406 (2001).
27. Matias, I. *et al.* Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 52–60 (2008).
28. Watanabe, S., Doshi, M. & Hamazaki, T. n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 51–59 (2003).
29. Vinod, K.Y. & Hungund, B.L. Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 539–545 (2006).
30. DeMar, J.C. Jr. *et al.* One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J. Lipid Res.* **47**, 172–180 (2006).
31. Porsolt, R.D., Brossard, G., Hautbois, C. & Roux, S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **14**, 8.10A.1–8.10A.10 (2001).
32. Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Barna, I. & Freund, T.F. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1906–1912 (2004).
33. Urigüen, L., Perez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T. & Manzanares, J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* **46**, 966–973 (2004).
34. Simon, P., Dupuis, R. & Costentin, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.* **61**, 59–64 (1994).
35. Bambico, F.R., Katz, N., Debonnel, G. & Gobbi, G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **27**, 11700–11711 (2007).
36. Evans, D.L. *et al.* Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol. Psychiatry* **58**, 175–189 (2005).
37. Samat, A., Tomlinson, B., Taheri, S. & Thomas, G.N. Rimonabant for the treatment of obesity. *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* **3**, 187–193 (2008).
38. Jacob, W. *et al.* Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav.* **8**, 685–698 (2009).
39. Steiner, M.A. *et al.* Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J.* **8**, 196–208 (2008).
40. Steiner, M.A., Marsicano, G., Wotjak, C.T. & Lutz, B. Conditional cannabinoid receptor type 1 mutants reveal neuron subpopulation-specific effects on behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* **33**, 1165–1170 (2008).
41. Liperoti, R., Landi, F., Fusco, O., Bernabei, R. & Onder, G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 4165–4172 (2009).

## ONLINE METHODS

**Animal treatment and diet.** All animal experiments were performed according to the criteria of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the United States National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

After mating, C57BL/6J females were fed with a diet containing 6% fat in the form of African peanut oil (rich in linoleic acid, 18:2n-6; the n-3-deficient diet) or rapeseed oil (rich in  $\alpha$ -linolenic acid, 18:3n-3; the n-3 diet) throughout gestation and lactation<sup>6</sup>. After weaning, the offspring were subjected to the same diet throughout life. The mice were housed, grouped and had *ad libitum* food and water access. The experiments were performed in 6–16-week-old mice.

**Analysis of fatty acids in brain lipids.** Lipids from total brain and PFC were extracted<sup>42</sup> and fatty acids were transmethyated<sup>43</sup>. Fatty acid methyl esters were analyzed on a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph and a CPSil88-silica capillary column (100 m  $\times$  0.25 mm internal diameter, film thickness = 0.20  $\mu$ m, Varian). The injector and the detector were at 250 °C and 280 °C, respectively. Hydrogen was used as a carrier (inlet pressure = 210 kPa). The oven was fixed at 60 °C for 1 min, increased to 85 °C at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup>, increased to 190 °C at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup> and then left at this temperature for 65 min. Fatty acid methyl esters were identified by comparison with commercial standards.

**Slice preparation and electrophysiology.** Whole-cell patch-clamp and extracellular field recordings were made from pyramidal cells in coronal slices of mouse PrPFC and nucleus accumbens medium spiny neurons<sup>15,21</sup>. Mouse were anesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was sliced (300  $\mu$ m) in the coronal plane (Integraslice, Campden Instruments) and maintained in physiological saline (4 °C). Slices were stored for 30 min at 32–35 °C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11 mM glucose, equilibrated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Slices were stored at 22  $\pm$  2 °C until recording. For recording, slices were superfused (2 ml min<sup>-1</sup>) with ACSF. All experiments were done at 32–35 °C. The ACSF contained picrotoxin (100  $\mu$ M) to block GABA<sub>A</sub> receptors. Drugs were added at the final concentration to the ACSF. To evoke synaptic currents, 100–150- $\mu$ s stimuli were delivered at 0.1 Hz through an ACSF-filled glass electrode placed either in layer II-III or in layer V-VI. There was no difference between the two sites and data were pooled together. EPSC area and amplitude were measured (graphs depict amplitudes). For extracellular field experiments, the recording pipette was filled with ACSF. The field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) area was measured. The glutamatergic nature of the fEPSP was confirmed at the end of the experiments using the ionotropic glutamate receptor antagonist DNQX (20  $\mu$ M), that specifically blocked the synaptic component (data not shown).

Pyramidal neurons in PrPFC layer V-VI and accumbens neurons were visualized using an infrared microscope. Whole-cell patch-clamp experiments were made with electrodes containing 128 mM cesium methane-sulfonate (CH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SCs) or potassium gluconate, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sup>2+</sup>-ATP, 0.3 mM Na<sup>+</sup>-GTP, 10 mM glucose buffered with 10 mM HEPES, pH 7.3, osmolarity 290 mOsm. Electrode resistance was 4–6 MOhm. If access resistance (no compensation, <25 MOhm) changed by > 20%, the experiment was rejected. The potential reference of the amplifier was adjusted to zero before breaking into the cell. Data were recorded on an Axopatch-1D, filtered at 1–2 kHz, digitized (5 kHz, DigiData 1200), collected using Clampex 9.2 and analyzed using Clampfit 9.2 (all from Molecular Device, Sunnyvale, USA).

The ratio of AMPAR-mediated to NMDAR-mediated EPSC amplitude was measured from EPSC at +40 mV<sup>44</sup>. The AMPAR component of the EPSC was isolated with the NMDAR antagonist DL-AP5 (100  $\mu$ M). The NMDAR-mediated EPSC was obtained by digital subtraction of the AMPAR EPSC from the dual component EPSC.

**Autoradiographic studies.** Mice were decapitated and the brains were rapidly removed and stored at –80 °C. Coronal brain sections (20  $\mu$ m thick) containing prelimbic and motor cortices were cut using a microtome cryostat, thaw-mounted in gelatinised slides and stored at –20 °C.

For CB<sub>1</sub>R autoradiography, slides were preincubated (30 min, 22  $\pm$  2 °C) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 5% bovine serum albumin (BSA, vol/vol), pH 7.4, and incubated (2 h, 37 °C, same buffer) with 3 nM [<sup>3</sup>H]CP55,940 (specific

activity, 174.6 Ci mmol<sup>-1</sup>). Nonspecific binding was determined in adjacent sections by co-incubation with 10  $\mu$ M WIN55,212-2. Unbound radioligand was removed by washing twice (2 h each, 4 °C) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl and 1% BSA, pH 7.4. After drying, autoradiograms were generated by apposing the tissues for 21 d at 4 °C to <sup>3</sup>H-sensitive films (Kodak BioMax MR, Sigma).

For CB<sub>1</sub>R agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S autoradiography, sections were pre-incubated (30 min, room temperature) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DL-dithiothreitol and 2 mM GDP, pH 7.7, to eliminate endogenous ligands. Sections were incubated for 120 min in the same buffer containing 0.5% BSA, 3 mU ml<sup>-1</sup> adenosine deaminase and 0.04 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. Consecutive sections were incubated with 1  $\mu$ M of the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. Nonspecific binding was determined in the presence of 10  $\mu$ M guanosine-5'-O-(3-thio) triphosphate (GTP $\gamma$ S). Sections were then washed twice (15 min) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 4 °C, rinsed, dried and exposed to <sup>14</sup>C-sensitive films (Kodak BioMax MR, Sigma) with <sup>14</sup>C-polymer standards (Amersham, 2 d, 4 °C).

**Western blot.** PFC was homogenized in lysis buffer and protein concentration was determined using a BCA assay kit (Uptima). Equal amount of proteins (60  $\mu$ g) were loaded onto SDS-PAGE gels (10%) and transferred onto PVDF membranes (Millipore). Membranes were incubated overnight (4 °C) with antibodies to CB<sub>1</sub>R (1:1,000, kindly provided by K. Mackie, University of Bloomington) or actin antibodies (1:2,500, Sigma). After washing, membranes were incubated 1 h with peroxidase-conjugated secondary antibody to rabbit (1:5,000, Jackson ImmunoResearch). Between each revelation, membranes were incubated (10 min, 70 °C) in stripping buffer (0.065 M Tris, 1%, SDS (vol/vol), 0.7%  $\beta$ -mercaptoethanol (vol/vol), pH 6.7) to remove the previous antibody. Staining was revealed with ECL-Plus western blotting system (Perkin Elmer). Chemiluminescence was captured and quantified by Gene Tools (Syngene).

**Purification and quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol.** These experiments were performed as described previously<sup>45–47</sup>. Tissues were homogenized and extracted with chloroform/methanol/Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (2:1:1, vol/vol) containing internal deuterated standards (AEA-d<sub>4</sub> and 2-AG-d<sub>5</sub>). The dried lipid extract was pre-purified by open-bed chromatography on silica columns eluted with increasing concentrations of methanol in chloroform. Fractions for AEA and 2-AG measurement were obtained by eluting the column with 9:1 (by vol.) chloroform/methanol and were concentrated on an N2 stream evaporator. Samples were subjected to isotope-dilution liquid chromatography-chemical ionization-tandem mass spectrometric analysis. Tandem mass spectrometry, in the form of LC-MS-MS, has been used to identify AEA and 2-AG in the picomol/gram range in both human and rat brain regions<sup>48,49</sup>. Mass spectral analyses were performed on a TSQ Quantum triple quadrupole instrument (Thermo-Finnigan) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization source and operating in positive ion mode. The Quantum triple quadrupole instrument was used in conjunction with a Surveyor LC Pump Plus (Supelco C18 Discovery Analytical column equipped with a Phenomenex Analytical Guard Cartridge System) and cooled autosampler. The amounts of AEA and 2-AG are expressed as pmol or fmol per mg of weight tissue.

**Behavioral tests.** Mice were regularly handled and weighed before and during behavioral experiments. All tests were conducted in a sound-attenuated separate experimental room, during the last 4 h of the light period to avoid low spontaneous activity. Behavioral sessions were video recorded and analyzed using The Observer (Noldus).

For the Porsolt FST<sup>31</sup>, mice were individually placed into a dark gray polyvinylchloride cylinder (15 cm in diameter, 30 cm high) half-filled with water (25  $\pm$  1 °C), so that it would neither reach the base nor the edge of the cylinder. The water was changed between subjects. Time spent immobile during the 2 min of the test was used as an index of despair-like behavior. Climbing and swimming were also measured. A mouse was considered to be immobile when it made only minimal movements to keep its head above water. Imipramine (Sigma) was dissolved in saline (0.9% NaCl (vol/vol), 20 mg per kg) and administered intraperitoneal in 0.1 ml per 10 g of mouse 30 min prior to experiment.

For the open field test, the apparatus consisted of a white Plexiglas-covered sawdust bedding (40  $\times$  40 cm) with 16-cm-high walls. The floor was divided into 16 green lines squares (10  $\times$  10 cm). Each mouse was placed facing a corner and

allowed to explore freely for 10 min. A video tracking system (SMART, Panlab) recorded the exact track of each mouse as well distance (cm), time spent in the inner region (central squares) and the outer region (12 squares along the perimeter of the floor), the number of outer and inner crossing and the total distance traveled. At the end of the trial, mice were returned to their home cages and test boxes were cleaned. The percentage of time spent in the center and the time spent along the walls normalized to the total time spent in the apparatus (thigmotaxis) and total distance (in cm) were measured. All tests were conducted during the light period of the light-dark cycle.

For social investigation, group-housed experimental subjects (four per cage) were separated and transferred to a new cage (40 × 40 cm) with fresh bedding material before the experiment. A social exploration session comprised 5-min exposure of an adult conspecific of the same age and same sex enclosed in a wire mesh cage placed in the corner of the cage<sup>50</sup>. Active investigatory behavior (mainly sniffing the anogenital region, mouth, ears, trunk and tail of the adult), anxiety behavior (scrapping bedding) and locomotor activity (distance in cm) were recorded.

**Statistics.** All values are given as mean ± s.e.m. Results obtained in the FST test and the open field with WIN were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA, diet × treatment) followed by the appropriate *post hoc* test (Bonferroni). Nonpaired Student's *t* test was used to analyze results obtained in the social investigation and open-field tests. For electrophysiological experiments, *n* corresponds to the number of individual cells per slices analyzed, with at least five animals included in each condition. Statistical significance between groups was tested using one-way ANOVA or the Mann-Whitney test. In [<sup>35</sup>S]GTPγS autoradiographic experiments, the effect of the cannabinoid agonist was expressed as percentage of stimulation over basal activity ((% = agonist

binding × 100)/basal binding). For autoradiographic data, serial coronal sections were bilaterally examined between levels 2.4 and 2.0 according to a mouse brain atlas. Densitometry measurements of external (I-IV) and internal (V-VI) layers in prelimbic and motor cortices was carried out using ImageJ (US National Institutes of Health). Statistical comparison of experimental groups was made using a nonpaired Student's *t* test, where *n* corresponds to the number of animals analyzed. All statistical tests were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software) using a critical probability of *P* < 0.05.

42. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
43. Morrison, W.R. & Smith, L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600–608 (1964).
44. Kasanetz, F. & Manzoni, O.J. Maturation of excitatory synaptic transmission of the rat nucleus accumbens from juvenile to adult. *J. Neurophysiol.* **101**, 2516–2527 (2009).
45. Di Marzo, V. *et al.* Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**, 822–825 (2001).
46. De Marchi, N. *et al.* Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis.* **2**, 5 (2003).
47. Matias, I. *et al.* Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3171–3180 (2006).
48. Richardson, D., Ortori, C.A., Chapman, V., Kendall, D.A. & Barrett, D.A. Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **360**, 216–226 (2007).
49. Kingsley, P.J. & Marnett, L.J. LC-MS-MS analysis of neutral eicosanoids. *Methods Enzymol.* **433**, 91–112 (2007).
50. Berton, O. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* **311**, 864–868 (2006).

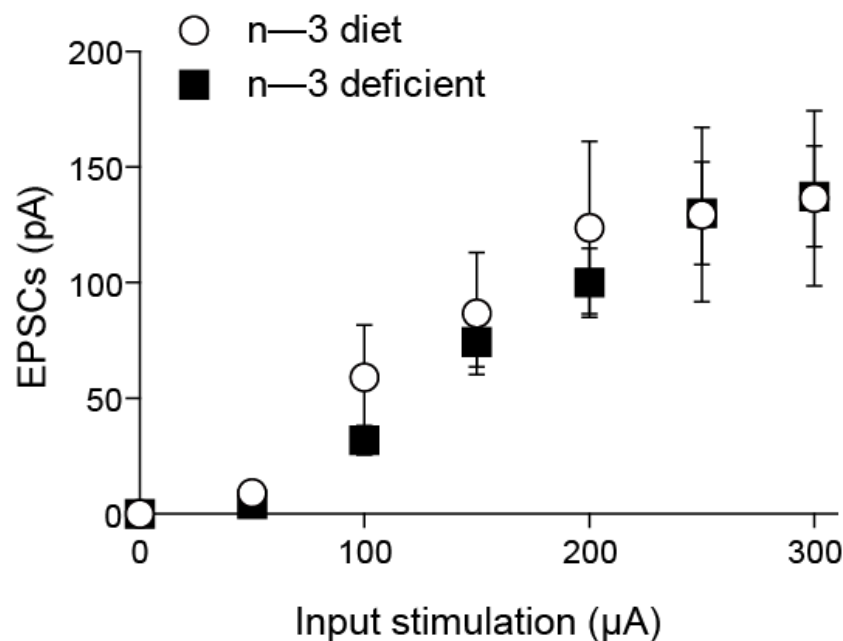
## Supplementary Information

Nutritional Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions

Mathieu Lafourcade<sup>1,3#</sup>, Thomas Larrieu<sup>2,3#</sup>, Susana Mato<sup>4#</sup>, Anais Duffaud<sup>2,3</sup>, Marja Sepers<sup>1,3</sup>, Isabelle Matias<sup>1,3</sup>, Veronique De Smedt<sup>2,3</sup>, Virginie Labrousse<sup>2,3</sup>, Lionel Bretilon<sup>6</sup>, Carlos Matute<sup>4</sup>, Rafael Rodríguez-Puertas<sup>5</sup>, Sophie Layé<sup>2,3,¶,°</sup> and Olivier J. Manzoni<sup>1,3,¶,°</sup>

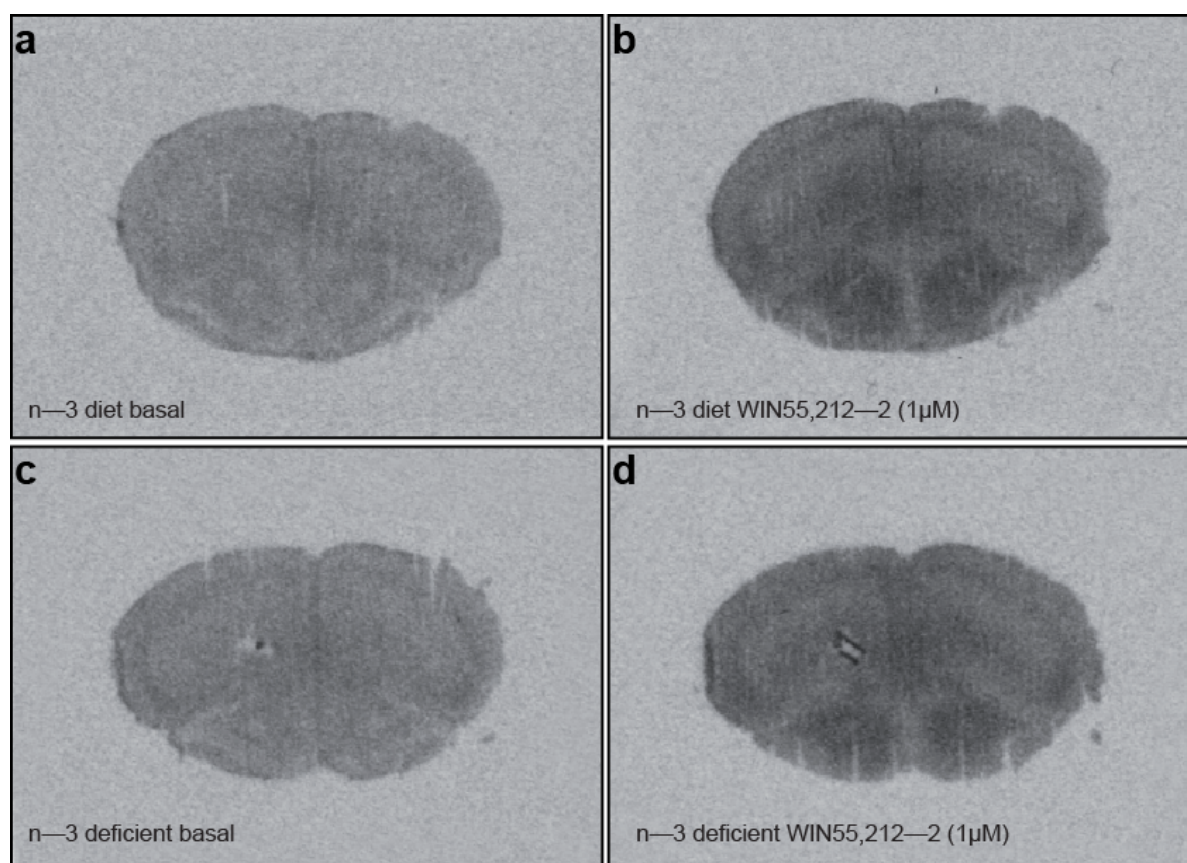
# Nutritional Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions

Mathieu Lafourcade<sup>1,3#</sup>, Thomas Larrieu<sup>2,3#</sup>, Susana Mato<sup>4#</sup>, Anais Duffaud<sup>2,3</sup>, Marja Sepers<sup>1,3</sup>, Isabelle Matias<sup>1,3</sup>, Veronique De Smedt<sup>2,3</sup>, Virginie Labrousse<sup>2,3</sup>, Lionel Bretillon<sup>6</sup>, Carlos Matute<sup>4</sup>, Rafael Rodríguez-Puertas<sup>5</sup>, Sophie Layé<sup>2,3,¶,°</sup> and Olivier J. Manzoni<sup>1,3,¶,°</sup>



## Supplementary Figure 1:

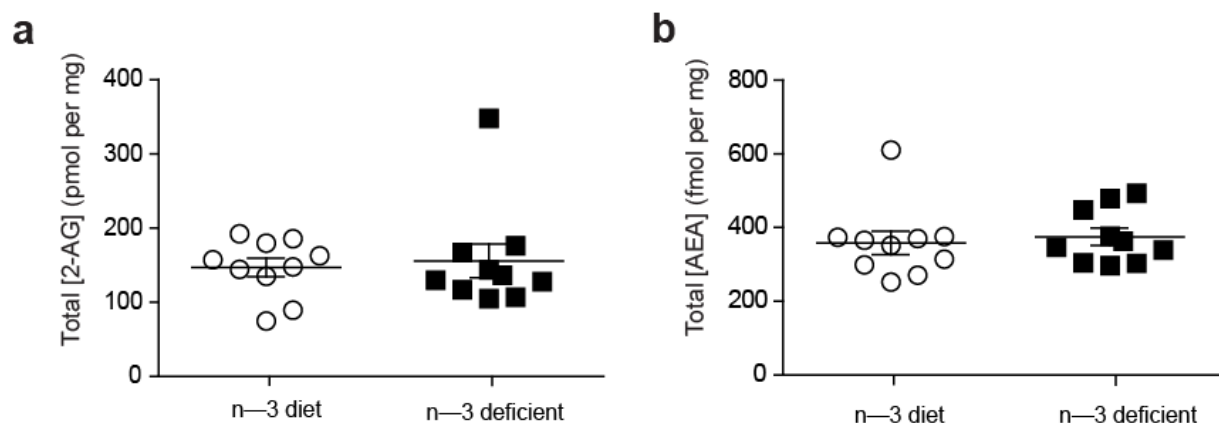
**Dietary n—3 deficiency does not change the input/output relationship at PrPFC synapses.** Input/output relationship measured in voltage-clamped pyramidal PrPFC neurons at — 70 mV. Both groups (n—3 diet: n = 15; n-3 deficient: n = 14) exhibited similar excitatory synaptic responses for stimulations ranging from 50 to 300 μA.



### Supplementary Figure 2:

#### Reduced CB1R—mediated stimulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the PrPFC of n-3 deficient mice.

Representative autoradiograms showing the effect of n—3 deficient diet on the ability of CB1R to stimulate [<sup>35</sup>S]GTPγS binding at the level of PrPFC. Basal [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in PrPFC sections from n—3 (A) and n-3 deficient mice (C). Stimulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding with WIN55,212-2 (1μM) in both mice groups (B and D respectively). Note the reduction in WIN55,212-2-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the PrPFC (layer V—VI) of the n-3 deficient mouse relative to the n—3 diet mouse.



### Supplementary Figure 3:

#### Nutritional n-3 deficiency does not change eCB levels.

Total eCB levels were measured with LC—MS-MS. (A) Total 2—AG levels were identical in the n—3 diet and n—3 deficient groups ( $147 \pm 11.7$  pmol/mg,  $n = 10$  and  $155.92 \pm 21.45$  pmol/mg,  $n = 10$ , respectively). (B) Total AEA levels were identical in the n—3 diet and n—3 deficient groups ( $358.3 \pm 29.7$  fmol/mg,  $n = 10$  and  $374.9 \pm 22$  fmol/mg,  $n = 10$ , respectively).

## 2. ETUDE DE L'OBJECTIF 2 (ARTICLE 2)

### **Une carence nutritionnelle en AGPI n-3 induit l'altération des voies de signalisation cérébrales des récepteurs cannabinoïdes associée au développement de comportements de type anxieux chez la souris.**

Nous avons récemment mis en évidence le rôle des AGPI n-3 dans la plasticité synaptique dépendante du système eCB (Lafourcade et al., 2011). En effet, cette étude a révélé une altération drastique de la LTD eCB-dépendante dans le CPF et le NAC. En plus de cette altération, la réduction de DHA dans le CPF est associée à une désensibilisation du CB1R reflétée par un découplage du récepteur CB1 et de sa protéine Gi/o. Il est connu que la stimulation du système eCB mène à l'activation/inhibition de voies de signalisation telles que la voie des MAPKs. Puisque les AGPI-LC sont les précurseurs de la synthèse des 2 ligands endogènes des récepteurs endocannabinoïdes, la déficience en AGPI n-3 pourrait altérer le système eCB et les voies de signalisation qui lui sont associées. Dans ce travail, nous avons examiné le rôle potentiel des AGPI n-3 sur les comportements dépressifs et anxieux ainsi que sur les cascades de signalisation cellulaire en aval de l'activation du système eCB par un agoniste cannabinoïdes WIN55,212-2. De plus, les analyses d'expression protéiques mesurées par western blot révèlent que 15 minutes après l'administration de l'agoniste, la phosphorylation de ERK1/2 dans l'HC et le CPF est réduite chez les souris témoins alors que la phosphorylation de ERK1/2 n'est pas modifiée chez les souris déficientes en AGPI n-3. De la même manière, la diminution de l'expression du facteur de transcription EGR1 (de l'anglais « Early growth response protein 1 ») dans le CPF des souris nourries avec un régime équilibré en AGPI n-3 n'est pas observée chez les souris soumises au régime carencé en AGPI n-3. L'exposition prolongée à un régime pauvre en AGPI n-3 perturbe l'effet du WIN55,212-2 sur les voies de signalisation CB dépendantes. Ce travail a été publié dans un volume spécial à la suite de notre participation au « 8th Mininetwork CTP meeting » sous le titre « Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice » par T. Larrieu, C. Madore, C. Joffre et S. Layé, *Journal of physiology and biochemistry*, 2012, DOI: 10.1007/s13105-012-0179-6. T. Larrieu et C. Madore partagent le statut de premier auteur. Mes contributions dans ce travail ont été de concevoir et de réaliser la majorité des expériences biochimiques et comportementales ainsi que l'analyse et l'interprétation des données et l'écriture du manuscrit. Une copie de cet article publié constitue le présent chapitre de mon travail de thèse.

*Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice*

**Thomas Larrieu, Charlotte Madore,  
Corinne Joffre & Sophie Layé**

**Journal of Physiology and  
Biochemistry**

Official Journal of the University of  
Navarra, Spain

ISSN 1138-7548

J Physiol Biochem

DOI 10.1007/s13105-012-0179-6



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by University of Navarra. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.**

# Nutritional *n*-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice

Thomas Larrieu · Charlotte Madore ·  
Corinne Joffre · Sophie Layé

Received: 31 January 2012 / Accepted: 16 May 2012  
© University of Navarra 2012

**Abstract** *N*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) cannot be synthesized de novo in mammals and need to be provided by dietary means. In the brain, the main *n*-3 PUFA is docosahexaenoic acid (DHA), which is a key component of neuronal membranes. A low dietary level of DHA has been associated with increased risk of developing neuropsychiatric diseases; however, the mechanisms involved remain to be determined. In this study, we found that long-term exposure to an *n*-3 deficient diet decreases the level of DHA in the brain and impairs the cannabinoid receptor signaling pathway in mood-controlling structures. In *n*-3 deficient mice, the effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 in an anxiety-like behavior test was abolished. In addition, the cannabinoid receptor signaling pathways were altered in the prefrontal cortex and the hypothalamus. Consequently, our data suggest that behavioral changes linked to an *n*-3 dietary deficiency are due to an

alteration in the endocannabinoid system in specific brain areas.

**Keywords** CB1 · DHA · Anxiety · MAPK · Endocannabinoid

## Introduction

*N*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are key components of brain membranes. They have to be provided as precursors—alpha-linolenic acid (ALA; 18:3 *n*-3) for *n*-3 PUFAs and linoleic acid (LA; 18:2 *n*-6) for *n*-6 PUFAs—through diet as they cannot be synthesized de novo by mammals [30]. LA and ALA are metabolized into long chain PUFAs, arachidonic acid (AA; 20:4 *n*-6), and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 *n*-3), respectively, which are necessary for normal brain development and functions [27]. In Western diets, an imbalance in *n*-6/*n*-3 PUFAs ratio results in *n*-3 PUFAs substitution by saturated fats and *n*-6 PUFAs. Nowadays, the estimated ratio of *n*-6/*n*-3 PUFAs in a typical Western diet is around 20/1, in marked contrast with the optimal 1/4 ratio [29]. This imbalance has been involved in the increased prevalence of mental illnesses including mood disorders and depression. In fact, some epidemiological studies have shown that the risk of developing depression has been associated with low dietary *n*-3 PUFAs content [12, 19].

Numerous studies have shown that in animal models of nutritional *n*-3 PUFAs deprivation, brain DHA levels

Thomas Larrieu and Charlotte Madore equally contributed to this work.

T. Larrieu · C. Madore · C. Joffre · S. Layé (✉)  
Nutrition et Neurobiologie Intégrée, INRA UMR 1286,  
Bâtiment UFR Pharmacie 2<sup>e</sup> tranche, 2<sup>e</sup> étage,  
Case courrier 34, Université Victor Ségalen,  
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France  
e-mail: sophie.laye@bordeaux.inra.fr

T. Larrieu · C. Madore · C. Joffre · S. Layé  
University of Bordeaux,  
Bordeaux 33077, France

were decreased [5, 16, 23]. As a result, brain DHA decrease leads to anxiety and depressive-like behaviors [8, 10, 16, 23]. For example, rats subjected to nutritional *n*-3 PUFAs deficiency for 15 weeks after weaning display an increase in depressive-like symptoms in the forced swimming test as well as a decrease in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is involved in the pathophysiology of mood disorders [21, 25].

Recently, we have shown a drastic alteration of endocannabinoid (eCB)-dependent synaptic plasticity in the prefrontal cortex (PFC) of mice fed with *n*-3 PUFAs deficient diet throughout life, further confirming that *n*-3 PUFAs deficiency impairs synaptic plasticity [16]. In particular, the decrease of DHA contents in the PFC was associated with decreased function of the synaptic cannabinoid receptor 1 (CB1) [16]. In addition, dietary *n*-3 PUFAs deficient mice were insensitive to the behavioral effect of a cannabinoid agonist. The two principal ligands of the eCB system, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, are bioactive lipids produced from membrane AA in response to neuronal activity. They are known to bind G protein-coupled receptors CB1 and CB2 leading to activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade [3, 32]. The deregulation of the eCB system contributes to the development of depressive and anxiety-like symptoms. Indeed, in rodents, pharmacological and genetic disruptions of the eCB system have been shown to promote anxiety-like behaviors [14, 26]. The eCB system is therefore in a unique position to link dietary lipids, synaptic activity, and emotional behavior.

Given that long-term nutritional *n*-3 PUFAs deficiency alters the eCB system in the brain, we hypothesized that lifelong *n*-3 PUFAs deficiency may influence cerebral areas controlling mood through altering the activation of the CB signaling pathway. We therefore investigated the effect of treatment with an exogenous CB agonist (WIN55,212-2) on anxiety-like behavior and MAPK activation in the brains of mice fed throughout life on a diet with an imbalance of *n*-6/*n*-3 PUFAs ratio.

## Materials and methods

### Animals

Studies were carried out according to the Quality Reference System of INRA (<http://www.international.inra.fr/content/>

[download/947/11111/file/requirements](#)) and approved by the local ethical committee for care and use of animals (AP 2/3/2004). The mice were housed, grouped four or five per cage and maintained in a temperature- and humidity-controlled facility on a 12-h light/dark cycle with food and water ad libitum. The mice were 110 days old when behavioral and biochemical analyses were conducted.

### Diet

After mating, C57BL6/J females were fed a diet containing 6 % fat in the form of sunflower oil (rich in linoleic acid, 18:2 *n*-6, the *n*-3 deficient diet) or rapeseed oil (rich in  $\alpha$ -linolenic acid, 18:3 *n*-3; the *n*-3 diet) throughout gestation and lactation [16, 20, 22]. After weaning, female offsprings were subjected to the same diet throughout life.

### Social investigation

Mice were separated and transferred to new cages (40×40 cm). A social exploration session consisted of a 5-min exposure to an unfamiliar adult female C57BL6/J enclosed in a wire mesh placed in the corner of the cage. Active investigatory behavior (e.g., sniffing the anogenital region, mouth, ears, trunk, and tail of the adult) was counted [16].

### Forced swimming test

Mice were individually placed into a dark gray polyvinylchloride cylinder (15 cm in diameter, 30 cm high) half-filled with water (25±1 °C), so that it would not reach the base or the edge of the cylinder. Water was changed between each test. The amount of immobility during the 6-min test was used as an index of despair-like behavior. A mouse was considered to be immobile when minimal movements were performed to keep its head above water. Imipramine (Sigma) was dissolved in a saline solution (0.9 % NaCl (v/v), 20 mg per kg) and administered intraperitoneally (0.2 mL per 30 g of mouse) 30 min prior to the experiment [22].

### Open field test

An open field test was performed according to previously published methods [16]. Briefly, the animal was allowed to explore the apparatus freely for 10 min (40×

40 cm). A video tracking system (Smart, Panlab) recorded the exact path of each mouse as well as the total distance traveled (in centimeter), time spent in the inner region (in percent) and the outer region (thigmotaxis) (in percent) of the arena. All tests were conducted during the light phase of the light/dark cycle. WIN55,212-2 (Sigma) was dissolved in Tween-80 (Sigma) and a saline solution (0.9 % NaCl (v/v), in a ratio of 0.1 mg per kg) and administered intraperitoneally as 0.2 mL per 30 g of body weight. The experiment began immediately after drug administration.

### Analysis of fatty acids in brain lipids

Lipids from the cortex were extracted according to the method of Folch [11] and fatty acids were transmethy-lated according to the method of Morrison and Smith [24]. Fatty acid methyl esters (FAMES) were analyzed on a FOCUS GC gas chromatograph (Thermo Electron Corporation) equipped with a split injector and a flame ionization detector. Separation of FAMES was performed with a BPX70-fused silica capillary column (60 m length×0.22 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness; SGE, Courtaboeuf, France). The hydrogen inlet pressure was 100 kPa. The injector and detector temperatures were at 250 and 280 °C, respectively. The oven was at 150 °C, increased to 190 °C at a rate of 1.5 °C min<sup>-1</sup> with a 27-min hold, and increased to 230 °C at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup> and then left at this temperature for 25 min. FAMES were identified by making a comparison with commercial standards.

### Western blot

Brain structures (prefrontal cortex, hippocampus, and hypothalamus) were homogenized in lysis buffer Tris/HCl 20 mM pH 7.4, protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM NaOV, and 1 mM NaF. Protein concentrations were determined using MicroBC Assay: Protein Quantitation kit (Interchim). Equal amount of proteins (20 µg) were loaded and separated on SDS-polyacrylamide gels (10 %) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were saturated with a blocking solution containing 5 % nonfat dried milk and 0.05 % Tween-20. Protein blots were incubated overnight at 4 °C in BSA with the following primary antibodies: anti-Egr1 (1/1,000; Cell Signaling), anti-Arc (1/500; Synaptic

Systems), anti-BDNF (1/5,000; Abcam), anti-phospho-p44/p42 MAPK (1/500; Cell Signaling), anti-p44/p42 MAPK (1/1,000; Cell Signaling), and anti-actin (1/2,500; Sigma-Aldrich). After washing, membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000; Jackson ImmunoResearch). Staining was revealed using the ECL-Plus Western blotting detection system (Perkin Elmer). Chemiluminescence was captured by a Syngene detection system and quantified by Gene Tools software (Syngene). Between each revelation, membranes were incubated for 10 min in Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) in order to erase the previous antibody. Results are presented as the ratio of the protein or phosphoprotein levels to actin and are expressed as a percentage of the controls.

### Statistical analyses

All values are given as mean ± SEM. Results obtained in the social investigation task and the Western blot studies were analyzed using unpaired two-tailed *t* tests. Results obtained in the forced swimming test and the behavioral effect of WIN55,212-2 in the open field test were all analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), with diet and treatment as fixed factors. The analyses were followed by the Bonferroni post hoc test. All statistical tests were performed with GraphPad Prism (GraphPad software) using a critical probability of *p*<0.05.

## Results

### Effect of nutritional *n*-3 deficiency on brain fatty acids

In order to evaluate the consequences of the *n*-3 deficient diet on the brain, we first measured the levels of diverse fatty acids in the cortex by using gas chromatography (Table 1). The *n*-3 deficient diet significantly decreased DHA from 16.4 to 9.1 % (*t*<sub>9</sub>=9.647, *p*<0.001), increased DPA from 0.7 to 7.6 % (*t*<sub>9</sub>=3.330, *p*<0.001), and increased AA from 8.8 to 9.5 % (*t*<sub>9</sub>=3.414, *p*<0.001) as compared to the *n*-3 diet. Hence, the ratio of long *n*-6 PUFAs chains (22:4 *n*-6 and 22:5 *n*-6) versus long *n*-3 PUFAs chains (22:5 *n*-3 and 22:6 *n*-3) was significantly increased in the *n*-3 deficient mice as compared to the *n*-3 diet mice (*t*<sub>9</sub>=6.570, *p*<0.001).

**Table 1** Fatty acids composition in the total cortex of *n-3* diet and *n-3* deficient mice

| Fatty acids                  | <i>n-3</i> Diet |      | <i>n-3</i> Deficient |        |
|------------------------------|-----------------|------|----------------------|--------|
| 14:0                         | 0.13            | 0.01 | 0.14                 | 0.01   |
| 15:0                         | 0.03            | 0.01 | 0.04                 | 0.01   |
| 16:0                         | 21.07           | 0.62 | 21.71                | 1.19   |
| 17:0                         | 0.12            | 0.01 | 0.13                 | 0.02   |
| 18:0                         | 20.56           | 0.48 | 20.42                | 0.20   |
| 20:0                         | 0.26            | 0.03 | 0.24                 | 0.04   |
| 22:0                         | 0.29            | 0.06 | 0.28                 | 0.08   |
| 24:0                         | 0.36            | 0.06 | 0.41                 | 0.10   |
| 17:1                         | 0.02            | 0.00 | 0.02                 | 0.01   |
| 18:1                         | 0.04            | 0.01 | 0.05                 | 0.01   |
| 18:2 <i>n-6</i>              | 0.22            | 0.02 | 0.25                 | 0.02*  |
| 18:3 <i>n-6</i>              | 0.02            | 0.00 | 0.02                 | 0.00   |
| 20:2 <i>n-6</i>              | 0.04            | 0.02 | 0.05                 | 0.01   |
| 20:3 <i>n-6</i>              | 0.29            | 0.04 | 0.17                 | 0.02   |
| 20:4 <i>n-6</i>              | 8.77            | 0.22 | 9.48                 | 0.42*  |
| 22:4 <i>n-6</i>              | 2.11            | 0.11 | 2.50                 | 0.19   |
| 22:5 <i>n-6</i>              | 0.67            | 0.20 | 7.59                 | 1.33** |
| 20:5 <i>n-3</i>              | 0.08            | 0.01 | 0.08                 | 0.02   |
| 22:5 <i>n-3</i>              | 0.1             | 0.06 | 0.09                 | 0.02   |
| 22:6 <i>n-3</i>              | 16.39           | 0.69 | 9.11                 | 1.56** |
| LC <i>n-6</i>                | 2.78            | 0.26 | 10.09                | 1.26   |
| LC <i>n-3</i>                | 16.49           | 0.73 | 9.19                 | 1.54   |
| LC <i>n-6</i> /LC <i>n-3</i> | 0.17            | 0.01 | 1.14                 | 0.33** |
| AA/DHA                       | 0.54            | 0.03 | 1.07                 | 0.22** |

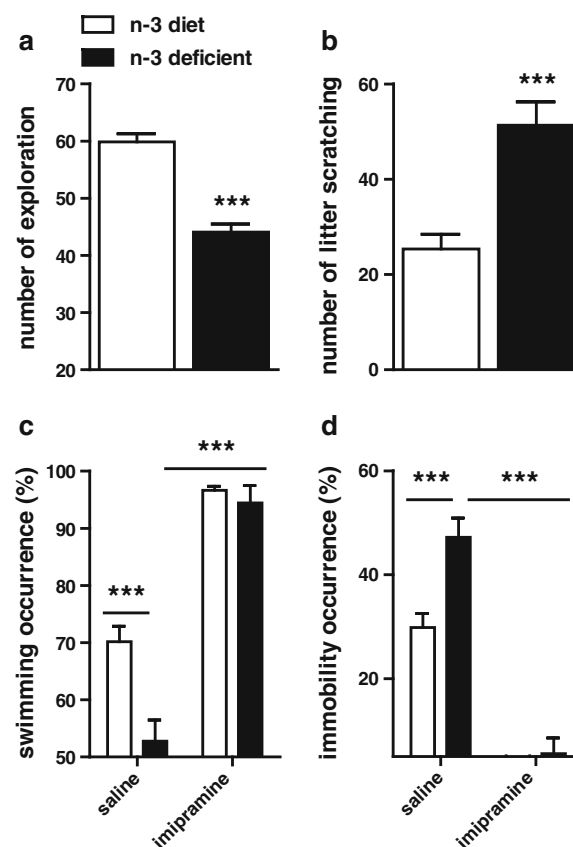
Fatty acids are expressed as the percentage of total lipids (in milligrams per 100 g of lipids) ( $\pm$ SEM). The *n-3* deficient mice showed increased brain levels of the *n-6* PUFAs 18:2 *n-6* (linoleic acid), 20:4 *n-6* (arachidonic acid), and 22:5 *n-6* (docosapentaenoic) and decreased brain levels of *n-3* PUFAs 22:6 *n-3* (docosahexaenoic acid). The ratio of arachidonic acid versus docosahexaenoic acid (AA/DHA) and the ratio of total *n-6* PUFAs versus total *n-3* PUFAs were increased in *n-3* deficient mice

\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.0001$  ( $n = 5/6$  per group)

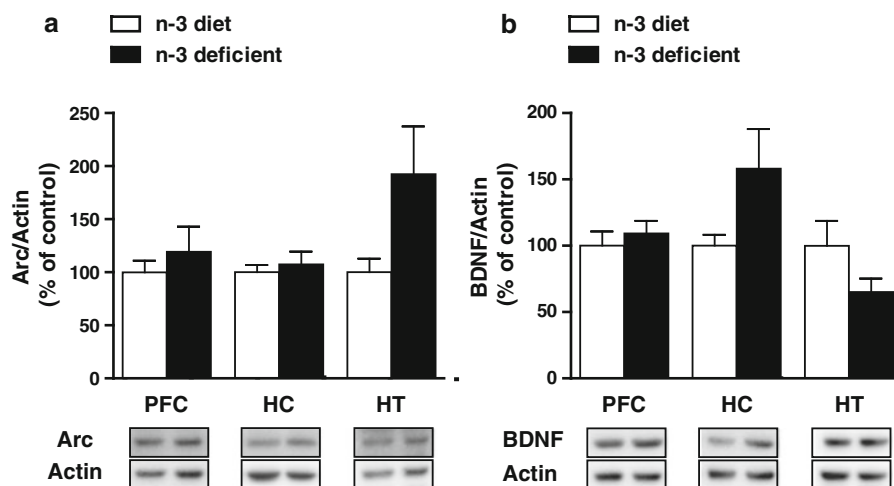
### Effect of nutritional *n-3* deficiency on anxiety-like- and depressive-like behaviors

It is well established that nutritional *n-3* deficiency produces anxiety and depressive-like symptoms [8, 16]. As expected, mice fed on the *n-3* deficient diet show a reduced amount of active exploration ( $t_{36} = 7.385$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1a) and an increase in the amount of litter scratching (index of anxiety) in the social exploration test ( $t_{36} = 4.727$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1b). In *n-3* deficient mice, the forced swimming test revealed

depressive-like symptoms as compared to the *n-3* diet mice (Fig. 1c, d). A two-way ANOVA revealed a significant interaction between diet and treatment for both swimming (Fig. 1c) and immobility (Fig. 1d) ( $F(1,46) = 4.865$ ;  $p < 0.05$ ). Swimming was significantly reduced ( $p < 0.001$ ) and immobility was increased ( $p < 0.001$ ) in *n-3* deficient mice compared to *n-3* diet mice. In addition, post hoc analysis showed that the tricyclic antidepressant imipramine significantly



**Fig. 1** Anxiety/depressive-like behaviors analyses in *n-3* diet and *n-3* deficient mice. **a** Amount of social exploration of an unfamiliar C57BL/6J mouse by *n-3* diet mice (white histogram) and *n-3* deficient mice (black histogram). Social exploration is decreased in *n-3* deficient mice as compared to *n-3* diet mice, \*\*\* $p < 0.0001$ . **b** Amount of litter scratching during the social exploration test is increased in *n-3* deficient mice, \*\*\* $p < 0.0001$ . **c, d** In the forced swimming test, swimming and immobility, which were evaluated during the 6 min of the test, were used as an index of depressive-like behavior. Imipramine was administrated intraperitoneally 30 min before the test. *n-3* Deficient mice displayed a decreased (in percent) of swimming and increased immobility as compared to *n-3* diet mice. Imipramine significantly reduced immobility in both dietary groups, \*\*\* $p < 0.0001$ . Error bars represent SEM.  $n = 14/24$  per group



**Fig. 2** Effects of nutritional *n*-3 deficiency on synaptic plasticity proteins. **a** Arc protein levels were similar in both groups in all brain structures. Protein levels in *n*-3 deficient mice are shown as compared to the control *n*-3 diet mice. **b** BDNF levels were not significantly modified in the prefrontal cortex (PFC),

hippocampus (HC), and hypothalamus (HT) of the *n*-3 deficient mice when compared to the *n*-3 diet mice. Values are means  $\pm$  SEM and are expressed in percent of *n*-3 diet control. Error bars represent SEM

decreased immobility ( $p < 0.001$ ) and increased swimming ( $p < 0.001$ ) in *n*-3 deficient mice.

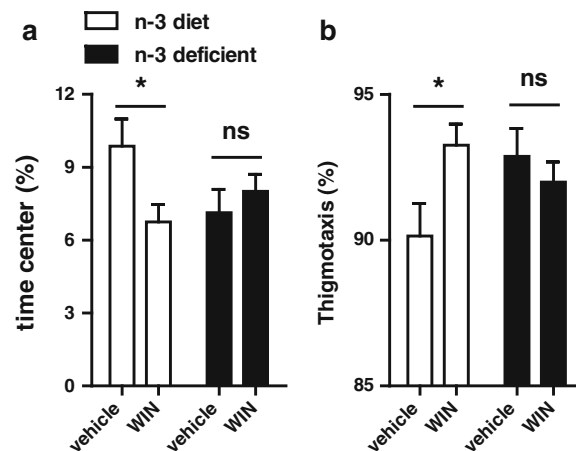
Effects of nutritional *n*-3 PUFAs deficiency on synaptic plasticity proteins

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) and BDNF are well-known plasticity proteins [21, 28] and have previously been shown to be regulated by PUFAs [15, 25]. We measured the effects of nutritional *n*-3 deficiency on Arc and BDNF protein levels in the prefrontal cortex, the hippocampus, and the hypothalamus of *n*-3 deficient mice in comparison to *n*-3 diet mice. No significant effect of the *n*-3 deficient diet was found for Arc expression in any of the analyzed brain structures in both groups (PFC  $t_7 = 0.7973$ ,  $p = 0.45$ ; hippocampus (HC)  $t_7 = 0.5634$ ,  $p = 0.59$ ; hypothalamus (HT)  $t_6 = 1.976$ ,  $p = 0.09$ ) (Fig. 2a). BDNF expression was not altered by the *n*-3 deficient diet in the prefrontal cortex ( $t_7 = 0.6246$ ,  $p = 0.55$ ) and the hypothalamus ( $t_6 = 1.636$ ,  $p = 0.153$ ); however, a trend was observed in the hippocampus ( $t_7 = 2.094$ ,  $p = 0.0746$ ) (Fig. 2b).

Nutritional *n*-3 PUFAs deficiency affects behavioral effect of endocannabinoid agonist

Endocannabinoids are in a unique position to link dietary lipids to emotional behavior. As synaptic

plasticity protein levels were not affected by the *n*-3 deficient diet, we postulated that eCB system is impaired in *n*-3 deficient mice. To this purpose, we evaluated whether the behavioral effect of a cannabinoid agonist was altered in *n*-3 deficient mice (Fig. 3). Anxiety-like behavior was measured in the open field



**Fig. 3** Behavioral effect of cannabinoid agonist WIN55,212-2 in *n*-3 diet and *n*-3 deficient mice. The percentage of time spent in the center and the time spent along the walls (thigmotaxis) of the arena normalized to the total time spent in the arena were measured. The test was performed 15 min after the administration of WIN. **a**, **b** In *n*-3 diet mice WIN reduced the time spent in the center of the arena (**a**) and increased thigmotaxis (**b**),  $*p < 0.05$ . The behavioral effect of WIN was abolished in *n*-3 deficient mice,  $ns$   $p > 0.05$ . Error bars represent SEM.  $n = 4/5$  per group

test immediately after the IP administration of WIN55,212-2 (0.1 mg per kg of body weight). A two-way ANOVA showed a significant interaction between diet and treatment ( $F(1,13)=5.205$ ;  $p<0.05$ ) on both time spent in the center of the arena (Fig. 3a) and thigmotaxis (Fig. 3b). WIN55,212-2 significantly reduced the percentage of time spent in the center ( $p<0.05$ ) of the arena and increased thigmotaxis ( $p<0.05$ ) in *n*-3 diet mice but not in *n*-3 deficient mice. The behavioral effect of WIN55,212-2 was absent in the *n*-3 deficient mice.

#### Nutritional *n*-3 PUFAs deficiency impairs p44 and p42 MAPK signaling dependent of endocannabinoids

ERK1/2 (p42, p44) is a MAPK signaling cascade activated by CB1 agonists in the brain [9]. We therefore analyzed the phosphorylation of p44 and p42 subunits 15 min after the IP administration of WIN55,212-2 in brain structures (PFC, HC, and HT) of mice fed on the *n*-3 control diet or the *n*-3 deficient diet. The expression of the total form of p44 and p42 MAPK was not altered by either the diet or the treatment (data not shown). In the PFC, no significant effect of WIN55,212-2 or diet was observed on p44 phosphorylation. In the hippocampus, there was a significant reduction of the phosphorylated levels of p44 MAPK after WIN55,212-2 treatment in mice fed on the control diet ( $t_8=2.364$ ,  $p<0.05$ ) but not with *n*-3 deficient diet. Phosphorylation of p44 was significantly increased by WIN55,212-2 in the hypothalamus of mice fed on the *n*-3 deficient diet ( $t_6=2.410$ ,  $p=0.05$ ), but not on the *n*-3 diet (Fig. 4b). The phosphorylated levels of p42 MAPK were significantly decreased in the PFC of *n*-3 diet mice after WIN55,212-2 ( $t_7=2.6$ ,  $p<0.05$ ). No effect of WIN55,212-2 treatment was revealed in the hippocampus of the *n*-3 deficient mice. In the hypothalamus, p42 phosphorylation was significantly increased by WIN55,212-2 treatment in *n*-3 deficient mice ( $t_6=2.562$ ,  $p<0.05$ ), but not in *n*-3 control diet mice.

#### Nutritional *n*-3 PUFAs deficiency alters Egr1 expression after endocannabinoid agonist

It has been shown that Egr1 is differently expressed when p44/p42 MAPK phosphorylation is modified by CB agonists [2-3]. In the PFC of *n*-3 control diet mice, a significant decrease of Egr1 levels was found after

**Fig. 4** Nutritional *n*-3 PUFAs deficiency alters p44 and p42 MAPK signaling 15 min after WIN 55,212-2 injection. **a** Representative immunoblots depicting expression of phosphorylated p44 and p42 MAPK and actin (as a loaded control) in brain structures of the *n*-3 diet mice (*top panel*) and of the *n*-3 deficient mice (*bottom panel*) subjected to vehicle or WIN treatment. **b** Phosphorylated levels of p44 MAPK subunit were modulated in the brain structures in response to WIN in *n*-3 diet mice (HC  $t_8=2.364$ ,  $p<0.05$ ) but not in *n*-3 deficient mice, except in the hypothalamus (HT  $t_6=2.410$ ,  $p=0.05$ ). **c** Phosphorylated levels of p42 MAPK subunit were differently modified in response to WIN in the brain structures of *n*-3 diet mice (PFC  $t_7=2.6$ ,  $p<0.05$ ) but not of *n*-3 deficient mice, except in the hypothalamus (HT  $t_6=2.562$ ,  $p<0.05$ ). Values are means  $\pm$  SEM and are expressed in percent of control. \* $p<0.05$ . Error bars represent SEM

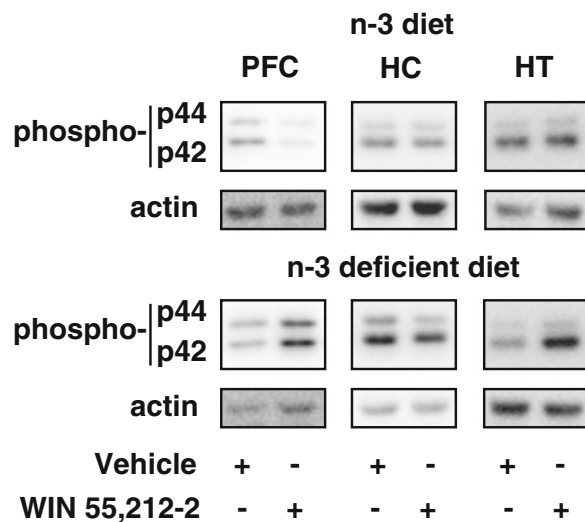
WIN55,212-2 treatment ( $t_7=2.972$ ,  $p<0.05$ ) but not in the *n*-3 deficient mice. No effect of WIN55,212-2 was observed in the hippocampus or hypothalamus of the *n*-3 control diet and the *n*-3 deficient diet mice (Fig. 5).

#### Discussion

In this study, we first examined the effect of long-term exposure to an *n*-3 PUFAs deficient diet on emotional behaviors as well as the expression of the plasticity proteins Arc and BDNF. In a second set of experiments, we further investigated whether the endocannabinoid system is deregulated in the brains of *n*-3 deficient mice. We did this by measuring the behavioral outcome as well as the p44/p42 MAPK activation in specific brain regions in response to WIN55,212-2, a CB agonist.

In this study, we show that *n*-3 deficient mice exhibited depressive-like symptoms when compared to *n*-3 control diet mice. In the forced swimming test, immobility time was increased and this behavior was rescued by the administration of the antidepressant imipramine. In addition, *n*-3 deficient mice displayed an impairment in social interaction when compared to *n*-3 control diet mice. These behavioral deficits linked to the consumption of an *n*-3 deficient diet are in agreement with previous studies showing that nutritional *n*-3 deficiency triggers the development of emotional alterations [8, 16]. Indeed, rats and mice fed on an *n*-3 deficient diet display increased immobility time in the Porsolt forced swimming test, reflecting despair-like behavior [8, 16]. Increased emotional deficits in rodents fed on a long-term *n*-3 deficient diet have been previously linked to the decrease of brain DHA [8, 16, 23]. We found a decrease of the DHA levels and an

**a**



**b**

□ Vehicle  
■ WIN 55,212-2

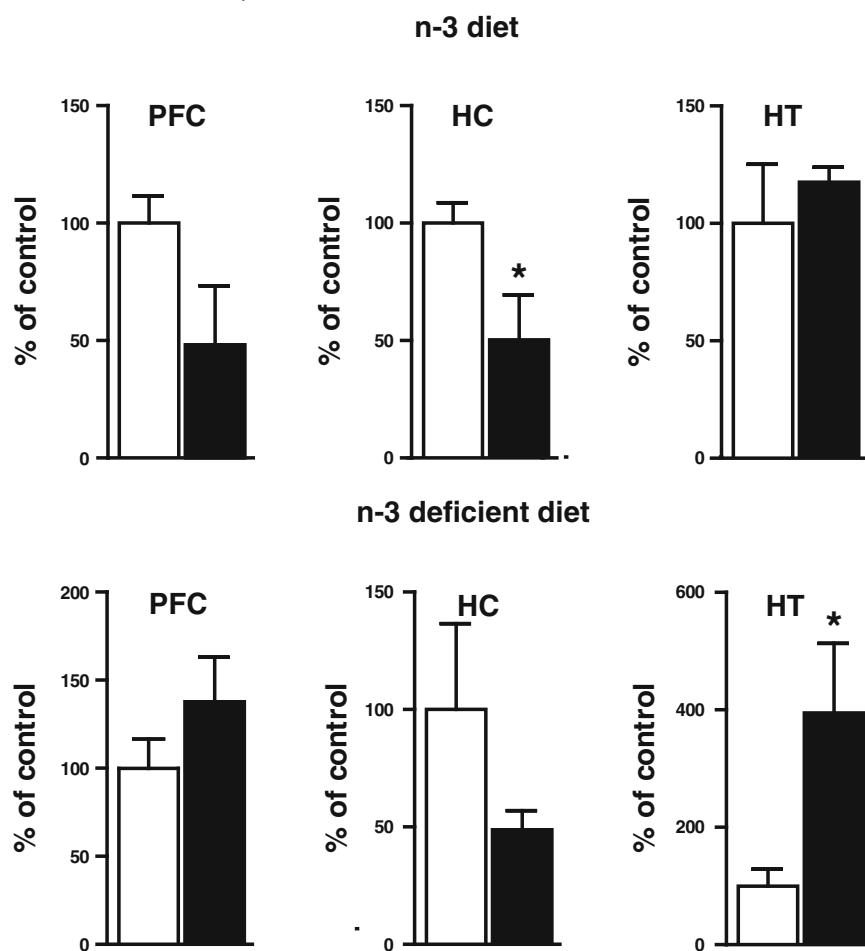
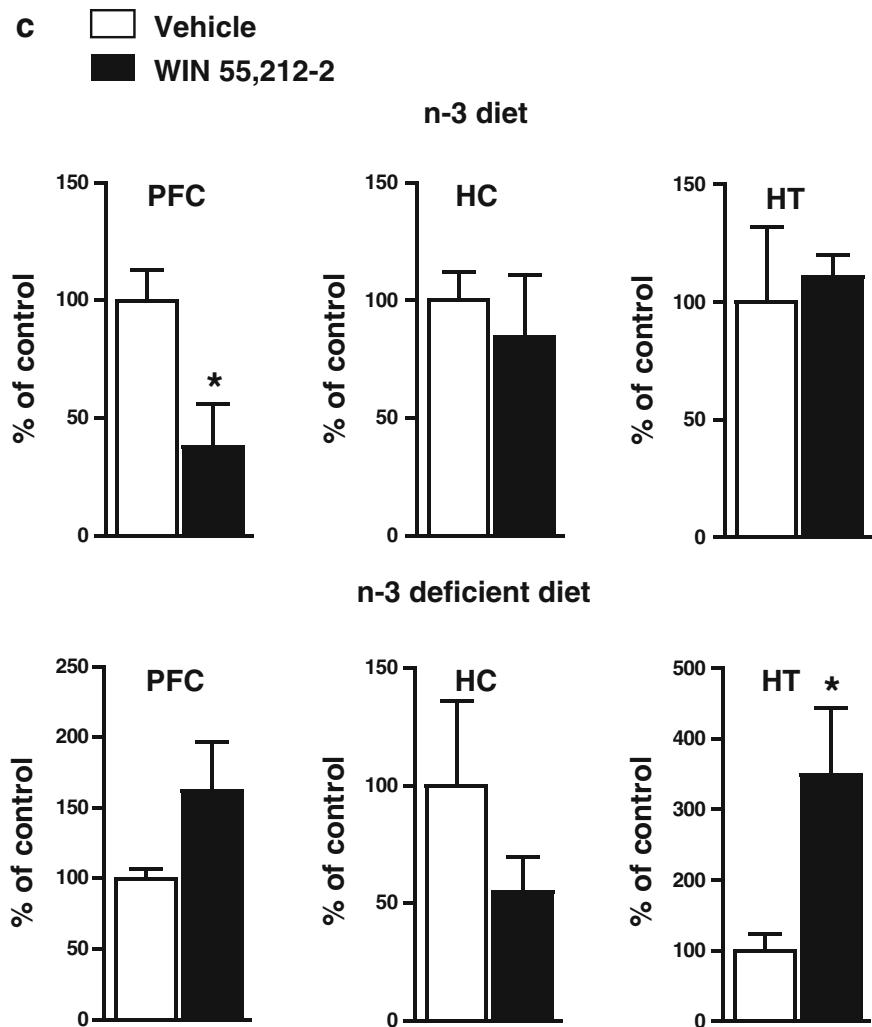


Fig. 4 (continued)

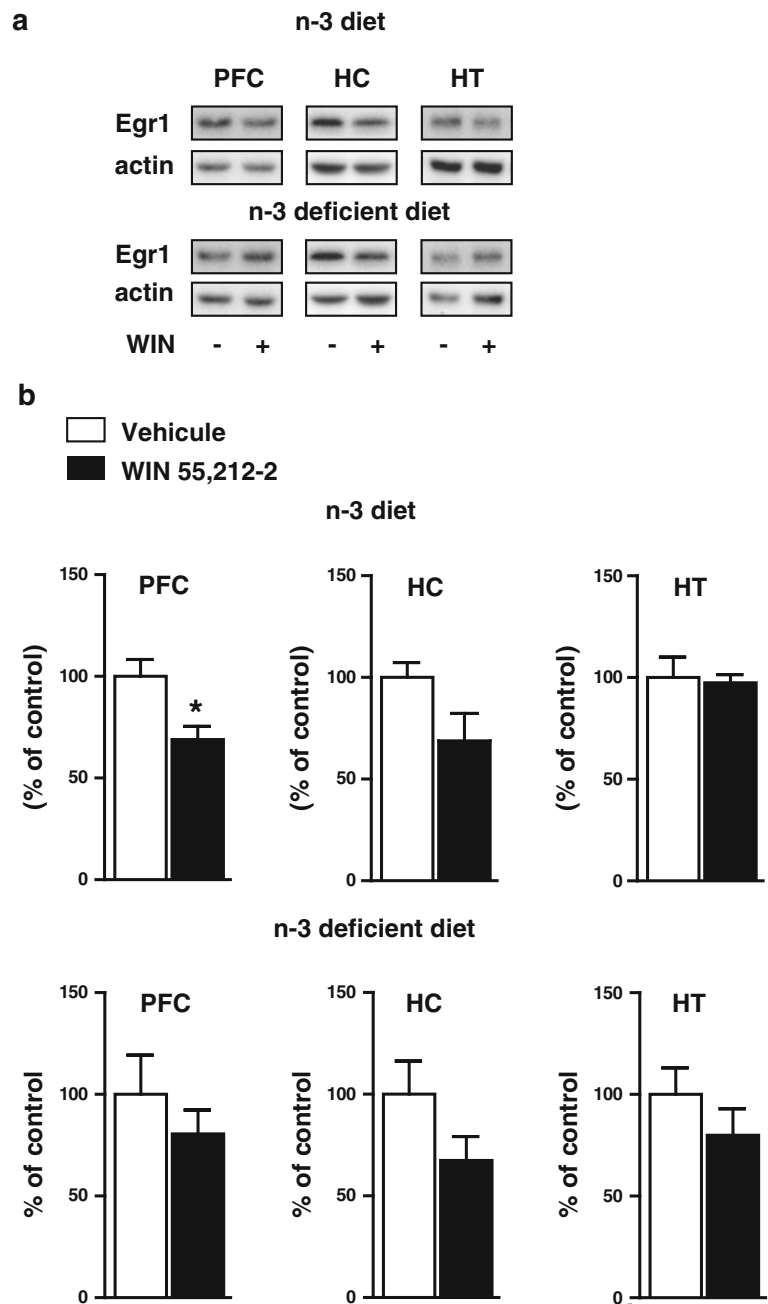


increase of AA leading to an imbalance between *n*-6- and *n*-3 PUFAs in the *n*-3 deficient mice cortices. These results are in accordance with previous studies showing a decrease of brain DHA in rodents fed on an *n*-3 deficient diet throughout life [5, 20, 22].

The mechanisms underlying a decrease in brain DHA and impaired emotional behaviors are still a matter of debate: reduced BDNF expression and/or associated signaling pathway CREB and/or p38 MAPK activity [25] and/or disturbance of neurotransmitter systems associated with depression such as dopamine and serotonin could be involved [6]. More recently, the decrease in brain DHA has been associated with an alteration of synaptic plasticity. In vivo, the two forms of plasticity, long-term potentiation and depression (LTD), are altered in the hippocampus and the prefrontal cortex of the *n*-3 deficient mice,

respectively [4, 16]. Decreased synaptic proteins BDNF and Arc expression in the brain are commonly linked to the development of altered emotional behavior [1, 7]. In animal models of depression, it has been shown that Arc mRNA levels decrease in the prefrontal cortex [7]. In addition, BDNF expression has been reported to be decreased in the PFC and the whole brain of rats fed for 15 weeks starting from weaning [25] and throughout life [15] with an *n*-3 deficient diet. In our study, BDNF and Arc expressions in the PFC, HC, and HT were unaffected by the diet. These discrepancies might be due to several parameters such as differences in used diets, the length of nutritional *n*-3 deficiency, species used, or even sex. Further studies are therefore needed to link synaptic proteins and DHA level decrease in the brain of *n*-3 deficient mice. As DHA is a key component of neuronal membranes,

**Fig. 5** Nutritional *n*-3 PUFAs deficiency impairs *Egr1* expression. **a** Representative immunoblots depicting expression of *Egr1* and actin (as a loaded control) in brain structures of *n*-3 diet mice (*top panel*) and of *n*-3 deficient mice (*bottom panel*) subjected to vehicle or WIN treatment. **b** *Egr1* levels were decreased after WIN treatment ( $t_7 = 2.972$ ,  $p < 0.05$ ) only in the PFC of *n*-3 control diet mice. No changes were observed in other structures in the control diet mice or in the *n*-3 deficient mice. Values are means  $\pm$  SEM and are expressed in percent of untreated control.  $*p < 0.05$ . Error bars represent SEM



a low brain content of DHA could affect membrane fluidity and consequently have a direct effect on receptor functions. Indeed, it would be of great interest to measure TrkB expression, the receptor of BDNF and its functionality.

We previously showed that the eCB system is altered in *n*-3 deficient mice with a defective LTD in the PFC and a desensitization of G protein-coupled CB1 receptors [16]. These results lead us to hypothesize that

molecular eCB signaling was impaired in *n*-3 deficient mice. As the eCB system is a main regulator of mood and emotions [13, 18], we first evaluated whether the behavioral effect of a cannabinoid agonist was altered in the *n*-3 deficient mice. We tested the effect of WIN55,212-2 on emotional behavior, measured in the open field test. We found that in the *n*-3 control diet mice, WIN55,212-2 (0.1 mg per kg) treatment reduced the time spent in the center of the arena and increased

thigmotaxis. This anxiogenic effect of WIN55,212-2 (0.1 mg per kg) was eliminated in *n*-3 deficient mice, consistent with our previous study. The lack of behavioral effect of WIN55,212-2 in *n*-3 deficient mice could be due to the impairment of CB1 activity. In agreement, CB1R null mice spend less time in the center of the arena in the open field test. They also display decreased social interaction and increased immobility in the forced swimming test [31]. In the *n*-3 deficient mice, it is likely that the CB1 signaling pathway but not CB1 expression is impaired as we previously found that G protein is uncoupled to CB1 in the brain of *n*-3 deficient mice [16].

To further investigate the alteration of the eCB system, we evaluated the effect of WIN55,212-2 on p44/p42 MAPK phosphorylation in the PFC, HC, and HT of mice fed on an *n*-3 deficient diet and an *n*-3 control diet. Fifteen minutes after WIN55,212-2 treatment, phosphorylated levels of p44 and p42 MAPK in the HC and PFC were decreased in the *n*-3 control diet mice but not in the *n*-3 deficient mice. In addition, Egr1 expression was significantly decreased in the PFC of the *n*-3 control diet mice but not in the *n*-3 deficient mice. CB agonist activates the expression of the immediate early genes Egr1 through MAPK signaling pathway activation [2]. As MAPK signaling was altered in the brain of the *n*-3 deficient mice, it was not surprising that Egr1 expression was not induced by WIN55,212-2. Altogether, our results suggest a lack of activation of CB1 in response to WIN55,212-2 in the PFC of *n*-3 deficient mice. This is in agreement with our previous results showing that a nutritional *n*-3 deficiency throughout life alters the CB1 system in the PFC [16]. The stimulation of CB1 receptors by CB agonists (THC, WIN55,212-2 and CP-55940) has been previously reported to activate MAPK signaling pathway both in vitro and in vivo [3, 9]. It is surprising that in our experiments, p44/p42 phosphorylation decreases in response to WIN55,212-2 treatment in the brain of the *n*-3 control diet mice. However, because we analyzed MAPK phosphorylation only at one time point (15 min), it could be that the phosphorylation occurs at an earlier time point. The CB agonist acts rapidly, as demonstrated by Bouaboula and coworkers showing an increase in MAPK phosphorylation in vitro as early as 1 min after the CB agonist treatment [3]. In the HT of the *n*-3 deficient mice, WIN55,212-2 induces the phosphorylation of p44/p42 MAPK but does not increase the expression of Egr1. This suggests a deregulation of the

eCB system by *n*-3 deficiency in the PFC and in the HT. The decrease in the levels of brain DHA could explain such discrepancies because DHA and eCB are closely linked [33]. In support of this, *n*-3 deficiency differentially affects the magnitude of the decrease in DHA levels in the PFC and the HT, with the PFC displaying a higher decrease in DHA levels [17].

In summary, we showed that nutritional *n*-3 deficiency throughout life leads to the development of anxiety/depressive-like behavior and eCB system alteration in the PFC and the HT as revealed by the alteration of WIN55,212-2-induced MAPK pathway activation. Our results illustrate a potential mechanism by which the consumption of *n*-3 PUFAs works against the risk for altered emotional behavior linked with endocannabinoids.

**Acknowledgments** This study was financially supported by INRA, FRM, and the Région Aquitaine. T.L. received stipend from ANR and CM from the Ministry of French Research. The authors thank P. Birac, C. Tridon, and M. Cadet for taking care of the mice and V. DeSmedt and C. Vaysse (ITERG, Pessac, France) for helpful support.

## References

1. Angelucci F, Brene S, Mathe AA (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 10(4):345–352
2. Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270(23):13973–13980
3. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312(Pt 2):637–641
4. Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun SB, Lovinger D, Kim HY (2009) Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 111(2):510–521
5. Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM (2000) Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* 41(3):465–472
6. Chalon S (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(4–5):259–269
7. Covington HE 3rd, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, LaPlant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, Nestler EJ (2010)

- Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 30(48):16082–16090
8. DeMar JC Jr, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI (2006) One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 47(1):172–180
9. Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23(6):2371–2382
10. Fedorova I, Hussein N, Di Martino C, Moriguchi T, Hoshiba J, Majchrzak S, Salem N Jr (2007) An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(5–6):269–277
11. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497–509
12. Hibbeln JR (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet* 351(9110):1213
13. Hill MN, Gorzalka BB (2009) The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8(6):451–458
14. Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS (2011) Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex* 21(9):2056–2064
15. Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE, Puskas LG (2004) Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30):10931–10936
16. Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Laye S, Manzoni OJ (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14(3):345–350
17. Levant B, Ozias MK, Carlson SE (2007) Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J Nutr* 137(1):130–134
18. Lutz B (2009) Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol* 9(1):46–52
19. McNamara RK (2010) DHA deficiency and prefrontal cortex neuropathology in recurrent affective disorders. *J Nutr* 140(4):864–868
20. Mingam R, Moranis A, Bluth RM, De Smedt-Peyrusse V, Kelley KW, Guesnet P, Lavialle M, Dantzer R, Laye S (2008) Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 28(9):1877–1886
21. Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry* 61(2):187–197
22. Moranis A, Delpach JC, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Guesnet P, Lavialle M, Joffre C, Laye S (2011) Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. *Brain Behav Immun*
23. Moriguchi T, Greiner RS, Salem N Jr (2000) Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75(6):2563–2573
24. Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5:600–608
25. Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC Jr, Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP (2007) n-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 12(1):36–46
26. Rodgers RJ, Evans PM, Murphy A (2005) Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol* 16(5–6):405–413
27. Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K (2001) Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36(9):945–959
28. Shepherd JD, Bear MF (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 14(3):279–284
29. Simopoulos AP (2000) Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci* 79(7):961–970
30. Sinclair AJ (1975) Incorporation of radioactive polyunsaturated fatty acids into liver and brain of developing rat. *Lipids* 10(3):175–184
31. Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bachli H, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* 8(3):196–208
32. Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359(2–3):133–136
33. Watanabe S, Doshi M, Hamazaki T (2003) n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69(1):51–59

### 3. ETUDE DE L'OBJECTIF 3 (ARTICLE 3)

**L'axe hypothalamo-hypophysaire est un médiateur des altérations des comportements de type dépressif et anxieux ainsi que de l'atrophie neuronale observées chez des souris déficientes en AGPI n-3.**

Des études menées chez les rongeurs montrent qu'une faible consommation d'AGPI n-3 est associée au développement de comportements dépressif et anxieux et à la réduction de DHA dans le cerveau. De plus, certaines formes de plasticité synaptique sont altérées comme la LTP dans l'hippocampe ou la LTD dans le cortex préfrontal. En dépit de ces études, les bases cellulaires et moléculaires responsables de l'augmentation des comportements de type dépressif et anxieux chez les animaux dont les taux de DHA cérébraux sont diminués ne sont pas clairement élucidées. Parmi les mécanismes physiopathologiques de la dépression, l'axe HPA est un système clef dans la réponse au stress et joue un rôle primordial dans le développement de la dépression et de l'anxiété. Le but de cette étude a été d'étudier le rôle de l'axe HPA dans les altérations du comportement émotionnel des souris nourries avec un régime déficient en AGPI n-3. Dans un premier temps, l'expression des récepteurs GR et MR, ainsi que celle d'une des cibles des GR, le BDNF, ont été mesurées par western-blot dans le CPF et l'HC de souris nourries avec une diète équilibrée ou déficiente en AGPI n-3. Les niveaux de corticostérone plasmatique ont été mesurés par des analyses radio-immunologique (RIA). Ces données révèlent que de l'expression des GR et de BDNF diminue spécifiquement dans le CPF, sans modifications d'expression des MR. Cette altération est accompagnée d'une hypercorticostéronémie chez les animaux déficients en AGPI n-3. En accord avec ces résultats, un traitement chronique aux antagonistes des GR induit des altérations des comportements émotionnels chez les souris nourries avec un régime standard. En revanche, le traitement n'exacerbe pas les altérations comportementales décrites chez les souris déficientes en AGPI n-3. L'arborisation dendritique dans le CPF a également été étudiée par la technique de coloration Golgi et analysée à l'aide du logiciel NeuroLucida. Les animaux carencés présentent une atrophie de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux du CPF associée à une augmentation des comportements de type dépressifs et anxieux avant et après un protocole de défaite sociale. Enfin, l'ablation des glandes surrénales et la normalisation des niveaux de corticostérone chez les animaux déficients en AGPI n-3 a permis de mettre en évidence une amélioration à la fois des comportements dépressifs et anxieux mais aussi une amélioration de l'arborisation dendritique dans le CPF. Ces résultats suggèrent que la corticostérone est impliqué dans l'expression des comportements de type dépressifs et

anxieux ainsi que dans l'atrophie neuronale du CPF observés chez les souris déficientes en AGPI n-3. Ce travail est en préparation en vue d'une publication sous le titre « Hypothalamo-pituitary-adrenal axis mediates n-3 polyunsaturated fatty acids deficient diet-induced depressive- and anxiety-like symptoms along with neuronal atrophy » par T. Larrieu, M. Hilal, V. De Smedt-Peyrusse, N. Sans, L. Capuron and Sophie Layé. Mes contributions dans ce travail ont été de concevoir et de réaliser la majorité des expériences biochimiques, neuroanatomiques et comportementales ainsi que l'analyse et l'interprétation des données et l'écriture du manuscrit. L'ébauche du manuscrit constitue le présent chapitre de mon travail de thèse.

## **High corticosterone is involved in alteration of dendritic arborization and emotional behavior following dietary omega-3 deficiency**

Thomas Larrieu<sup>1,2</sup>, Muna Hilal<sup>3,2</sup>, Véronique De Smedt-Peyrusse<sup>1,2</sup>, Nathalie Sans<sup>3,2</sup>, Lucile Capuron<sup>1,2</sup> and Sophie Layé<sup>1,2,£</sup>

<sup>1</sup>Nutrition et Neurobiologie Intégrée, INRA 1286, 33077 Bordeaux Cedex, France

<sup>2</sup>University of Bordeaux, Bordeaux, 33077, France

<sup>3</sup>Neurocentre Magendie, INSERM U862, 33076 Bordeaux cedex, France

<sup>£</sup>Corresponding author: Sophie Layé, PhD

Nutrition et Neurobiologie Intégrée, NutriNeuro, INRA UMR 1286

Bâtiment UFR pharmacie, 2e tranche, 2e étage, case courrier 34,

Université Victor Ségalen, 146 rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, France

E-mail : [sophie.laye@bordeaux.inra.fr](mailto:sophie.laye@bordeaux.inra.fr)

Phone : 33 557 579 218

Fax : 33 557 571 227

Running title: nutritional omega 3 deficiency and mood-related behaviors

**ABSTRACT**

Low dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has been associated to the prevalence of mood disorders in humans. Our previous study has demonstrated that one generation of dietary n-3 PUFAs deficiency induces emotional behaviors alterations and synaptic plasticity impairment in the prefrontal cortex (PFC) of mice. However, the pathways through which the consumption of imbalanced n-3 PUFAs diet leads to behavioral alterations are still unclear. Here, we report that mice fed with n-3 deficient diet displayed dendritic atrophy in pyramidal neurons within the PFC and corticosterone increase as compared to mice fed with n-3 diet. N-3 deficient and n-3 diet mice were then submitted to chronic social defeat stress (CSDS). In n-3 deficient mice, no additional effect of CSDS was revealed on neuronal morphology and emotional behaviors, which were both altered in CSDS n-3 diet mice. These results prompted us to further investigate the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the development of behavioral and neurobiological alterations in n-3 deficient mice. First, corticosterone levels were higher in n-3 deficient mice as compared to n-3 diet mice. In addition, glucocorticoid receptor (GR) expression was down-regulated in the PFC of n-3 deficient mice. Importantly, the normalization of corticosterone in n-3 deficient mice improved neuronal morphology impairment in the PFC and emotional behavior impairment. Collectively, our results show that low dietary n-3 PUFAs intake induces emotional behavior impairment and neuronal dendritic atrophy through the HPA axis hyperactivity.

**Keywords:** n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA); hypothalamus-pituitary adrenal (HPA) axis; prefrontal cortex (PFC); chronic social defeat stress (CSDS); glucocorticoid receptor (GR); depression

## INTRODUCTION

According to the world health organization, major depressive disorders (MDD) and anxiety disorders are among the foremost causes of disability in the world. Moreover, considerable comorbidity exists between these disorders (Hirschfeld, 2001). Body of evidences suggests that MDD and anxiety disorders are linked to dietary lipids, especially the n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Adams et al., 1996; Maes et al., 1996; Peet et al., 1998; Tiemeier et al., 2003; Green et al., 2006; McNamara et al., 2007; McNamara et al., 2010; McNamara and Liu, 2011). The relevance of lipids in brain function is illustrated by the fact that the central nervous system (CNS) has the highest concentration of lipids in the organism after adipose tissue (Sastry, 1985). The CNS is particularly enriched in PUFAs including arachidonic acid (AA, 20:4n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). In mammals, AA and DHA are converted from their precursors, linoleic acid (LA, 18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), respectively (Sprecher, 2000), or are obtained directly through diet (Marszalek and Lodish, 2005). LA and ALA are not synthesized *de novo* by mammals and are exclusively provided by diet. Numerous clinical studies revealed that subjects with depressive symptoms and with social anxiety disorders (SAD) have significant lower level of n-3 PUFAs and higher ratio of n-6:n-3 PUFAs in the blood and in the brain (Adams et al., 1996; Maes et al., 1996; Peet et al., 1998; Tiemeier et al., 2003; Green et al., 2006; McNamara et al., 2007; McNamara et al., 2010; McNamara and Liu, 2011). Precisely, ALA and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) are decreased in serum cholesterol ester of MDD patients as compared to minor depressive or healthy subjects (Maes et al., 1996). In addition, total n-3 PUFAs, among DHA, measured in red blood cell membranes are reduced in depressed and non-depressed patients with SAD (Peet et al., 1998; Green et al., 2006). To support clinical observations, several epidemiological evidences linked low n-3 PUFAs dietary intake and the prevalence of mood disorders in the general population (Hibbeln, 1998, 2002; Otto et al., 2003). In rodents, nutritional approaches aiming at modeling poor dietary n-3 PUFAs intake have been developed in the last century. One- or multi-generation of dietary n-3 deficiency has been shown to induce depressive and anxiety-like behaviors in rats, mice and monkeys (Carrie et al., 2000; Takeuchi et al., 2003; DeMar et al., 2006; Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). These emotional alterations are associated with a decrease of DHA in the brain, with the greatest reduction being in the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HC) (Frances et al., 1995; Favreliere et al., 1998; Carrie et al., 2000; McNamara and Carlson, 2006).

The hyperactivation of the hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis remains one of the cardinal features of depression and anxiety (Chrousos, 2009). Indeed, the HPA axis is deregulated in patients suffering of mood disorders. As a result, higher blood levels of cortisol and free cortisol in the urine, together with increased corticotropin releasing hormone (CRH) in the cerebral spinal fluid (CSF) have been found in patients with mood disorders (Carpenter and Bunney, 1971; Carroll et al., 1976; Nemeroff et al., 1984; Holsboer and Barden, 1996; Holsboer, 2000). Corticosteroid receptor signaling pathway is altered in the hippocampus and the PFC of rodents with depression-like symptoms (Ridder et al., 2005), suggesting that the HPA axis deregulation is linked to brain glucocorticoid receptor (GR) (Holsboer and Barden, 1996; Holsboer, 2000; Sapolsky, 2000; Nestler et al., 2002; Chiba et al., 2012). The link between HPA axis deregulation, mood disorders and n-3 PUFA intake is still unclear. In humans, low plasma DHA level is correlated to increased CRF concentrations in CSF (Hibbeln et al., 2004). Experimental studies further revealed that rats fed with n-3 PUFAs deficient diet display an exaggerated HPA axis response to acute stress (Levant et al., 2008), while n-3 PUFAs supplementation prevents chronic restraint stress-induced corticosterone elevation (Ferraz et al., 2011).

One feature of depression concerns the alteration of neuronal morphology characterized by a decrease in neuronal size and density in the medial prefrontal cortex (mPFC) and the HC attributable in part to pyramidal neurons atrophy (Rajkowska et al., 1999; Sapolsky, 2000; Rajkowska et al., 2001; Cotter et al., 2005; Rajkowska et al., 2005; Van Otterloo et al., 2009). In rodents submitted to chronic stress, the development of depressive- and anxiety-like behaviors is accompanied by the simplification and retraction of the apical dendritic tree pyramidal neurons in the PFC (Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004; Brown et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Liston et al., 2006; Radley et al., 2006; Dias-Ferreira et al., 2009; Eiland et al., 2011; Hill et al., 2011). Importantly, neurites growth and synaptogenesis are decreased in the brain of n-3 deprived mice (Cao et al., 2009) while promoted by DHA *in vitro* (Calderon and Kim, 2004). Conversely, gerbils fed with a high-DHA diet and transgenic fat-1 mice, which endogenously produce DHA in the brain, both display increased dendritic spine density in the hippocampus (Sakamoto et al., 2007; He et al., 2009). All together, these data suggest that DHA brain content influences neuronal plasticity and depressive- and anxiety-like behaviors and that corticosterone could account for neuronal remodeling. Indeed, repeated administration of corticosterone in rodents reduces the dendritic arborization of apical pyramidal neurons within the PFC along with defective depressive and anxiety-like

behaviors (Wellman, 2001). In addition, the administration of the GR antagonist Mifepristone prevents stress-induced apical dendrite reduction in the PFC (Liu and Aghajanian, 2008).

Our study aimed to unravel the role of HPA axis deregulation in the development of depressive and anxiety-like behavior linked to the consumption of n-3 PUFA unbalanced diet. For this purpose, mice were fed with n-3 deficient diet or n-3 diet and were submitted to a chronic social defeat stress (CSDS) (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Our data reveal that HPA axis was impaired in n-3 deficient mice, reflected by an elevation of total corticosterone along with GR and GR-dependent target BDNF downregulation in the PFC. N-3 deficient mice with adrenalectomy and normalized corticosterone levels displayed emotional behaviors as well as neuronal atrophy improvement. All together, our results highlight how n-3 PUFA deficiency alters emotional behaviors through defective HPA axis.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** All experiments were performed according to the criteria of the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Retired CD1 breeders used as the aggressors in the CSDS experiments were obtained from Charles River. To avoid maximum suffering, CSDS was carried out with the minimum number of animals (n=4-6 mice per group). All tests were conducted during the light period.

**Diet.** After mating, C57BL6/J females were fed with a diet containing 6% fat in the form of African peanut oil (rich in linoleic acid, 18:2n-6, the n-3 deficient diet) or rapeseed oil (rich in  $\alpha$ -linolenic acid, 18:3n-3; the n-3 diet) throughout gestation and lactation as previously described (Mingam et al., 2008; Labrousse et al., 2012). After weaning, offspring were subjected to the same diet until adulthood. The mice were housed 2 per cage and maintained in a temperature and humidity controlled facility on a 12 hours light dark cycle with food and water *ad libitum*. Mice under study were 3-4 month old when the behavioral and biochemical analysis were conducted.

**Chronic Social defeat stress (CSDS).** CSDS was performed as previously described (Berton et al., 2006). Briefly, intruder mice (n-3 deficient and n-3 diet mice) were exposed for 5 min/day for 10 days to an aggressive CD1 mouse, during which they were attacked and displayed subordinate posturing. Each episode of stress was followed by 3 hours of protected sensory contact with their aggressor. Mice were exposed to a different aggressor each day for 10 days in order to prevent any habituation to the resident aggressor. Control mice were placed in pairs within an identical home cage setup that for defeated mice, one control animal per side divided by a perforated Plexiglas divider, for the duration of the defeat sessions. Twenty four hours after the last episode of stress, social interaction was evaluated for all mice during 5 min and active investigatory behavior was recorded to assess social interaction. Forty eight hours after the last session of stress, open-field test was performed to assess anxiety behavior. Basal condition groups are indicated as control and CSDS condition groups as defeat.

**Behavioral testing.** For social exploration, group-housed experimental subjects (2 per cage) were separated and transferred to a new cage (40 x 40 cm). A social exploration session comprised 5-min without target following by 5-min exposure of an unfamiliar adult CD1 male enclosed in a wire mesh placed in the corner of the cage. Active investigatory behavior (mainly sniffing the anogenital region, mouth, ears, trunk and tail) were manually counted by

the experimenter. Open field test was performed as previously published (Lafourcade et al., 2011). Briefly, mice were allowed to freely explore for 10 min the apparatus (40 x 40cm). A video tracking system (Smart, Panlab) recorded the exact track of each mouse as well as total distance traveled (cm) and time spent in the inner region (%).

**Neuroendocrinological analysis.** To overcome the possible stress caused by the behavioral tests executed after CSDS, corticosterone analysis were conducted 2 weeks after the last session of stress. Trunk blood collection (n=4-6 mice per group) was performed at the end of the light period in ethylenediaminetetraacetic acid-lined tubes. Corticosterone was measured with an in-house RIA in the plasma as previously described (Richard et al., 2010). Briefly, after steroid extraction with absolute ethanol, total corticosterone was measured by competition between cold corticosterone (B) and  $^3\text{H}$ -B (B\*) by a specific anti-corticosterone antibody provided by Dr. H. Vaudry (University of Rouen, France).

**Morphological analysis.** After trunk blood collection, brains were quickly removed, washed in PBS and were processed for staining of individual neurons following the manufacturer's instructions for the rapid Golgi kit (FD Neurotech). Golgi stained brain-slices of 100µm containing the PFC were used for morphological analysis. Neurons were reconstructed using a Leica microscope (x100) and the Neurolucida software. Pyramidal neuron of PFC II/III layers (from 2.58 to 2.96 mm anterior to bregma) were examined for dendritic architecture as these neurons have been repeatedly characterized as those which exhibit remodelling in response to chronic stress (Radley et al., 2004; Brown et al., 2005; Liston et al., 2006; Hill et al., 2011). Four to 7 neurons per mouse (n=4 mice per group) were reconstructed by a trained experimenter blind to the conditions and analyzed by using Neurolucida software. For Sholl analysis, the center of the soma was used as a reference point and dendritic length, number of intersections and number of nodes were quantified both as a total measure per neuron as well as a function of radial distance from the soma in 10 µm increments.

**Western blot analysis.** Another batch of n-3 deficient and n-3 diet mice was used for western blot measurement (n=6-7 mice per group) performed as previously described. PFC were homogenized in lysis buffer (TRIS 20 mM pH 7.5, anti-protease cocktail, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.5 M EDTA, 1 mM NaOV, 1 mM NaF). After centrifugation, protein concentration was determined using a BCA assay kit (Uptima, Montluçon, France). Equal amount of proteins (50µg) was loaded onto SDS-PAGE gel (10%) and transferred onto PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated overnight (4°C) with

anti-GR (M-20) (1:5000, SantaCruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA), anti-MR (H-300) (1:500, SantaCruz Biotechnology), anti-BDNF (1:5000, Abcam) and anti-actin (1:2500, Sigma, Saint-Louis, MS, USA). After washing, membranes were incubated 1h with peroxidase-conjugated secondary antibody to rabbit (1:5000, Jackson ImmunoResearch laboratories, Westgrove). Between each revelation, membranes were incubated 15 min in stripping buffer (Reblot plus, Millipore) to remove the previous antibody. Staining was revealed with ECL-Plus western blotting system (Perkin Elmer, Forest City, CA). Chemiluminescence was captured and quantified using gene Tools software (Syngene).

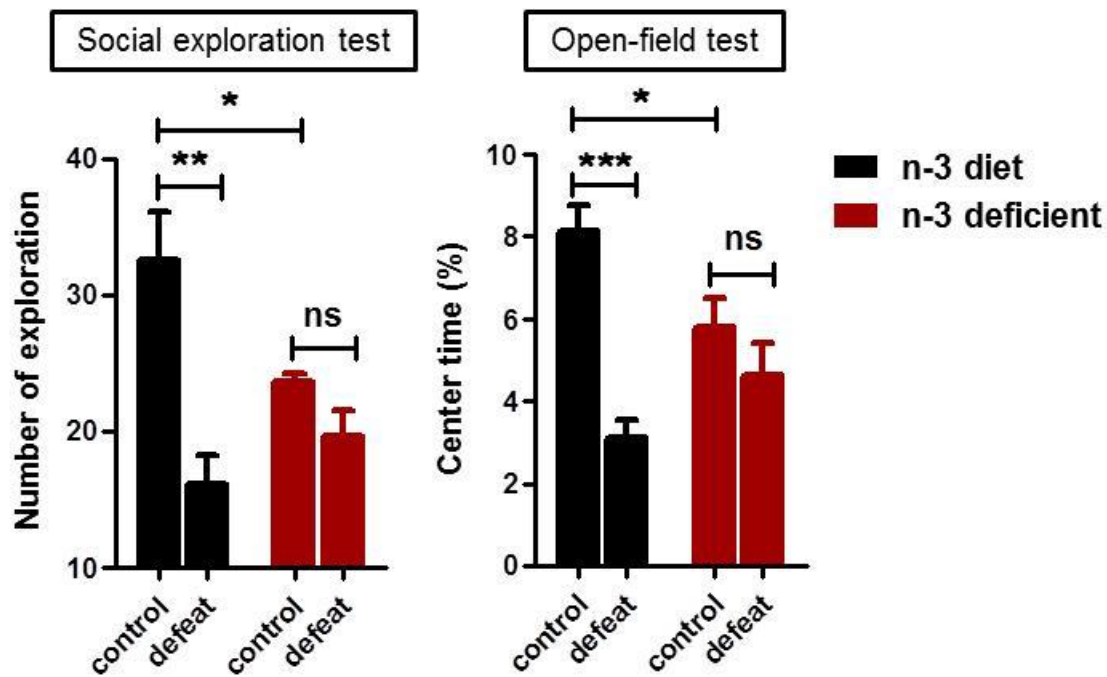
**Surgery and Mifepristone treatment.** Another batch of n-3 deficient mice was used for Mifepristone experiment (n=10 mice per group). For pellets implantation, the skin was lifted on the back side of the C57BL6/J male mice and an incision was made. A pocket was formed with a pair of forceps about 2cm beyond the incision site. Finally, the Mifepristone or Placebo pellets were implanted into the pocket with forceps. Mifepristone pellets release continuously 20mg/kg/day for 21 days (Innovative Research of America (IRA)). After 21 days of treatment, open-field test and social exploration were performed as described above.

**Surgery and corticosterone replacement.** Another batch of n-3 deficient mice was used for corticosterone replacement experiment (n=6-8 mice per group). Bilateral adrenalectomy (ADX) was performed under isoflurane anesthesia on 12-week-old n-3 deficient mice. Sham-operated animals were subjected to anesthesia and bilateral laparotomy. Just after the surgery, mice were housed individually until the end of the experiment. Adrenalectomized n-3 deficient mice were exposed to corticosterone replacement (25 µg/ml in 0.9% saline; Sigma) in the drinking water to normalize glucocorticoid levels as previously described (Gould et al., 1992; Tanapat et al., 2001).

**Statistical analyses.** All values are given as mean  $\pm$  s.e.m. Results obtained in behavior, dendritic length, intersections, and nodes were all analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA), with stress and diet as fixed factors. Analyses were followed by the Bonferroni *post-hoc* test. Data generated from Sholl analysis were analyzed using a repeated measure ANOVA, with distance from soma acting as a within-subject factor. Bonferroni *post-hoc* tests were used to determine specific differences between groups at different segments from the soma. All statistical tests were performed with GraphPad Prism (GraphPad software) using a critical probability of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

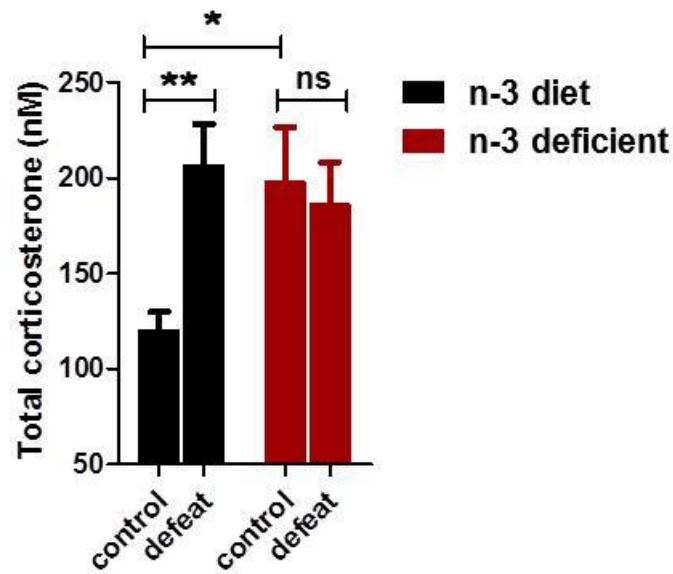
**Emotional behavior impairment in n-3 deficient mice is not exacerbated by CSDS.** We and others previously reported that rodents fed with n-3 PUFAs deficient diet develop emotional behaviors impairment as compared to n-3 diet mice (Carrie et al., 2000; DeMar et al., 2006; Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). In our study, n-3 deficient and n-3 diet mice were submitted to CSDS and social and anxiety-like behaviors were measured 24 and 48h after the last session of CSDS respectively (Figure 1). A 2 way ANOVA (diet x stress) revealed a significant effect of interaction in the social interaction test ( $F_{1,17} = 7.413$ ,  $p=0.01$ ). The number of social exploration was significantly decreased in control n-3 deficient mice as compared to control n-3 diet mice ( $p<0.05$ ) as we have previously reported (Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). In addition, defeated n-3 diet mice displayed a significant decrease in the number of active social exploration of a new unfamiliar CD1 male mouse compared to control n-3 diet mice ( $p<0.01$ ). No significant differences were revealed in n-3 deficient and control n-3 deficient mice. Anxiety-like behavior was measured by using the open-field test. A significant interaction of the diet and stress factors was revealed for the percentage of time spent in the center of the open-field ( $F_{1,17} = 9.268$ ,  $p=0.0073$ ). The time spent by defeated n-3 diet mice in the center of the open-field was significantly reduced compared to control n-3 diet mice ( $P<0.001$ ). Control n-3 deficient mice exhibited a significant reduction in the percentage of time spent in the center of the open-field as compared to the n-3 diet mice ( $P<0.05$ ). Interestingly, defeated n-3 deficient mice spent similar amount of time in the center of the open-field to control n-3 deficient mice. Collectively, dietary n-3 PUFA deficiency revealed defective emotional behaviors in mice, including reduction of social exploration and time spent in the center of the open-field, that were not exacerbated by CSDS.



**Figure 1: deficiency in n-3 PUFAs leads to depressive and anxiety-like symptoms.** Twenty four hours and 48 hours after the last session of stress, social interaction and open-field test were performed respectively under basal condition (control) or after CSDS protocol (defeat). Behavioral analysis encompassed (A) active social interaction with an unfamiliar adult CD1 and (B) the percentage of time spent in the center of the open-field. Dietary n-3 PUFA deficiency revealed defective social exploration and reduction of time spent in the center of the open-field that did not increase after exposure to CSDS. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

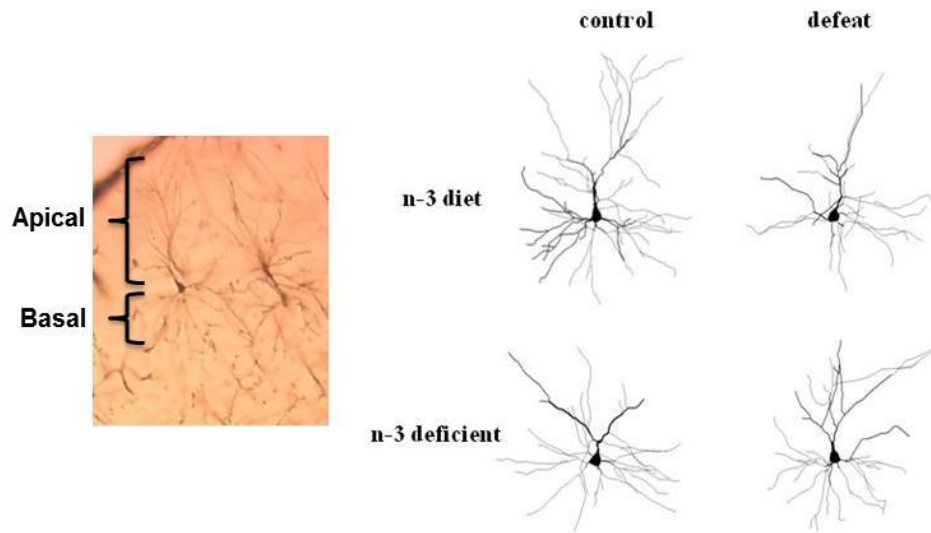
#### Plasma corticosterone is increased in n-3 deficient mice but not exacerbated by CSDS.

We further measured corticosterone level in the plasma of n-3 diet and n-3 deficient mice submitted or not to CSDS. A significant interaction (diet and stress) was revealed by a 2 way ANOVA ( $F_{1,17}=5.592$  ;  $p < 0.05$  ) (Figure 2). Corticosterone levels were significantly increased in the plasma of defeated n-3 diet mice as compared to control n-3 diet mice ( $P < 0.01$ ). Control n-3 deficient mice exhibited a significant increase in basal corticosterone level as compared to n-3 diet mice ( $P < 0.05$ ). No significant effect of CSDS on corticosterone was measured in defeated n-3 deficient mice. To sum up, corticosterone levels are increased in n-3 deficient mice but not exacerbated by CSDS.



**Figure 2: deficiency in n-3 PUFAs leads to hypercorticoesteronemia.** Mice exposure to n-3 deficient diet for one generation induced a marked elevation of plasmatic corticosterone that was not exacerbated by CSDS. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )

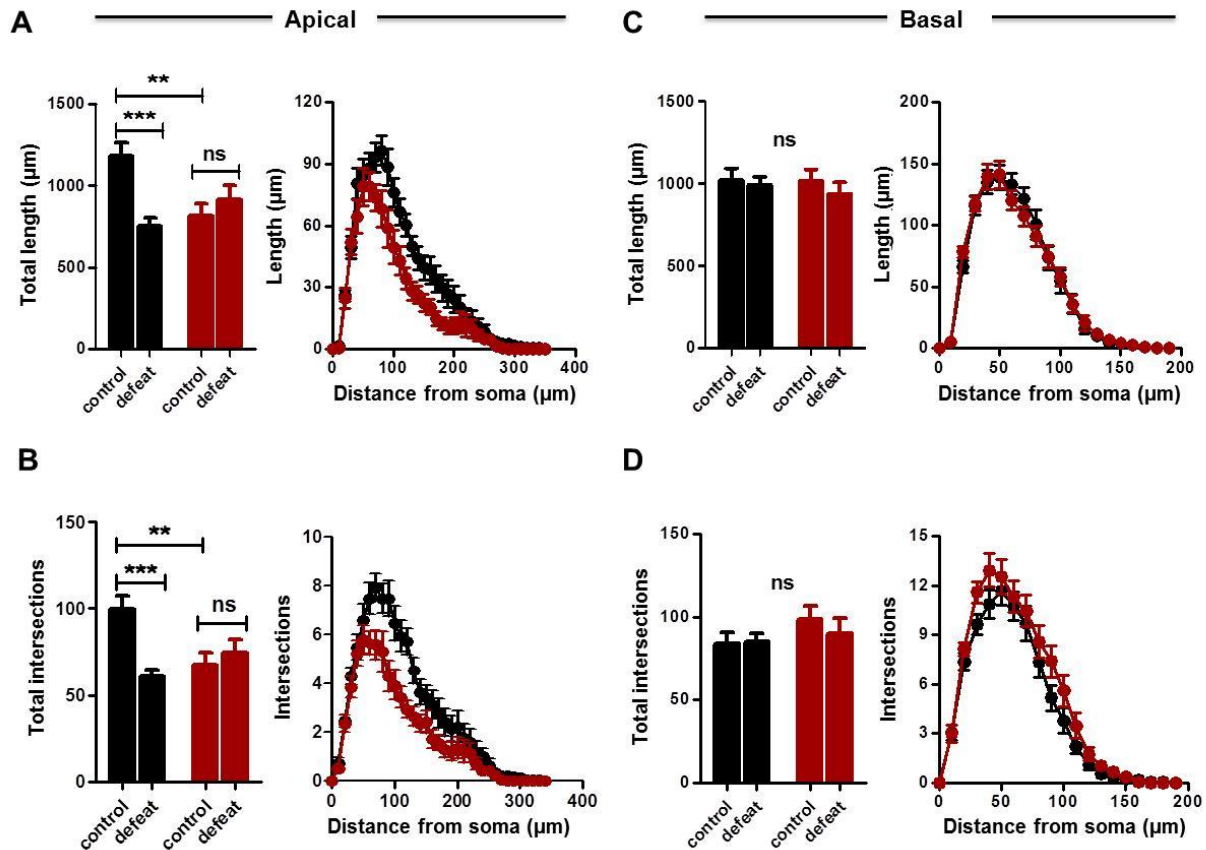
**Reduced apical arborization of layer II/III pyramidal neurons of the PFC of n-3 deficient mice was not exacerbated by CSDS.** N-3 PUFAs has been previously reported to influence neuritogenesis and synaptogenesis (Calderon and Kim, 2004; Sakamoto et al., 2007; Cao et al., 2009; He et al., 2009; Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Apical and basal arborization of pyramidal neurons were measured in medial PFC of n-3 deficient and n-3 diet mice submitted or not to CSDS (Figure 3).



**Figure 3: microphotography and representative pyramidal neurons in the PFC.** Representative microphotography (x20) of pyramidal neurons in layer II/III of the PFC with apical (top) and basal (bottom) dendrites and representative tracings by the Neurolucida software of dendritic tree of pyramidal neurons from n-3 diet and n-3 deficient mice, under basal condition (control) or following 10 days of CSDS (defeat).

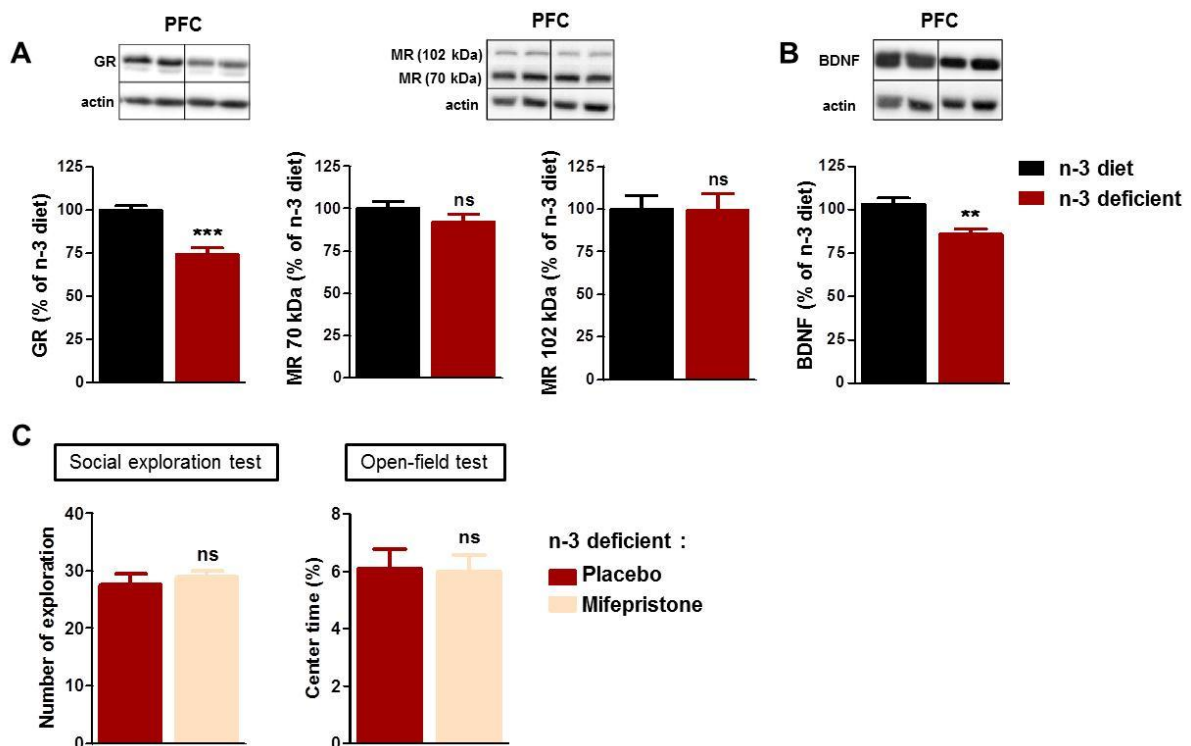
A 2 way ANOVA (diet x stress) revealed a significant effect of interaction for total intersections ( $F_{1,59} = 11.57$ ,  $p < 0.001$ ) and total length ( $F_{1,56} = 12.50$ ,  $p < 0.001$ ). Following CSDS, apical dendrites of n-3 diet mice were significantly shorter ( $P < 0.001$ ; Figure 4A) and less complex with a decreased number of intersections compared to control n-3 diet mice ( $P < 0.001$ ; Figure 4B). N-3 deficient mice exhibited neuronal atrophy with a significant reduction of apical dendrites length ( $P < 0.01$ ; Figure 4A) along with a decreased number of total intersections ( $P < 0.01$ ; Figure 4B) as compared to n-3 diet mice. However, total length and intersections of neuronal dendrites in control n-3 deficient mice were similar to the ones observed in defeated n-3 deficient mice. Sholl analysis was used to determine the region of the apical dendritic arborization at which the reduction in length or intersections occurred. A 2 way ANOVA (diet x distance from soma) revealed a significant interaction for length ( $F_{35,945} = 2.268$ ,  $p < 0.001$ ) and intersection ( $F_{34,986} = 2.928$ ,  $p < 0.001$ ). This analysis revealed that relative to control n-3 diet mice, control n-3 deficient mice exhibited a decrease of dendritic material only at the 80-120 $\mu$ m segment of the dendritic tree for length (Length:  $p < 0.05$ ; Figure 4A right panel) and at the 70-120 $\mu$ m segment of the dendritic tree for intersection (Intersection:  $p < 0.01$ ; Figure 4B right panel). No significant difference in Sholl analysis for both dendritic length and dendritic intersections was revealed in basal arborization of

pyramidal neurons within the PFC (Figure 4C, D right panel). To sum up, n-3 deficient mice exhibit neuronal morphology atrophy within the PFC observable specifically in the apical region that is not potentiated by CSDS.



**Figure 4: deficiency in n-3 PUFAs leads to dendritic arborization atrophy in pyramidal neurons of the PFC.** Morphological analysis of pyramidal neurons in the PFC of n-3 diet and n-3 deficient mice, under basal condition (control) or following 10 days of CSDS (defeat). (A) Analysis of apical dendritic length ( $\mu\text{m}$ ) and (B) number of apical dendritic intersections of pyramidal neurons was performed on total dendritic tree (left panel) and through Sholl analysis of  $10\mu\text{m}$  concentric rings from the soma (right panel). Analysis of basal (C) dendritic length and (D) dendritic intersections performed on total dendritic tree (left panel) and through Sholl analysis of  $10\mu\text{m}$  concentric rings from the soma (right panel). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

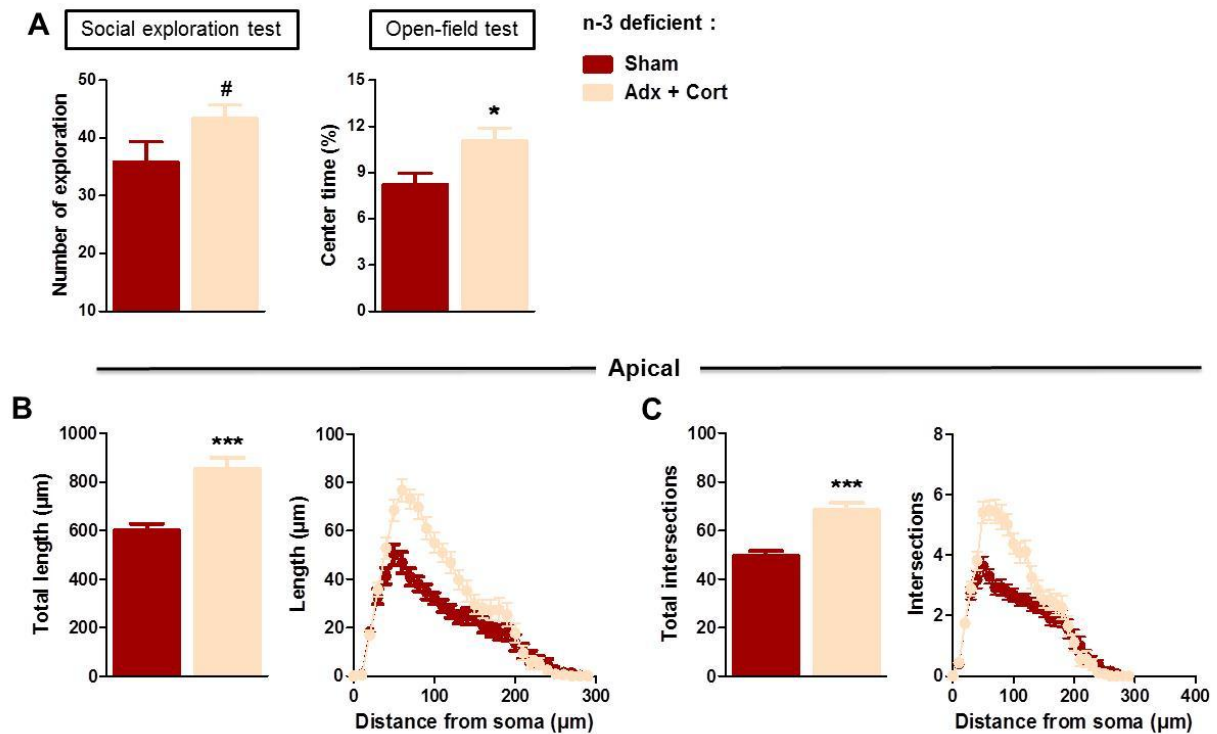
**GR expression is down-regulated in the PFC of n-3 deficient mice.** Since corticosterone was elevated in n-3 deficient mice, we further examined the expression of corticosterone receptors (GR and MR) as well as the GR-target BDNF (brain-derived neurotrophic factor) in the PFC and the hippocampus (HC) of these mice. Mice fed with the n-3 deficient diet displayed decreased GR expression in the PFC ( $t_{11} = 5.659$ ,  $p < 0.0001$ ; Figure 5A) but not in HC (see supplementary data) as compared to n-3 diet mice. No significant effect of the diet was revealed in both 70 kDa and 102 kDa MR expressions in the PFC (Figure 5) and HC (see supplementary data). BDNF expression was significantly reduced in the PFC of n-3 deficient mice as compared to n-3 diet mice ( $t_{10} = 3.671$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 5B), but not in the HC (see supplementary data). To further investigate the role of GR in emotional behavior, the GR antagonist Mifepristone was chronically administrated to mice. A 21 days treatment with Mifepristone significantly decreases social behavior (number of social exploration  $p < 0.001$ ) and anxiety-like behavior (time spent in the center of the openfield  $p < 0.01$ ) in C57BL6/J mice as compared to their respective placebo group (see supplementary data). No significant effect of mifepristone on social and anxiety-like behavior in n-3 deficient mice was measured (Figure 5C). To sum up, chronic administration of Mifepristone increased anxiety-like behavior in control mice, but not in n-3 deficient mice with decreased GR expression in the PFC.



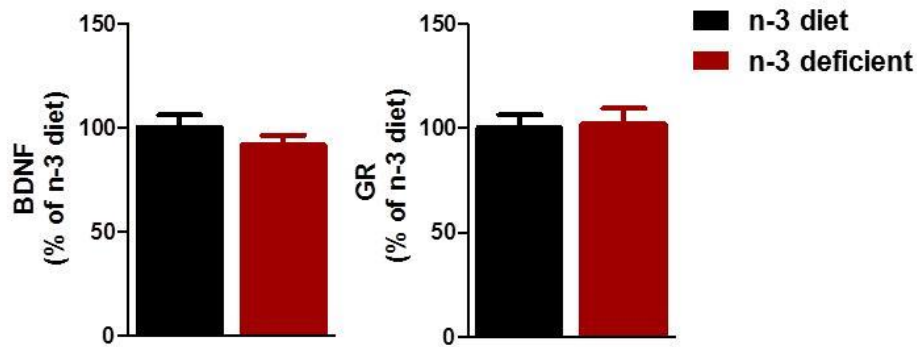
**Figure 5: characterization of the HPA axis following n-3 deficient diet.** Mice exposure to n-3 deficient diet for one generation induced (A) a marked downregulation of GR within the PFC as compared to n-3 diet mice. There was no effect of n-3 deficient diet on either the 70 kDa MR band and the 102 kDa MR band within the PFC. N-3 deficient diet induced (B) a GR-dependent target BDNF down-regulation. (C) Social exploration and percentage of time spent in the center of the open-field were evaluated following 21 days of mifepristone or placebo treatment. N-3 deficient mice were insensitive to Mifepristone treatment in both social exploration and open-field test. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Behavioral and neuronal alterations are improved in n-3 deficient mice with normalized corticosterone level.** Since corticosterone levels were increased in the plasma and GR decreased in the PFC of n-3 deficient mice, we further investigated whether corticosterone elevation is involved in emotional behavior and dendritic arborization alterations. For this purpose, adrenalectomized n-3 deficient mice received corticosterone (25  $\mu$ g/ml in 0.9% saline) through drinking water (Adx+Cort) for 4 weeks. This intervention has previously been used to both lower and normalize corticosterone levels following stress (Tanapat et al., 2001; Stranahan et al., 2008). Emotional behavior (social exploration and open-field tests) and neuronal dendritic arborization were then analyzed. Adx+Cort n-3 deficient mice trended to display increased number of exploration as compared to sham-operated n-3 deficient mice ( $t_{13} = 1.855$ ,  $p < 0.09$ ; Figure 6A, left panel). The percentage of time spent in the center of the open-field was significantly increased in Adx+Cort n-3 deficient mice as compared to sham-operated mice ( $t_{11} = 2.599$ ,  $p < 0.05$ ; Figure 6A, right panel).

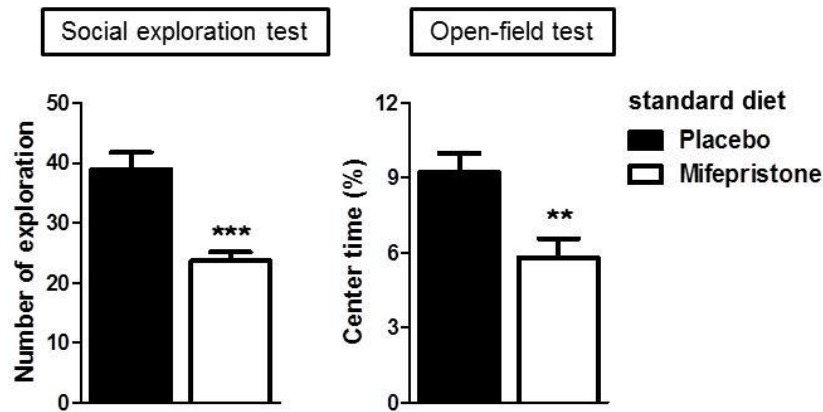
Total length ( $t_{58} = 4.747$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 6B) and total intersections ( $t_{52} = 5.287$ ,  $p < 0.001$ ) of neuronal arborization was significantly increased in the PFC of Adx+Cort as compared to Sham mice (Figure 6C). A 2 way ANOVA (diet x distance from soma) revealed a significant interaction for length ( $F_{60,1740} = 7.763$ ,  $p < 0.0001$ ) and intersections ( $F_{52,1508} = 7.223$ ,  $p < 0.0001$ ). Relative to Sham, Adx+Cort mice exhibited an increase of dendritic material only at the 50-120 $\mu$ m segment of the dendritic tree for length (Length:  $p < 0.001$ ; Figure 6B right) and for intersections (Intersections:  $p < 0.001$ ; Figure 6C right). In summary, emotional behavior and dendritic arborization were improved in n-3 deficient mice with lowered corticosterone levels as compared to Sham n-3 deficient mice.



**Figure 6: normalizing corticosterone levels prevent depressive- and anxiety-like symptoms as well as dendritic atrophy in n-3 deficient mice.** (A) Social exploration and percentage of time spent in the center of the open-field were evaluated following 4 weeks of corticosterone or vehicle in the drinking water in adrenalectomized n-3 deficient mice. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\* $p < 0.05$ ; # $p < 0.09$ ). Morphological analysis of pyramidal neurons in the PFC in adrenalectomized n-3 deficient mice. (B) Total apical dendritic length ( $\mu\text{m}$ ) analysis (left panel) and Sholl analysis of 10 $\mu\text{m}$  concentric rings from the soma (right panel). (C) Total apical dendritic intersections of pyramidal neurons (left panel) and Sholl analysis of 10 $\mu\text{m}$  concentric rings from the soma (right panel). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\*\*\* $p < 0.001$ ).



**Supplemental data:** There was no effect of n-3 deficient diet on both BDNF and GR expression in the hippocampus of n-3 deficient diet as compared to n-3 diet mice.



**Supplemental data:** chronic Mifepristone treatment induced defective social exploration and reduced the percentage of time spent in the center of the open-field in C57BL6/J. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m. (\*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

## DISCUSSION

In the present study, we found that mice fed with n-3 deficient diet displayed a higher level of corticosterone along with a decreased GR and BDNF expression, neuronal arborization atrophy in the PFC and social interaction and anxiety-like behavior impairment. Importantly, we further demonstrated that corticosterone elevation in n-3 deficient mice is involved in the n-3 deficiency-induced emotional behavior impairment and dendritic arborization atrophy.

We first found that n-3 deficient mice exhibited defective social exploration as well as anxiety-like behavior measured in the open-field test in steady-state conditions as previously shown in our group (Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). This is consistent with other reports showing that dietary n-3 deficiency induces the development of depressive-and anxiety-like behaviors in both rats and mice (Carrie et al., 2000; Takeuchi et al., 2003; DeMar et al., 2006; Lafourcade et al., 2011). In this work we further show that following CSDS, n-3 diet mice displayed defective social behavior and increased anxiety-like behavior revealed by decreased time spent in the center of the open field. CSDS has been previously shown to increase depressive-and anxiety-like behaviors in mice and rats (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Christoffel et al., 2011). Our data also suggest that n-3 diet does not protect mice from the aversive effects of CSDS. This is consistent with another study showing that rats fed with an adequate diet display emotional behavior alterations measured in the open-field and elevated plus maze test following chronic restraint stress (Hennebelle et al., 2012). Surprisingly, CSDS did not additionally impair social interaction and anxiety-like behavior of n-3 deficient mice. Indeed, rodents fed with n-3 deficient diet exhibit increased vulnerability to stress (Takeuchi et al., 2003; Haurama et al., 2011). In n-3 diet mice, CSDS produced an expected elevation of corticosterone levels as previously shown in rodents fed with a standard chow (Chen et al., 2012). N-3 deficient mice had higher levels (70%) of corticosterone compared to n-3 diet mice and these levels were not additionally increased by CSDS. In the present study corticosterone measurement was performed when corticosterone levels were high, during the light period, closed to the corticosterone peak. To further depict that n-3 deficient mice display HPA axis hyperactivity, the circadian cycle of corticosterone must be examined. However, higher levels of corticosterone in light period have been associated to the impairment of HPA axis in mice (Richard et al., 2010; Godavarthi et al., 2012). The idea that HPA axis is impaired in n-3 deficient mice is further reinforced by the observation that GR, but not MR expression is decreased in the CPF of n-3 deficient mice. Corticosterone increase

and GR decrease in the PFC could account for the impairment of emotional behavior in n-3 deficient mice (Chiba et al., 2012). Indeed, downregulation of GR protein and mRNA expression have been reported after chronic stress-induced emotional alterations in both PFC (Chiba et al., 2012) and HC (Wright et al., 2006; Hageman et al., 2009) in rodents. Such a decrease of GR expression in the brain has been associated to high corticosterone levels (Godavarthi et al., 2012) as previous studies have shown that corticosterone regulate GR expression in the PFC. Indeed, adrenalectomy-induced up-regulation of GR expression in the PFC of rats is down-regulated by one-week corticosterone administration (Meaney and Aitken, 1985). In addition, transgenic mice with decreased GR expression in the brain (50%) or GR co-activator Ube3a knockout mice display depression-and anxiety-like behaviors (Ridder et al., 2005; Godavarthi et al., 2012). Consistent with this observation, GR antagonist Mifepristone decreased social exploration and increased anxiety-like behavior C57BL6/J. Interestingly, n-3 deficient mice treated with mifepristone did not exhibit further emotional alteration. The lack of effect of mifepristone in n-3 deficient mice could be due to the decreased GR expression and activity in the PFC of these mice. In support of this idea BDNF, a GR-targeted gene, is down-regulated in the PFC of n-3 deficient mice. Our results are in line of those obtained in rats deprived of n-3 PUFAs for 15 weeks (Rao et al., 2007). Moreover, BDNF expression is decreased in the HC and PFC of rodents after stress exposure (Calabrèse et al., 2009; Taliaz et al., 2011). Recent data elegantly linked BDNF and HPA axis hyperactivity by using knock-in mice for BDNF(met) polymorphism originally identified in depressed patients (Wichers et al., 2008; Yu et al., 2012).

We further found a reduction of dendritic arborization in the PFC of n-3 deficient and defeated n-3 diet mice. Importantly, pyramidal neurons atrophy observed in control n-3 deficient mice were not exacerbated after CSDS, suggesting that CSDS and dietary n-3 deficiency could share common mechanisms leading to neuronal remodeling within the PFC. Previous studies have shown that chronic stress reduces apical but not basal dendritic arborization complexity of pyramidal neurons in layer II/III of the PFC (Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004; Brown et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Liston et al., 2006; Radley et al., 2006; Dias-Ferreira et al., 2009; Eiland et al., 2011; Hill et al., 2011). BDNF has a crucial role in neuronal plasticity, including axonal growth, neurites maturation and neuronal activity and has been postulated to be a key mediator of stress-induced neural atrophy in the HC and CPF (Autry and Monteggia, 2012). Whether decreased expression of BDNF in the PFC is involved in dendritic atrophy in n-3 deficient mice remains to be

determined. Previous studies have shown that high level of corticosterone alters neuronal plasticity in the PFC (Wellman, 2001; Liu and Aghajanian, 2008) which might in part account for the stress-associated emotional behavior deficits (Carpenter and Bunney, 1971; Carroll et al., 1976; Nemeroff et al., 1984; Holsboer and Barden, 1996; Holsboer, 2000; Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004; Brown et al., 2005; Liston et al., 2006). We investigated the role of corticosterone in dendritic arborization atrophy and behavioral impairment of n-3 deficient mice. Lowering corticosterone level improved emotional behavior alteration by increasing the number of active social exploration and the percentage of time spent in the center of the open-field. These findings are consistent with previous studies showing that lowering corticosterone improves behavioral impairment in db/db mice (Stranahan et al., 2008). We further showed that reducing corticosterone levels in n-3 deficient mice improves pyramidal neurons arborization atrophy within the PFC. As previously described, dendritic pyramidal neurons atrophy induced by chronic stress is abolished by glucocorticoid receptor antagonism mifepristone (RU-486) (Liu and Aghajanian, 2008). However, how the dietary n-3 deficiency up-regulates corticosterone levels has yet to be determined and requires further investigation.

In conclusion, we provide evidence that corticosterone elevation is an important mediator of n-3 deficiency-induced dendritic arborization atrophy in the PFC and emotional behavior alterations. Further, these data present n-3 PUFAs as a potential target in the treatment of neuropsychiatric disorders, especially in subjects presenting abnormal changes in cell membranes fatty acids composition.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by INRA and the Region Aquitaine. The authors thank P. BIRAC, C. TRIDON, and M. CADET for taking care of the mice.

## REFERENCES

- Adams PB, Lawson S, Sanigorski A, Sinclair AJ (1996) Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 31 Suppl:S157-161.
- Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64:238-258.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005) Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1714-1722.
- Calderon F, Kim HY (2004) Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 90:979-988.
- Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun SB, Lovinger D, Kim HY (2009) Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 111:510-521.
- Carpenter WT, Jr., Bunney WE, Jr. (1971) Adrenal cortical activity in depressive illness. *Am J Psychiatry* 128:31-40.
- Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM (2000) Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* 41:473-480.
- Carroll BJ, Curtis GC, Mendels J (1976) Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol Med* 6:235-244.
- Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39:112-119.
- Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF, Krishnan V, Reyes CM, Han MH, Ables JL, Eisch AJ, Dietz DM, Ferguson D, Neve RL, Greengard P, Kim Y, Morrison JH, Russo SJ (2011) IkappaB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci* 31:314-321.

- Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60:236-248.
- Cotter D, Hudson L, Landau S (2005) Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar Disord* 7:358-369.
- DeMar JC, Jr., Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI (2006) One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 47:172-180.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N (2009) Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325:621-625.
- Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS (2011) Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*.
- Favreliere S, Barrier L, Durand G, Chalon S, Tallineau C (1998) Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmamylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum. *Lipids* 33:401-407.
- Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, Andersen ML, Tufik S, Lima MM (2011) Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res* 219:116-122.
- Frances H, Monier C, Bourre JM (1995) Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. *Life Sci* 57:1935-1947.
- Godavarthi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR (2012) Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 21:1824-1834.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12:3642-3650.
- Green P, Hermesh H, Monselise A, Marom S, Presburger G, Weizman A (2006) Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:107-113.
- Hageman I, Nielsen M, Wortwein G, Diemer NH, Jorgensen MB (2009) Electroconvulsive stimulations normalizes stress-induced changes in the glucocorticoid receptor and behaviour. *Behav Brain Res* 196:71-77.
- He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX (2009) Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11370-11375.

- Hibbeln JR (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet* 351:1213.
- Hibbeln JR (2002) Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. *J Affect Disord* 69:15-29.
- Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS (2011) Alterations in Corticolimbic Dendritic Morphology and Emotional Behavior in Cannabinoid CB1 Receptor-Deficient Mice Parallel the Effects of Chronic Stress. *Cereb Cortex*.
- Hirschfeld RM (2001) The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 3:244-254.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501.
- Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17:187-205.
- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006) Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* 26:5733-5738.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391-404.
- Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Gregoire S, Bretillon L, Laye S (2012) Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7:e36861.
- Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Laye S, Manzoni OJ (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14:345-350.
- Larrieu T, Madore C, Joffre C, Laye S (2012) Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. *J Physiol Biochem*.
- Levant B, Ozias MK, Davis PF, Winter M, Russell KL, Carlson SE, Reed GA, McCarron KE (2008) Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: Interactions with reproductive status in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:1279-1292.

- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS (2006) Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci* 26:7870-7874.
- Liu RJ, Aghajanian GK (2008) Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:359-364.
- Maes M, Smith R, Christophe A, Cosyns P, Desnyder R, Meltzer H (1996) Fatty acid composition in major depression: decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20: 4 omega 6/C20:5 omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *J Affect Disord* 38:35-46.
- Marszalek JR, Lodish HF (2005) Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:633-657.
- McNamara RK, Carlson SE (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:329-349.
- McNamara RK, Liu Y (2011) Reduced expression of fatty acid biosynthesis genes in the prefrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 129:359-363.
- McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Dwivedi Y, Pandey GN (2010) Selective deficits in erythrocyte docosahexaenoic acid composition in adult patients with bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord* 126:303-311.
- McNamara RK, Hahn CG, Jandacek R, Rider T, Tso P, Stanford KE, Richtand NM (2007) Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 62:17-24.
- Meaney MJ, Aitken DH (1985) [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 328:176-180.
- Mingam R, Moranis A, Bluth RM, De Smedt-Peyrusse V, Kelley KW, Guesnet P, Lavialle M, Dantzer R, Laye S (2008) Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 28:1877-1886.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342-1344.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.

- Otto SJ, de Groot RH, Hornstra G (2003) Increased risk of postpartum depressive symptoms is associated with slower normalization after pregnancy of the functional docosahexaenoic acid status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:237-243.
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 43:315-319.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125:1-6.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2006) Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16:313-320.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD (2001) Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49:741-752.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Dubey P, Stockmeier CA, Krishnan KR (2005) Prominent reduction in pyramidal neurons density in the orbitofrontal cortex of elderly depressed patients. *Biol Psychiatry* 58:297-306.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45:1085-1098.
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Jr., Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP (2007) n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 12:36-46.
- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649-659.
- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25:6243-6250.
- Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ (2007) Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 1182:50-59.
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925-935.
- Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176.

- Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486:219-231.
- Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E (2003) Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res* 964:136-143.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.
- Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Kiliaan AJ, Breteler MM (2003) Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 78:40-46.
- Van Otterloo E, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Steffens DC, Krishnan RR, Rajkowska G (2009) Reductions in neuronal density in elderly depressed are region specific. *Int J Geriatr Psychiatry* 24:856-864.
- Wellman CL (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 49:245-253.
- Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD (2006) Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci* 24:595-605.
- Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70:304-322.

---

# Discussion générale

---

## VIII. DISCUSSION GENERALE

Nos résultats montrent que la consommation d'une diète carencée en AGPI n-3 provoque la diminution de DHA et l'augmentation de DPA n-6 et d'AA dans le CPF et le développement d'altérations du comportement émotionnel. Ces résultats obtenus chez la souris corroborent d'autres données de la littérature obtenues chez le rat (Carrie et al., 2000b; Takeuchi et al., 2003; DeMar et al., 2006). Le rôle des AGPI dans l'étiologie de la dépression est renforcé par leurs interactions avec les mécanismes physiopathologiques de cette pathologie. Ainsi un régime déficient en AGPI n-3 réduit l'expression de BDNF dépendamment de la voie p38-MAPK (Rao et al., 2007b). De plus, l'altération de certains systèmes de neurotransmission comme le système monoaminergique chez le rongeur a également été décrite (Chalon, 2006). Nos résultats apportent de nouvelles données dans la compréhension des mécanismes d'action liant la diminution de DHA dans le cerveau et le développement de troubles comportementaux : la plasticité synaptique dépendante du système eCB, l'axe HPA ainsi que le processus d'arborisation dendritique dans le CPF, précédemment décrits comme mécanismes physiopathologiques de la dépression et de l'anxiété.

### **1) Modulation des comportements émotionnels et du système eCB par des apports alimentaires déficients en AGPI n-3 (article 1/2)**

Nous avons dans un premier temps évalué les conséquences d'un régime déficient en AGPI n-3 sur le statut lipidique dans le CPF. La déficience en AGPI n-3 pendant une génération entraîne une réduction importante de DHA (~40%) dans toutes les classes confondues de phospholipides du CPF. Cette réduction est compensée par une incorporation massive de DPA n-6 (900%) dans le CPF de souris déficientes en AGPI n-3. Le DPA n-6 (C22), issu du métabolisme du LA compense la diminution de DHA (Galli et al., 1970; Greiner et al., 2003). Une seule étude a montré l'effet du DPA n-6 sur des processus de mémorisation chez le rat (Lim et al., 2005). Les rongeurs nourris avec un régime enrichi en DPA n-6 développent des troubles de la mémoire spatiale, mesurée par le test de la piscine de Morris, par rapport à des rats équilibrés en AGPI. Cependant des études de supplémentation en DPA n-6 sont nécessaires pour évaluer les effets de ce dernier sur le comportement émotionnel. De plus, les souris nourries avec le régime déficient en AGPI n-3 présentent des niveaux d'AA élevés (10%) dans le CPF par rapport aux animaux équilibrés en AGPI n-3. L'impact de régime déficient en AGPI n-3 sur le statut lipidique cérébral est largement documenté. Ainsi, la consommation de diètes pauvres en précurseurs ALA et riches en LA réduit le DHA et

augmente le DPA n-6 et l'AA dans les PLs membranaires de l'ensemble des structures cérébrales (Delion et al., 1994; Guesnet et al., 1997; Carrie et al., 200b). L'incorporation des AGPI dans le cerveau a lieu essentiellement pendant la période périnatale : Le DHA est fourni au fœtus par l'intermédiaire du placenta puis au nouveau-né par le lait maternel. C'est donc l'alimentation de la mère qui influence l'incorporation de DHA pendant la période périnatale (Innis, 2004, 2005). Ainsi, l'exposition à une diète carencée en AGPI n-3 dès la gestation provoque une diminution du DHA dans le cerveau de la descendance adulte de près de 40% contre 27% lorsque le régime est appliqué après le sevrage (Rao et al., 2007; Kim et al., 2011). En revanche une déficience en AGPI n-3 sur deux générations entraîne des réductions drastiques de DHA dans le cerveau de l'ordre de 70-80% (Morigushi et al., 2000; Greiner et al., 2001; Catalan et al., 2002) ce qui pourrait entraîner des processus de compensation. Enfin, le ratio AGPI n-6:n-3 dans notre modèle d'étude est de 608 alors que le ratio alimentaire dans les pays occidentaux est de l'ordre de 14, notamment en France et peut atteindre 50 dans certains pays en voie de développement comme l'Inde (Astorg et al., 2004). Etudier les effets de ratios n-6:n-3 proches de ceux consommés par l'Homme permettrait de déterminer si des diminutions de DHA moins drastiques dans le cerveau provoquent les mêmes altérations neurobiologiques.

Chez les souris déficientes, la réduction de DHA dans le CPF est accompagnée d'une altération de la plasticité synaptique dépendante du CB1R. Le système eCB, notamment le CB1R joue un rôle central dans les phénomènes de plasticité synaptique à long terme, en particulier une diminution de la force synaptique ou dépression à long terme (LTD). La LTD dépendante de CB1R est inhibée dans les synapses du CPF et du NAc des souris déficientes en AGPI n-3. De plus, si la densité des récepteurs CB1 n'est pas affectée chez les souris déficientes en AGPI n-3, les CB1R sont désensibilisés. Bien que les niveaux de 2-AG et d'AEA dans le CPF ne varient pas dans les groupes, les CB1R pourraient être partiellement occupés par les eCB, dont les niveaux seraient augmentés dans les synapses. Malheureusement, la sensibilité des approches méthodologiques (western blot sur homogénats de CPF et électrophysiologie sur tranche de CPF) pour mesurer les eCB ne permet pas de les doser au niveau synaptique et de vérifier cette hypothèse. D'autres études indiquent que la carence alimentaire en AGPI n-3 modifie les niveaux d'eCB dans le cerveau (Berger et al., 2001; Watanabe et al., 2003). Ainsi, des régimes riches en LA induisent une augmentation des niveaux de d'AEA et de 2-AG dans le cerveau de porcelets et de souris. L'augmentation d'AA, qui est le précurseur métabolique des eCB pourrait être responsable de l'augmentation

de production de ces derniers au niveau synaptique. Toutefois son augmentation dans les synaptosomes reste à mettre en évidence. L'AA est libéré des PLs membranaires par l'action de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2), une enzyme activée par l'activité synaptique et l'augmentation des concentrations de Ca<sup>2+</sup> cytosolique. La cPLA2 est transloquée du cytosol vers les membranes neuronales (Lombardi et al., 1996; Ito et al., 2001). Chez le rat, la déficience en AGPI n-3 provoque une augmentation de l'activité de la cPLA2 responsable de la libération de l'AA (Rao et al., 2007). L'augmentation de l'activité de la cPLA2 dans les synapses des neurones du CPF pourrait rendre compte de l'augmentation des niveaux d'eCB observée près des synapses, mais ce point reste à démontrer, en inhibant l'activité de cette enzyme au niveau synaptique. De plus, l'activation pharmacologique des enzymes responsables de la dégradation des eCB (le MGL (monoacylglycerol lipase) pour le 2-AG ou le FAAH (fatty acid amide hydrolase) pour l'AEA) pourrait nous permettre d'identifier la nature des eCB impliqués dans l'altération de la LTD dans le CPF de souris déficientes en AGPI n-3. Enfin, augmenter les niveaux d'eCB par des approches pharmacologiques nous permettrait de déterminer si l'élévation d'eCB dans le cerveau est suffisante et nécessaire pour altérer la LTD-eCB chez des animaux équilibrés en AGPI n-3. Ainsi, l'application d'inhibiteurs de la dégradation du 2-AG ou de l'AEA dans la chambre de perfusion électrophysiologique pourrait altérer la LTD-eCB en augmentant l'activité des eCB dans les synapses du CPF. L'administration chronique d'agonistes des récepteurs CB ( $\Delta^9$ -THC) à des rongeurs provoque la désensibilisation des récepteurs CB1 par le découplage de ce dernier à la protéine Gi/o (Sim et al., 1996; Romero et al., 1997; Breivogel et al., 1999). En effet, l'administration chronique de  $\Delta^9$ -THC à des rats empêche le WIN55,212-2 de stimuler le couplage récepteur/protéine G dans le cortex (Sim et al., 1996). Le découplage du récepteur CB1 et de sa protéine Gi/o est associé à un défaut de LTD dépendante de CB1R dans le NAc et l'HC (Mato et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des niveaux d'eCB observée proche des synapses chez les souris déficientes en AGPI n-3 empêche le couplage CB1R/protéine Gi/o et altère la LTD. Si l'altération de la potentialisation à long terme (LTP) a été documentée dans l'HC de rats soumis à un régime déficient en AGPI n-3, aucune étude n'avait encore révélé un défaut de LTD dépendante du système eCB.

La déficience en AGPI n-3 et l'altération du système eCB sont impliqués dans les comportements émotionnels (Carrie et al., 2000b; Takeuchi et al., 2003; DeMar et al., 2006; Fedorova and Salem, 2006; Lavialle et al., 2010; Laye, 2010). Nos résultats viennent confirmer ces études. Les souris déficientes en AGPI n-3 développent des comportements de

type anxieux mesurés par une diminution du temps passé au centre d'un openfield. Ces souris développent également des comportements de type dépressif traduits par une augmentation du temps d'immobilité dans le FST. Ce comportement de type dépressif est amélioré lorsque les animaux déficients en AGPI n-3 reçoivent une injection d'antidépresseur Imipramine diminuant ainsi les temps d'immobilité. Le comportement observé chez les animaux déficients en AGPI n-3 après l'administration de l'inhibiteur de recapture présynaptique de la sérotonine, Imipramine suggère que le système sérotoninergique est altéré chez ces souris. La concentration de sérotonine augmente dans la fente synaptique par l'action de l'Imipramine. L'élévation de ces neurotransmetteurs entraîne une réduction de la densité des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> à la sérotonine. Cette diminution du nombre de récepteurs, qui sont augmentés chez les dépressifs, intervient 4 à 6 semaines après le traitement. L'appauvrissement d'apport alimentaire en AGPI n-3 perturbe les systèmes de neurotransmission monoaminergiques (dopamine et sérotonine) (Delion et al., 1994; Delion et al., 1996; Zimmer et al., 1998; Zimmer et al., 1999; Zimmer et al., 2000a; Zimmer et al., 2000b; Chalon et al., 2001; Zimmer et al., 2002; Kuperstein et al., 2005). Si la libération de dopamine nouvellement synthétisée n'est pas différente entre les groupes de rats déficients ou équilibrés en AGPI n-3 (Zimmer et al., 1998), celle de dopamine issue du pool de réserve vésiculaire est diminuée dans le CPF et le NAc de rats déficients en AGPI n-3 (Zimmer et al., 1998; Zimmer et al., 2000a). De plus, la densité des récepteurs sérotonine-2 (5-HT<sub>2</sub>) est plus importante dans le CPF de rats nourris avec un régime déficient en AGPI n-3 par rapport aux rats témoins. Cependant, l'altération de la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique peut être améliorée par un régime équilibré en AGPI n-3 (Kodas et al., 2002; Kodas et al., 2004). Les AGPI n-3 comme les antidépresseurs modulent les systèmes de neurotransmission monoaminergiques. Ceci pourrait expliquer que la supplémentation en AGPI n-3 associée à un traitement antidépresseurs, inhibiteurs de la recapture présynaptique de la sérotonine (Imipramine ou Fluoxétine) est plus efficace dans le traitement de la dépression majeure chez l'Homme (Nemets et al., 2002; Peet and Horrobin, 2002; Su et al., 2003; Jazayeri et al., 2008).

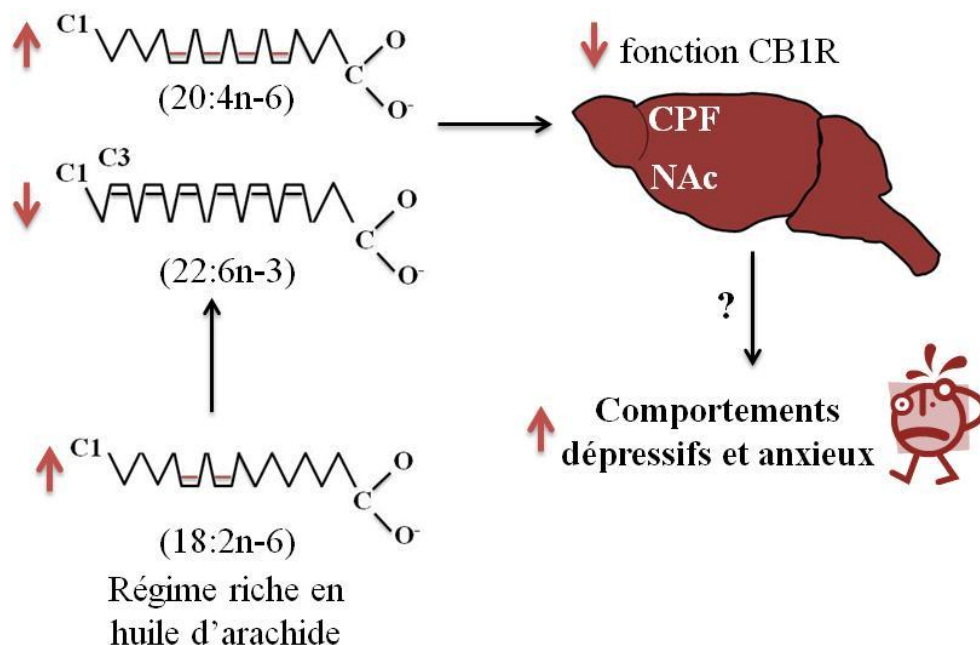
Le système eCB joue un rôle dans le développement de comportements dépressifs et anxieux (Vinod and Hungund, 2006; Leweke and Koethe, 2008; Moreira and Lutz, 2008; Hill and Gorzalka, 2009; Moreira and Wotjak, 2010; Hill et al., 2011a). Bambico et collaborateurs ont démontré que l'administration de WIN55,212-2 dans le CPF provoque des effets antidépresseurs chez la souris *via* l'activation des neurones 5-HT dans le noyau du raphé (Bambico et al., 2007). L'effet antidépresseur du WIN55,212-2 est dépendant de CB1R

puisque l'injection de Rimonabant bloque l'effet comportemental du WIN55,212-2. De plus, l'exposition à un stress aigu chez le rongeur diminue les taux d'AEA dans le CPF alors que l'administration d'un inhibiteur de l'hydrolyse de l'AEA dans le CPF augmente l'activité des neurones 5-HT dans le noyau du raphé (McLaughlin et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'activation de CB1R au niveau du CPF pendant un stress réduit les comportements de type dépressifs en agissant sur le système sérotoninergique. De plus, le temps d'immobilité dans le FST chez des souris knock-out pour le gène codant CB1R augmente par rapport aux souris sauvages (Steiner et al., 2008). L'administration de  $\Delta^9$ -THC (Rubino et al., 2008b) ou d'inhibiteur de la FAAH (Rubino et al., 2008a) dans le CPF provoque des effets anxiolytiques mesurés en EPM. A l'opposé, la surexpression de FAAH dans le CPF de rats entraîne une diminution des niveaux d'AEA dans cette région associée à une augmentation des comportements de type anxieux évalués en EPM (Rubino et al., 2008a). Ces résultats suggèrent un rôle crucial de CB1R et de l'AEA dans la régulation des comportements de type anxieux chez le rongeur. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'altération de la LTD dépendante du système eCB au niveau du CPF pourrait être impliquée dans les déficits comportementaux induits par un régime alimentaire déficient en AGPI n-3.

Sachant que le régime déficient en AGPI n-3 chez la souris altère le système eCB dans le cerveau (Lafourcade et al., 2011), nous avons cherché à déterminer si les voies de signalisation en aval des récepteurs cannabinoïdes étaient aussi altérées. A cette fin, la voie des MAPK a été étudiée 15 minutes après l'administration périphérique de l'agoniste des récepteurs CB WIN55,212-2, agoniste lipophile comme les eCB et capable de traverser la barrière hémato encéphalique. Le WIN55,212-2 est connu pour moduler le comportement émotionnel (Haller et al., 2007) et la voie des MAPK (Wu et al., 2011). Comme le système eCB joue un rôle central dans la régulation des comportements émotionnels, nous avons dans un premier temps évalué l'effet du WIN55,212-2 sur le comportement de type anxieux mesuré en open-field. Nos résultats montrent que chez les souris équilibrées en AGPI n-3, le traitement par le WIN55,212-2 (0.1 mg par kg) réduit le temps passé au centre de l'open-field. Les effets anxiogènes du WIN55,212-2 ne se développent pas chez les souris déficientes en AGPI n-3. Cependant, la réponse limitée à l'agoniste CB pourrait être due à un effet seuil résultant des changements comportementaux de base observés chez les souris déficientes en AGPI n-3. De plus, les effets anxiolytiques des agonistes CB1 montrent la relation complexe qu'il peut y avoir entre le système eCB et la régulation des comportements émotionnels. L'utilisation d'espèces, de souches de souris différentes (Haller et al., 2007) ou encore les

doses d'agonistes utilisées (Rey et al., 2012) pourraient expliquer les différences entre nos résultats et ceux de la littérature. Les effets du WIN55,212-2 chez le rat Wistar sont opposés à ceux observés chez la souris CD1 avec un effet anxiogénique et anxiolytique respectivement (Haller et al., 2007). Par des approches électrophysiologiques, cette étude montre que les courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) dans l'HC sont plus sensibles au WIN55,212-2 que les courants postsynaptiques excitateurs (EPSCs) chez la souris. De plus, les IPSCs dans l'HC de souris sont plus sensibles au WIN55,212-2 par rapport aux rats. Les auteurs de cette étude suggèrent que le WIN55,212-2 réduit l'anxiété chez les souris en modulant la neurotransmission GABAergique alors qu'il augmente l'anxiété chez le rat par des mécanismes glutamatergiques. Une récente étude a révélé qu'un même agoniste des récepteurs CB (CP-55,940) peut induire des effets opposés sur les comportements de type anxieux chez la souris (Rey et al., 2012). Ainsi, une dose de 1µg/kg produit des effets anxiolytiques alors qu'une dose de 50µg/kg produit des effets anxiogéniques mesurés en EPM. Ces auteurs ont montré que les effets anxiolytiques de l'agoniste passent par les CB1R des neurones glutamatergiques corticaux car les effets de l'agoniste sont inhibés chez des souris knock-out pour le gène codant CB1R dans ces neurones. A l'opposé, les CB1R localisés sur les neurones GABAergiques sont nécessaires pour induire les effets anxiogéniques de l'agoniste car ses effets sont spécifiquement inhibés chez les souris knock-out pour le gène codant CB1R dans ces neurones. Bien qu'il ait été clairement démontré que le système eCB est impliqué dans la régulation des comportements de type anxieux, ces études révèlent la difficulté de définir le rôle exact de la signalisation eCB dans ces effets comportementaux. Dans nos conditions, 15 minutes après le traitement par le WIN55,212-2, les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 diminuent dans l'HC et le CPF de souris équilibrées mais pas chez les souris déficientes en AGPI n-3. De plus, l'expression de Egr1 (Early growth response protein 1), un facteur de transcription exprimé à la suite de l'activation de la voie MAPK (Bouaboula et al., 1995a) est aussi réduite dans le CPF de souris équilibrées mais pas déficientes en AGPI n-3. Puisque la voie des MAPK est altérée dans le cerveau de souris déficientes en AGPI n-3, il n'est pas surprenant que l'expression de la protéine Egr1 en aval de MAPK ne soit pas induite par le WIN55,212-2 chez ces souris. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation des MAPK, modulée par l'administration périphérique de WIN55,212-2, est altérée dans le CPF et l'HC de souris déficientes en AGPI n-3. Cependant, nos résultats sont en désaccord avec ceux de la littérature: la stimulation des CB1R par des agonistes CB ( $\Delta^9$ -THC, WIN55,212-2 et CP-55940) entraîne l'activation de la voie des MAPK *in vitro* et *in vivo* (Bouaboula et al., 1995b; Derkinderen et al., 2003). Il est

donc surprenant que la phosphorylation de ERK1/2 soit diminuée 15 minutes après l'administration du WIN55,212-2 dans le cerveau de souris équilibrées en AGPI n-3. Il est probable que la phosphorylation de ERK1/2 soit induite à des temps plus court. En effet, Bouaboula et collaborateurs rapportent dans une étude *in vitro* que l'activation de la voie des MAPK apparaît rapidement ( $\sim 1$  minute) après stimulation par un agoniste CB (Bouaboula et al., 1995b). Enfin, aucune différence de phosphorylation de ERK1/2, mesurée 30 minutes après l'administration de THC (10 mg/kg), n'est observée dans le cerveau de souris (Ozaita et al., 2007). Dans leur ensemble les données de la littérature suggèrent que l'activation de la voie des MAPK, notamment la phosphorylation de ERK1/2 par les agonistes des récepteurs CB, est temps-dépendante. Il semblerait en effet que la phosphorylation de ERK1/2 par un agoniste CB *in vitro* (methanandamide) suive une courbe en « U » inversée avec un pic de phosphorylation à 5 puis à 15 minutes post-administration suivi d'une déphosphorylation à 90 minutes (Asimaki and Mangoura, 2011). Cet effet biphasique des agonistes CB sur la phosphorylation de ERK1/2 est encore mal connu et nécessite de plus amples investigations. En conclusion, les résultats de nos deux études révèlent pour la première fois un lien entre la consommation d'AGPI n-3 et la plasticité synaptique dépendante du système eCB et des voies de signalisation associées aux récepteurs CB1.



**Figure 12 :** Synthèse des articles 1 et 2. Le régime carencé entraîne une augmentation du ratio n-6/n-3 traduit par une réduction des niveaux de 22:6n-3 et une augmentation du 20:4n-6 dans le cortex préfrontal. Ce changement de statut lipidique mène à une perturbation du système endocannabinoïde associé à des comportements de type dépressifs et anxieux.

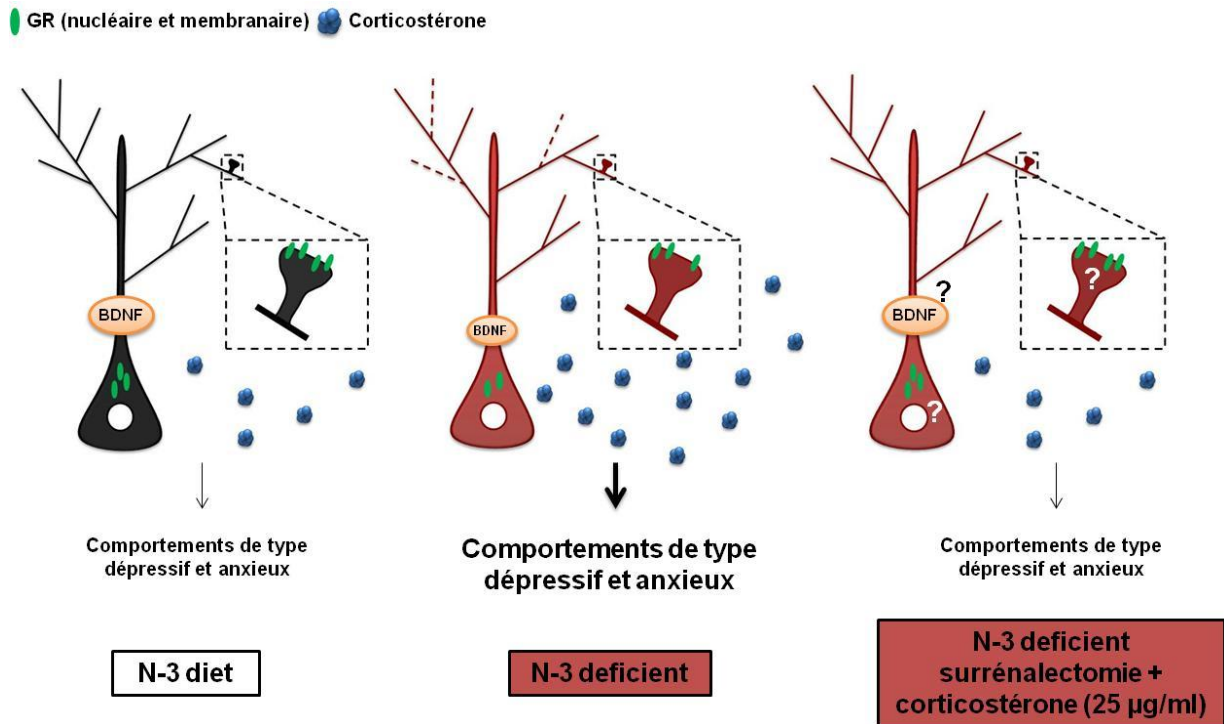
## 2) Modulation des comportements émotionnels et de l'axe HPA par des apports alimentaires déficients en AGPI n-3 (article 3)

Dans cette étude, les comportements émotionnels ont été mesurés chez les souris soumises aux régimes déficient ou équilibré en AGPI n-3 avant ou après un protocole de défaite sociale. La défaite sociale provoque des symptômes chez le rongeur qui s'apparentent à ceux observés chez les patients souffrants de troubles psychiatriques et sont restaurés par l'administration chronique d'antidépresseurs (Berton et al., 2006). Les souris équilibrées en AGPI n-3 présentent à la suite des 10 jours de défaite sociale une diminution du comportement d'exploration sociale, et une augmentation du comportement de type anxieux évalué en open-field. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant que la défaite sociale entraîne des comportements de type dépressif et anxieux chez le rongeur (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Christoffel et al., 2011; Chen et al., 2012). Des études réalisées sur des rongeurs nourris avec un régime déficient en AGPI n-3 montrent que ces rongeurs développent une plus grande vulnérabilité face à un stress (Takeuchi et al., 2003; Haurama et al., 2011). De manière surprenante, les altérations comportementales liées à la défaite sociale ne sont pas exacerbées chez les souris déficientes en AGPI n-3. Ces résultats suggèrent que la défaite sociale et la déficience en AGPI n-3 pourraient partager des mécanismes communs menant à l'altération des comportements émotionnels. La notion de vulnérabilité au stress a été décrite chez des rongeurs exposés à un stress chronique comme la défaite sociale (Krishnan et al., 2007). Ainsi, une certaine proportion de souris « vulnérables » présentent des comportements de type dépressif à la suite de la défaite sociale (~60%) alors que d'autres sont « résistantes » (~40%) et ne développent pas ces comportements. Puisque les souris carencées en AGPI n-3 présentent des caractéristiques comportementales semblables à celles de souris soumises à un stress de défaite sociale, il serait intéressant d'étudier cette vulnérabilité au stress de défaite sociale chez les souris déficientes en AGPI n-3. Le régime déficient en AGPI n-3 pourrait ainsi augmenter la proportion de souris « vulnérables » au stress de la défaite sociale par rapport au régime équilibré. Comme décrit dans la littérature chez des animaux nourris avec un régime standard (Chen et al., 2012), le stress de défaite sociale augmente les niveaux de corticostérone chez les souris équilibrées en AGPI n-3. De plus, les souris déficientes en AGPI n-3 ont des niveaux de corticostérone plasmatique augmentés (70%) par rapport aux souris équilibrées en AGPI n-3. En revanche, pour pouvoir conclure que les souris déficientes en AGPI n-3 présentent une hyperactivité de l'axe HPA, il est indispensable de mesurer le cycle circadien de la corticostérone. L'expression des GR est diminuée dans le CPF des souris

déficiences en AGPI n-3. L'augmentation des niveaux de corticostérone et la réduction d'expression des GR pourraient être impliquées dans les altérations des comportements émotionnels des souris déficientes en AGPI n-3. En effet, plusieurs auteurs rapportent une réduction de l'expression des GR dans le CPF (Chiba et al., 2012) et dans l'HC (Wright et al., 2006; Hageman et al., 2009) d'animaux soumis à un stress chronique. De plus la réduction de l'expression des GR chez la souris est associée à une élévation des niveaux de corticostérone plasmatique (Godavarthi et al., 2012). Il est probable que l'altération de l'expression des GR soit un phénomène compensatoire en réponse à des niveaux élevés de corticostérone. En effet, il a été décrit que la corticostérone régule l'expression des GR dans le CPF (Meaney and Aitken, 1985). Ainsi, une surrénalectomie augmente, alors que l'administration de corticostérone diminue l'expression des GR dans le CPF de rats. Par ailleurs, l'implication des GR dans la régulation des comportements émotionnels a été mise en évidence par des approches de transgénèse. De fait, des souris transgéniques présentant une réduction d'expression des GR développent des comportements de type dépressif et anxieux (Ridder et al., 2005; Godavarthi et al., 2012). En accord avec les données de la littérature, nous avons pu montrer que l'administration de Mifepristone, antagoniste des récepteurs à la progestérone et aux glucocorticoïdes, induit une altération des comportements émotionnels chez la souris C57BL6/J. En revanche les souris déficientes en AGPI n-3 sont insensibles à ce traitement ce qui pourrait s'expliquer par une altération de la voie de signalisation dépendante des GR chez ces animaux. En accord avec cette hypothèse, l'expression de BDNF, qui est une cible des GR, est réduite dans le CPF des souris déficientes en AGPI n-3. Rao et collaborateurs ont rapporté que des rats soumis à un régime carencé en AGPI n-3 pendant 15 semaines présentent une réduction d'expression de BDNF dans le CPF (Rao et al., 2007). De plus, l'expression de BDNF est réduite à la suite d'un stress chronique dans l'HC et le CPF (Calabrèse et al., 2009; Taliaz et al., 2011). Cependant d'autres études montrent une augmentation de l'expression de BDNF dans le NAc à la suite d'un stress de défaite sociale (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Puisque la plasticité synaptique dépendante des CB1R est altérée dans cette structure, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression de BDNF dans le NAc de souris déficientes en AGPI n-3. Pour mieux comprendre si la déficience en AGPI n-3 et la défaite sociale altèrent les mêmes mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'altération des comportements émotionnels, d'autres études sont nécessaires.

Il est très largement admis que des stress répétés chez le rongeur provoquent le rétrécissement de l'arborisation dendritique des couches II/III des neurones pyramidaux du CPF (Brown et al., 2005; Dias-Ferreira et al., 2009; Hill et al., 2011). Une telle réorganisation de l'arborisation dendritique est observée chez des souris déficientes en AGPI n-3 et des souris équilibrées soumises à la défaite sociale. La spécificité de ce réarrangement au niveaux des régions distales des dendritiques apicales est consistante avec les études précédentes qui se sont intéressées aux effets d'un stress chronique sur la complexité de l'arborisation dendritique dans le CPF (Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004). Les régions distales des dendrites apicales reçoivent des afférences de structures sous-corticales telles que l'HC ou encore l'AMY. Il est probable que la perte de matériel dendritique au niveau des régions distales puisse entraîner une mauvaise connexion avec d'autres neurones. BDNF joue un rôle central dans la maturation des neurones, la croissance dendritique et la plasticité synaptique. BDNF pourrait également être un médiateur important dans les effets d'un stress chronique sur l'arborisation dendritique dans l'HC et le CPF (Duman and Monteggia, 2006; Magariños et al., 2011). Notre étude ne nous permet pas de déterminer si la réduction de l'expression de BDNF dans le CPF des souris déficientes en AGPI n-3 est impliquée dans l'atrophie de l'arborisation dendritique observée chez ces animaux. Il est connu que l'élévation des niveaux de corticostérone altère la morphologie neuronale dans le CPF (Wellman, 2001; Liu and Aghajanian, 2008). L'hypercorticostéronémie observée chez les animaux déficients en AGPI n-3 nous a amenés à étudier le rôle de la corticostérone dans l'altération de la morphologie neuronale et des comportements émotionnels chez ces animaux. En normalisant les niveaux de corticostérone pendant 30 jours, les souris déficientes en AGPI n-3 présentent des améliorations comportementales (interaction sociale et openfield) et neuroanatomiques dans le CPF. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez des souris avec une mutation des récepteurs à la leptine (*db/db*) chez lesquels la normalisation des niveaux de corticostérone améliore les déficits comportementaux et la neurogenèse hippocampique (Stranahan et al., 2008). Si nous ne sommes pas en mesure d'expliquer comment la déficience en AGPI n-3 induit une hypercorticostéronémie, ces résultats apportent un éclairage quant au rôle de la corticostérone comme médiateur dans les altérations comportementales et neuroanatomiques provoquées par un apport alimentaire déficient en AGPI n-3. En revanche, d'autres études sont nécessaires pour exclure la possibilité que d'autres hormones surrénaliennes soient impliquées dans les effets de la déficience en AGPI n-3, notamment les catécholamines. Pour cela, nous pourrions administrer de manière chronique de fortes doses de corticostérone et

déterminer si ce traitement est suffisant pour reproduire les altérations observées chez les animaux déficients en AGPI n-3.



**Figure 13 :** schéma bilan. Le régime déficient en AGPI n-3 entraîne une réduction de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes GR et de BDNF dans le cortex préfrontal des souris. Ceci est associé à une augmentation des niveaux de corticostérone plasmatique et une atrophie des neurones pyramidaux des couches II/III du cortex préfrontal. La surrénalectomie et le contrôle des niveaux de corticostérone chez les animaux déficients en AGPI n-3 améliorent l'atrophie de l'arborisation dendritique dans le cortex préfrontal ainsi que les comportements de type dépressifs et anxieux. En revanche, l'étude ne permet pas de montrer une restauration de l'expression de BDNF et de GR dans le cortex préfrontal des animaux déficients en n-3.

---

# Conclusion

---

## IX. CONCLUSION

Dans son ensemble, cette étude apporte des éléments de compréhension des relations entre la faible consommation d'AGPI n-3 et les troubles de l'humeur. Ce travail de thèse met en évidence une relation de causalité entre l'élévation des niveaux de corticostérone et l'apparition des comportements de type dépressif et anxieux chez les souris déficientes en AGPI n-3. En revanche, les relations entre les altérations de l'axe HPA et le défaut de plasticité synaptique dépendante du système eCB chez les souris déficientes en AGPI n-3 n'ont pas encore été établies. Ces résultats offrent des perspectives pour développer de nouvelles stratégies nutritionnelles et/ou pharmaceutiques pour prévenir les troubles de l'humeur.

---

# Références

---

## A

- Adams PB, Lawson S, Sanigorski A, Sinclair AJ (1996) Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 31 Suppl:S157-161.
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Lavialle M (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 44:509-538.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58:315-348.
- Appleton KM, Woodside JV, Yarnell JW, Arveiler D, Haas B, Amouyel P, Montaye M, Ferrieres J, Ruidavets JB, Ducimetiere P, Bingham A, Evans A (2007) Depressed mood and dietary fish intake: direct relationship or indirect relationship as a result of diet and lifestyle? *J Affect Disord* 104:217-223.
- Arevalo-Martin A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 23:2511-2516.
- Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellemann C, Hansen SH, Hansen HS (2008) Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1781:200-212.
- Asimaki O, Mangoura D (2011) Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKCepsilon, Src, and Fyn in primary neurons. *Neurochem Int* 58:135-144.
- Aso E, Ozaita A, Valdizan EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O (2008) BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem* 105:565-572.
- Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noisette N, Galan P, Hercberg S (2004) Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39:527-535.
- Atkinson HC, Leggett JD, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Lightman SL (2010) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm by endocannabinoids is sexually diergic. *Endocrinology* 151:3720-3727.
- Atwood BK, Mackie K (2010) CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160:467-479.
- Avishai-Eliner S, Hatalski CG, Tabachnik E, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ (1999) Differential regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA (GR-mRNA) by maternal deprivation in immature rat hypothalamus and limbic regions. *Brain Res Dev Brain Res* 114:265-268.

Azad SC, Monory K, Marsicano G, Cravatt BF, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G (2004) Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J Neurosci* 24:9953-9961.

## B

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST (2003) Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1751-1756.

Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G (2007) Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 27:11700-11711.

Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G (2009) Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des* 15:1623-1646.

Barberger-Gateau P, Jutand MA, Letenneur L, Larrieu S, Tavernier B, Berr C (2005) Correlates of regular fish consumption in French elderly community dwellers: data from the Three-City study. *Eur J Clin Nutr* 59:817-825.

Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ (2005) Chronic valproate does not alter the kinetics of docosahexaenoic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)* 182:180-185.

Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ (2006) Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 59:401-407.

Berger A, Crozier G, Bisogno T, Cavaliere P, Innis S, Di Marzo V (2001) Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6402-6406.

Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.

Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT (2010) Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis* 39:148-155.

Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C (2011) Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci* 31:12889-12899.

- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2007) Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* 62:1103-1110.
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995a) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270:13973-13980.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995b) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 ( Pt 2):637-641.
- Bourre JM, Pascal G, Durand G, Masson M, Dumont O, Piciotti M (1984) Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J Neurochem* 43:342-348.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-373.
- Breckenridge WC, Gombos G, Morgan IG (1972) The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 266:695-707.
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ (1999) Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem* 73:2447-2459.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 152:567-575.
- Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005) Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1714-1722.
- Burr G, Burr M (1929) A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *the journal of biological chemistry* 82, 345-67.
- Burr G, Burr M (1930) On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *the journal of biological chemistry* 86, 587-621.

## C

- Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA (2009) Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S208-216.
- Calderon F, Kim HY (2004) Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 90:979-988.

- Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun SB, Lovinger D, Kim HY (2009) Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 111:510-521.
- Carlezon WA, Jr., Mague SD, Parow AM, Stoll AL, Cohen BM, Renshaw PF (2005) Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol Psychiatry* 57:343-350.
- Carpenter WT, Jr., Bunney WE, Jr. (1971) Adrenal cortical activity in depressive illness. *Am J Psychiatry* 128:31-40.
- Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM (2000a) Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* 41:465-472.
- Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM (2000b) Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* 41:473-480.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007.
- Carroll BJ, Curtis GC, Mendels J (1976) Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol Med* 6:235-244.
- Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem N, Jr. (2002) Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 116:1022-1031.
- Celerier E, Ahdepil T, Wikander H, Berrendero F, Nyberg F, Maldonado R (2006) Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. *Neuropharmacology* 50:788-806.
- Chalon S (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:259-269.
- Chalon S, Vancassel S, Zimmer L, Guilloteau D, Durand G (2001) Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids* 36:937-944.
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20:7033-7040.
- Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP (2008) Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:85-91.
- Chen H, Firestein BL (2007) RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J Neurosci* 27:8378-8386.

- Chen P, Fan Y, Li Y, Sun Z, Bissette G, Zhu MY (2012) Chronic social defeat up-regulates expression of norepinephrine transporter in rat brains. *Neurochem Int* 60:9-20.
- Chevalleyre V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-472.
- Chevalleyre V, Heifets BD, Kaeser PS, Sudhof TC, Castillo PE (2007) Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron* 54:801-812.
- Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39:112-119.
- Childs CE, Romijn T, Enke U, Hoile S, Calder PC (2010) Maternal diet during pregnancy has tissue-specific effects upon fetal fatty acid composition and alters fetal immune parameters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83:179-184.
- Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A (2007a) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 370:1706-1713.
- Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup AV (2007b) [A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant]. *Ugeskr Laeger* 169:4360-4363.
- Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF, Krishnan V, Reyes CM, Han MH, Ables JL, Eisch AJ, Dietz DM, Ferguson D, Neve RL, Greengard P, Kim Y, Morrison JH, Russo SJ (2011) IkappaB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci* 31:314-321.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-381.
- Chung WL, Chen JJ, Su HM (2008) Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr* 138:1165-1171.
- Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW (1980) Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4:121-129.
- Conklin SM, Gianaros PJ, Brown SM, Yao JK, Hariri AR, Manuck SB, Muldoon MF (2007) Long-chain omega-3 fatty acid intake is associated positively with corticolimbic gray matter volume in healthy adults. *Neurosci Lett* 421:209-212.
- Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, Hong S, Pravda EA, Majchrzak S, Carper D, Hellstrom A, Kang JX, Chew EY, Salem N, Jr., Serhan

- CN, Smith LE (2007) Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13:868-873.
- Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60:236-248.
- Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148:1574-1581.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431.
- Cotter D, Hudson L, Landau S (2005) Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar Disord* 7:358-369.
- Cowan AI, Stricker C, Reece LJ, Redman SJ (1998) Long-term plasticity at excitatory synapses on aspiny interneurons in area CA1 lacks synaptic specificity. *J Neurophysiol* 79:13-20.
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004) The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61:149-160.
- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct* 213:63-72.
- Cunnane SC, Anderson MJ (1997) The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr* 127:146-152.
- Cunnane SC, Francescutti V (1999) Fatty acid profiles of maternal adipose tissue in relation to infant development. *Br J Nutr* 82:253-254.

## D

- Dallman MF, Yates FE (1969) Dynamic asymmetries in the corticosteroid feedback path and distribution-metabolism-binding elements of the adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci* 156:696-721.
- Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol* 583:272-289.
- de Kloet ER, Sarabdjitsingh RA (2008) Everything has rhythm: focus on glucocorticoid pulsatility. *Endocrinology* 149:3241-3243.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.

- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.
- de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J (1994) Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343:1454-1459.
- De Smedt-Peyrusse V, Sargueil F, Moranis A, Harizi H, Mongrand S, Laye S (2008) Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *J Neurochem* 105:296-307.
- Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G (1996) alpha-Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J Neurochem* 66:1582-1591.
- Delion S, Chalon S, Herault J, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G (1994) Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J Nutr* 124:2466-2476.
- DeMar JC, Jr., Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI (2006) One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 47:172-180.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-2382.
- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S (2002) The fatty acid amide hydrolase (FAAH). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66:201-210.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Dewey WL (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38:151-178.
- Di Marzo V (2008) Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 160:1-24.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L (2007) Endocannabinoids and related compounds: walking back and forth between plant natural products and animal physiology. *Chem Biol* 14:741-756.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410:822-825.

- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23:4850-4857.
- Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG (2005) Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 146:4292-4301.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N (2009) Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325:621-625.
- Diau GY, Hsieh AT, Sarkadi-Nagy EA, Wijendran V, Nathanielsz PW, Brenna JT (2005) The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *BMC Med* 3:11.
- Dill JA, Howlett AC (1988) Regulation of adenylate cyclase by chronic exposure to cannabimimetic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 244:1157-1163.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13:3839-3847.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.

## E

- Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D (1998) Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord* 48:149-155.
- Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS (2011) Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*.
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP (2010) Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151:4811-4819.

## F

- Favreliere S, Barrier L, Durand G, Chalon S, Tallineau C (1998) Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of

- plasménylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum. *Lipids* 33:401-407.
- Fedorova I, Salem N, Jr. (2006) Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:271-289.
- Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA (1992) Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol* 42:838-845.
- Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, Andersen ML, Tufik S, Lima MM (2011) Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res* 219:116-122.
- Frances H, Monier C, Bourre JM (1995) Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. *Life Sci* 57:1935-1947.
- Frasure-Smith N, Lesperance F, Julien P (2004) Major depression is associated with lower omega-3 fatty acid levels in patients with recent acute coronary syndromes. *Biol Psychiatry* 55:891-896.
- Freeman MP, Davis M, Sinha P, Wisner KL, Hibbeln JR, Gelenberg AJ (2008) Omega-3 fatty acids and supportive psychotherapy for perinatal depression: a randomized placebo-controlled study. *J Affect Disord* 110:142-148.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Fride E, Suris R, Weidenfeld J, Mechoulam R (2005) Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. *Behav Pharmacol* 16:431-440.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875.
- Furuya H, Watanabe T, Sugioka Y, Inagaki Y, Okazaki I (2002) Effect of ethanol and docosahexaenoic acid on nerve growth factor-induced neurite formation and neuron specific growth-associated protein gene expression in PC12 cells. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 37:513-522.

## G

- Galli C, White HB, Jr., Paoletti R (1970) Brain lipid modifications induced by essential fatty acid deficiency in growing male and female rats. *J Neurochem* 17:347-355.
- Galobardes B, Morabia A, Bernstein MS (2001) Diet and socioeconomic position: does the use of different indicators matter? *Int J Epidemiol* 30:334-340.

- Gamo NJ, Arnsten AF (2011) Molecular modulation of prefrontal cortex: rational development of treatments for psychiatric disorders. *Behav Neurosci* 125:282-296.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446-451.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299-318.
- Godavarthi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR (2012) Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 21:1824-1834.
- Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V, Hernandez M, Arevalo C, Nicanor C, Cascio MG, Ambrosio E, Ramos JA (2004) Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR141716 to Delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats: an experimental model of cannabinoid abstinence. *Drug Alcohol Depend* 74:159-170.
- Grandgirard A, Bourre JM, Julliard F, Homayoun P, Dumont O, Piciotti M, Sebedio JL (1994) Incorporation of trans long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina. *Lipids* 29:251-258.
- Green P, Yavin E (1996) Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids* 31:859-865.
- Green P, Yavin E (1998) Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain. *J Neurosci Res* 52:129-136.
- Green P, Glozman S, Kamensky B, Yavin E (1999) Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 40:960-966.
- Green P, Hermesh H, Monselise A, Marom S, Presburger G, Weizman A (2006) Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:107-113.
- Greiner RS, Catalan JN, Moriguchi T, Salem N, Jr. (2003) Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* 38:431-435.
- Greiner RS, Moriguchi T, Slotnick BM, Hutton A, Salem N (2001) Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol Behav* 72:379-385.
- Griffin G, Atkinson PJ, Showalter VM, Martin BR, Abood ME (1998) Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 285:553-560.

Guesnet P, Alasnier C, Alessandri JM, Durand G (1997) Modifying the n-3 fatty acid content of the maternal diet to determine the requirements of the fetal and suckling rat. *Lipids* 32:527-534.

Guzman M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-755.

## H

Hageman I, Nielsen M, Wortwein G, Diemer NH, Jorgensen MB (2009) Electroconvulsive stimulations normalizes stress-induced changes in the glucocorticoid receptor and behaviour. *Behav Brain Res* 196:71-77.

Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF (2004a) CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 15:299-304.

Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16:1395-1398.

Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund TF (2004b) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 19:1906-1912.

Haller J, Matyas F, Soproni K, Varga B, Barsy B, Nemeth B, Mikics E, Freund TF, Hajos N (2007) Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 25:2445-2456.

Harauma A, Moriguchi T (2011) Dietary n-3 fatty acid deficiency in mice enhances anxiety induced by chronic mild stress. *Lipids* 46:409-416.

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

Hennebelle M, Balasse L, Latour A, Champeil-Potokar G, Denis S, Lavalie M, Gisquet-Verrier P, Denis I, Vancassel S (2012) Influence of omega-3 Fatty Acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress. *PLoS One* 7:e42142.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180.

Hibbeln JR (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet* 351:1213.

- Hibbeln JR (2002) Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. *J Affect Disord* 69:15-29.
- Hibbeln JR, Bissette G, Umhau JC, George DT (2004) Omega-3 status and cerebrospinal fluid corticotrophin releasing hormone in perpetrators of domestic violence. *Biol Psychiatry* 56:895-897.
- Hill MN, Gorzalka BB (2004) Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol* 499:291-295.
- Hill MN, Gorzalka BB (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16:333-352.
- Hill MN, Gorzalka BB (2009) Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA* 301:1165-1166.
- Hill MN, Tasker JG (2012) Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204:5-16.
- Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS (2011a) Alterations in Corticolimbic Dendritic Morphology and Emotional Behavior in Cannabinoid CB1 Receptor-Deficient Mice Parallel the Effects of Chronic Stress. *Cereb Cortex*.
- Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2008a) Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* 41:48-53.
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB (2008b) Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106:2322-2336.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Viau V (2010) Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9406-9411.
- Hill MN, Kumar SA, Filipowski SB, Iverson M, Stuhr KL, Keith JM, Cravatt BF, Hillard CJ, Chattarji S, McEwen BS (2012) Disruption of fatty acid amide hydrolase activity prevents the effects of chronic stress on anxiety and amygdalar microstructure. *Mol Psychiatry*.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2011b) Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci* 31:10506-10515.

- Hillard CJ (2000) Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61:3-18.
- Hinz B, Hirschelmann R (2000) Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res* 17:1273-1277.
- Holman RT, Johnson SB, Hatch TF (1982) A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr* 35:617-623.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501.
- Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17:187-205.
- Howlett AC (2005) Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*:53-79.
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532-538.
- Huan M, Hamazaki K, Sun Y, Itomura M, Liu H, Kang W, Watanabe S, Terasawa K, Hamazaki T (2004) Suicide attempt and n-3 fatty acid levels in red blood cells: a case control study in China. *Biol Psychiatry* 56:490-496.
- Huang SY, Yang HT, Chiu CC, Pariante CM, Su KP (2008) Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiatr Res* 42:58-63.
- Hungund BL, Vinod KY, Kassir SA, Basavarajappa BS, Yalamanchili R, Cooper TB, Mann JJ, Arango V (2004) Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry* 9:184-190.

## I

- Ikemoto A, Kobayashi T, Watanabe S, Okuyama H (1997) Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochem Res* 22:671-678.
- Innis SM (2004) Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol* 554:27-43.
- Innis SM (2005) Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26 Suppl A:S70-75.
- Innis SM (2008) Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 1237:35-43.
- Innis SM, Friesen RW (2008) Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *Am J Clin Nutr* 87:548-557.

Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81:1143-1195.

Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006) Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* 26:5733-5738.

## J

Jacob W, Yassouridis A, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Wotjak CT (2009) Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav* 8:685-698.

Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.

Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (2005) Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25:11300-11312.

Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Keshavarz SA, Hosseini M, Djazayeri A, Amini H, Jalali M, Peet M (2008) Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 42:192-198.

Jensen CL, Heird WC (2002) Lipids with an emphasis on long-chain polyunsaturated fatty acids. *Clin Perinatol* 29:261-281.

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X (2005) Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115:3104-3116.

Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Koo A, Chavkin C, Mackie K (1999) Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 19:3773-3780.

## K

Kamphuis MH, Geerlings MI, Tijhuis MA, Kalmijn S, Grobbee DE, Kromhout D (2006) Depression and cardiovascular mortality: a role for n-3 fatty acids? *Am J Clin Nutr* 84:1513-1517.

Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB (2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427:504.

Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* 272:27218-27223.

- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797-804.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26:2991-3001.
- Kawashima A, Harada T, Kami H, Yano T, Imada K, Mizuguchi K (2010) Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J Nutr Biochem* 21:268-277.
- Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R (2011) Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 25:1725-1734.
- Kim HW, Rao JS, Rapoport SI, Igarashi M (2011a) Regulation of rat brain polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism during graded dietary n-3 PUFA deprivation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85:361-368.
- Kim HY, Spector AA (2012) Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.
- Kim HY, Moon HS, Cao D, Lee J, Kevala K, Jun SB, Lovinger DM, Akbar M, Huang BX (2011b) N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons. *Biochem J* 435:327-336.
- Kodas E, Vancassel S, Lejeune B, Guilloteau D, Chalon S (2002) Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J Lipid Res* 43:1209-1219.
- Kodas E, Galineau L, Bodard S, Vancassel S, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S (2004) Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J Neurochem* 89:695-702.
- Kolb B, Gorny G, Limebeer CL, Parker LA (2006) Chronic treatment with Delta-9-tetrahydrocannabinol alters the structure of neurons in the nucleus accumbens shell and medial prefrontal cortex of rats. *Synapse* 60:429-436.
- Kouznetsova M, Kelley B, Shen M, Thayer SA (2002) Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 61:477-485.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2002) Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol* 12:324-330.

- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr* 71:179S-188S.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391-404.
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25:11288-11299.
- Kuperstein F, Yakubov E, Dinerman P, Gil S, Eylam R, Salem N, Jr., Yavin E (2005) Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J Neurochem* 95:1550-1562.

## L

- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One* 2:e709.
- Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Laye S, Manzoni OJ (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14:345-350.
- Larrieu T, Madore C, Joffre C, Laye S (2012) Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. *J Physiol Biochem*.
- Lazarus RS (1993) Coping theory and research: past, present, and future. *Psychosom Med* 55:234-247.
- Lee HJ, Ghelardoni S, Chang L, Bosetti F, Rapoport SI, Bazinet RP (2005) Topiramate does not alter the kinetics of arachidonic or docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Neurochem Res* 30:677-683.
- Lepine JP, Gasquet I, Kovess V, Arbabzadeh-Bouchez S, Negre-Pages L, Nachbaur G, Gaudin AF (2005) [Prevalence and comorbidity of psychiatric disorders in the French general population]. *Encephale* 31:182-194.
- Levant B, Ozias MK, Davis PF, Winter M, Russell KL, Carlson SE, Reed GA, McCarson KE (2008) Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: Interactions with reproductive status in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:1279-1292.

- Levental I, Grzybek M, Simons K (2010) Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* 49:6305-6316.
- Leweke FM, Koethe D (2008) Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol* 13:264-275.
- Lim SY, Hoshiba J, Salem N, Jr. (2005) An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *J Neurochem* 95:848-857.
- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS (2006) Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci* 26:7870-7874.
- Liu RJ, Aghajanian GK (2008) Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:359-364.
- Lombardi G, Leonardi P, Moroni F (1996) Metabotropic glutamate receptors, transmitter output and fatty acids: studies in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 117:189-195.

## M

- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*:299-325.
- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:S60-65.
- Maes M, Smith R, Christophe A, Cosyns P, Desnyder R, Meltzer H (1996) Fatty acid composition in major depression: decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20: 4 omega 6/C20:5 omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *J Affect Disord* 38:35-46.
- Magarinos AM, Li CJ, Gal Toth J, Bath KG, Jing D, Lee FS, McEwen BS (2011) Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. *Hippocampus* 21:253-264.
- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG (2006) Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 26:6643-6650.
- Malkoski SP, Dorin RI (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 13:1629-1644.
- Mann JJ (2003) Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4:819-828.

- Mann JJ, Hentleff RA, Lagattuta TF, Perper JA, Li S, Arango V (1996) Lower 3H-paroxetine binding in cerebral cortex of suicide victims is partly due to fewer high affinity, non-transporter sites. *J Neural Transm* 103:1337-1350.
- Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA (1999) Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res* 839:173-179.
- Marangell LB, Martinez JM, Zboyan HA, Kertz B, Kim HF, Puryear LJ (2003) A double-blind, placebo-controlled study of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry* 160:996-998.
- Marco EM, Perez-Alvarez L, Borcel E, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, File SE, Viveros MP (2004) Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol* 15:21-27.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530-534.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84-88.
- Marszalek JR, Lodish HF (2005) Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:633-657.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159:379-387.
- Martin RE, Bazan NG (1992) Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem* 59:318-325.
- Martinez M (1992) Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120:S129-138.
- Martinez M, Mougan I (1998) Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J Neurochem* 71:2528-2533.
- Mato S, Pazos A (2004) Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. *Neuropharmacology* 46:716-726.
- Mato S, Chevalere V, Robbe D, Pazos A, Castillo PE, Manzoni OJ (2004) A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 7:585-586.

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- McAllister SD, Glass M (2002) CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:161-171.
- McEwen BS, Wingfield JC (2010) What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm Behav* 57:105-111.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 66:1121-1188.
- McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magarinos AM, McKittrick CR, et al. (1995) Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm* 51:371-402.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.
- McEwen BS (2000) Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22:108-124.
- McLaughlin RJ, Hill MN, Bambico FR, Stuhr KL, Gobbi G, Hillard CJ, Gorzalka BB (2012) Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:664-671.
- McNamara RK, Carlson SE (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:329-349.
- McNamara RK, Liu Y (2011) Reduced expression of fatty acid biosynthesis genes in the prefrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 129:359-363.
- McNamara RK, Liu Y, Jandacek R, Rider T, Tso P (2008a) The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearyl-CoA desaturase activity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78:293-304.
- McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Dwivedi Y, Pandey GN (2010) Selective deficits in erythrocyte docosahexaenoic acid composition in adult patients with bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord* 126:303-311.
- McNamara RK, Hahn CG, Jandacek R, Rider T, Tso P, Stanford KE, Richtand NM (2007) Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 62:17-24.

- McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Stanford KE, Hahn CG, Richtand NM (2008b) Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Psychiatry Res* 160:285-299.
- Meaney MJ, Aitken DH (1985) [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 328:176-180.
- Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Tatarewicz JE, Sapolsky RM (1985) Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci* 99:765-770.
- Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR (2003) Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 38:391-398.
- Mingam R, Moranis A, Bluthé RM, De Smedt-Peyrusse V, Kelley KW, Guesnet P, Laviolle M, Dantzer R, Laye S (2008) Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 28:1877-1886.
- Mitra R, Ferguson D, Sapolsky RM (2009) SK2 potassium channel overexpression in basolateral amygdala reduces anxiety, stress-induced corticosterone secretion and dendritic arborization. *Mol Psychiatry* 14:847-855, 827.
- Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res* 655:251-254.
- Moreira FA, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13:196-212.
- Moreira FA, Wotjak CT (2010) Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2:429-450.
- Moriguchi T, Greiner RS, Salem N, Jr. (2000) Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75:2563-2573.
- Mozhui K, Karlsson RM, Kash TL, Ihne J, Norcross M, Patel S, Farrell MR, Hill EE, Graybeal C, Martin KP, Camp M, Fitzgerald PJ, Ciobanu DC, Sprengel R, Mishina M, Wellman CL, Winder DG, Williams RW, Holmes A (2010) Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *J Neurosci* 30:5357-5367.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.

## N

- Nakai Y, Usui T, Tsukada T, Takahashi H, Fukata J, Fukushima M, Senoo K, Imura H (1991) Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:301-306.
- Nakashima Y, Yuasa S, Hukamizu Y, Okuyama H, Ohhara T, Kameyama T, Nabeshima T (1993) Effect of a high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice. *J Lipid Res* 34:239-247.
- Naliwaiko K, Araujo RL, da Fonseca RV, Castilho JC, Andreatini R, Bellissimo MI, Oliveira BH, Martins EF, Curi R, Fernandes LC, Ferraz AC (2004) Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? *Nutr Neurosci* 7:91-99.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342-1344.
- Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH (2002) Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry* 159:477-479.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Newsom RJ, Osterlund C, Masini CV, Day HE, Spencer RL, Campeau S (2012) Cannabinoid receptor type 1 antagonism significantly modulates basal and loud noise induced neural and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in male Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 204:64-73.
- Nieminen LR, Makino KK, Mehta N, Virkkunen M, Kim HY, Hibbeln JR (2006) Relationship between omega-3 fatty acids and plasma neuroactive steroids in alcoholism, depression and controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:309-314.

## O

- Orr SK, Bazinet RP (2008) The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation. *Curr Opin Investig Drugs* 9:735-743.
- Orr SK, Trepanier MO, Bazinet RP (2012) n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.
- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R (2007) Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 102:1105-1114.

## P

- Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y (2008) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1047-1061.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ (2004) Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 145:5431-5438.
- Peet M, Horrobin DF (2002) A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry* 59:913-919.
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 43:315-319.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12:4122-4132.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977a) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977b) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.

## Q

- Qi X, Lin W, Wang D, Pan Y, Wang W, Sun M (2009) A role for the extracellular signal-regulated kinase signal pathway in depressive-like behavior. *Behav Brain Res* 199:203-209.

## R

- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125:1-6.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2006) Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16:313-320.
- Raeder MB, Steen VM, Vollset SE, Bjelland I (2007) Associations between cod liver oil use and symptoms of depression: the Hordaland Health Study. *J Affect Disord* 101:245-249.

- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Dubey P, Stockmeier CA, Krishnan KR (2005) Prominent reduction in pyramidal neurons density in the orbitofrontal cortex of elderly depressed patients. *Biol Psychiatry* 58:297-306.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45:1085-1098.
- Rao JS, Ertley RN, DeMar JC, Jr., Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ (2007a) Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 12:151-157.
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Jr., Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP (2007b) n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 12:36-46.
- Raygada M, Cho E, Hilakivi-Clarke L (1998) High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offsprings' aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity. *J Nutr* 128:2505-2511.
- Rees AM, Austin MP, Parker GB (2008) Omega-3 fatty acids as a treatment for perinatal depression: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aust N Z J Psychiatry* 42:199-205.
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987a) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol* 115:459-467.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987b) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45:407-412.
- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25:6243-6250.
- Riniker B, Sieber P, Rittel W, Zuber H (1972) Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Nat New Biol* 235:114-115.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21:109-116.

- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8384-8388.
- Rodriguez de Fonseca F, Rubio P, Menzaghi F, Merlo-Pich E, Rivier J, Koob GF, Navarro M (1996) Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe12,Nle21,38,C alpha MeLeu37]CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 276:56-64.
- Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1997) Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 46:100-108.
- Roohbakhsh A, Moghaddam AH, Massoudi R, Zarrindast MR (2007) Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:223-229.
- Ross BM (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81:309-312.
- Roumestan C, Gougat C, Jaffuel D, Mathieu M (2004) [Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications]. *Rev Med Interne* 25:636-647.
- Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, Parolaro D (2008) CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54:151-160.
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008a) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:1292-1301.
- Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008b) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33:2760-2771.
- Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58:814-820.
- Rutkowska M, Jachimczuk O (2004) Antidepressant-like properties of ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective agonist of CB1 receptors. *Acta Pol Pharm* 61:165-167.

## S

- Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ (2007) Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 1182:50-59.
- Samuelsson B (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220:568-575.
- Sanderson DJ, Good MA, Seeburg PH, Sprengel R, Rawlins JN, Bannerman DM (2008) The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog Brain Res* 169:159-178.
- Sandi C, Venero C, Guaza C (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8:794-800.
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925-935.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218:121-144.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Selley DE, Stark S, Sim LJ, Childers SR (1996) Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci* 59:659-668.
- Selye H (1937) The Significance of the Adrenals for Adaptation. *Science* 85:247-248.
- Selye H (1973) The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61:692-699.
- Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196:1025-1037.

- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213-242.
- Silvers KM, Scott KM (2002) Fish consumption and self-reported physical and mental health status. *Public Health Nutr* 5:427-431.
- Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:674-688.
- Sim-Selley LJ, Schechter NS, Rorrer WK, Dalton GD, Hernandez J, Martin BR, Selley DE (2006) Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration. *Mol Pharmacol* 70:986-996.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR (1996) Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 16:8057-8066.
- Slavinski EA, Jull JW, Auersperg N (1976) Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation. *J Endocrinol* 69:385-394.
- Sondheimer F, Mechoulam R, Sprecher M (1964) The synthesis of 19-hydroxy-10-alpha-testosterone. *Tetrahedron* 20:2473-2485.
- Song C, Li X, Leonard BE, Horrobin DF (2003) Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. *J Lipid Res* 44:1984-1991.
- Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486:219-231.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114:13-33.
- Steiner MA, Marsicano G, Nestler EJ, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008a) Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology* 33:54-67.
- Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bachli H, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008b) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* 8:196-208.
- Straiker A, Mackie K (2005) Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol* 569:501-517.

- Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP (2008) Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 11:309-317.
- Su HM, Bernardo L, Mirmiran M, Ma XH, Corso TN, Nathanielsz PW, Brenna JT (1999) Bioequivalence of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids as sources of docosahexaenoate accretion in brain and associated organs of neonatal baboons. *Pediatr Res* 45:87-93.
- Su KP, Huang SY, Chiu CC, Shen WW (2003) Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:267-271.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:173-192.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Sullivan RM, Gratton A (2002) Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27:99-114.
- Swanson LW (1976) An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J Comp Neurol* 167:227-256.

## T

- Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E (2003) Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res* 964:136-143.
- Taliaz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A, Zangen A (2011) Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 31:4475-4483.
- Tanskanen A, Hibbeln JR, Tuomilehto J, Uutela A, Haukkala A, Viinamaki H, Lehtonen J, Vartiainen E (2001) Fish consumption and depressive symptoms in the general population in Finland. *Psychiatr Serv* 52:529-531.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147:5549-5556.
- Terano T, Salmon JA, Moncada S (1984) Biosynthesis and biological activity of leukotriene B<sub>5</sub>. *Prostaglandins* 27:217-232.
- Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Kiliaan AJ, Breteler MM (2003) Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 78:40-46.

Timonen M, Horrobin D, Jokelainen J, Laitinen J, Herva A, Rasanen P (2004) Fish consumption and depression: the Northern Finland 1966 birth cohort study. *J Affect Disord* 82:447-452.

## U

Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 27:3663-3676.

Ueda N (2002) Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:521-534.

## V

Van Otterloo E, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Steffens DC, Krishnan RR, Rajkowska G (2009) Reductions in neuronal density in elderly depressed are region specific. *Int J Geriatr Psychiatry* 24:856-864.

Venance L, Maldonado R, Manzoni O (2004) [Endocannabinoids in the central nervous system]. *Med Sci (Paris)* 20:45-53.

Vinod KY, Hungund BL (2006) Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends Pharmacol Sci* 27:539-545.

Vinod KY, Arango V, Xie S, Kassir SA, Mann JJ, Cooper TB, Hungund BL (2005) Elevated levels of endocannabinoids and CB1 receptor-mediated G-protein signaling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims. *Biol Psychiatry* 57:480-486.

## W

Wade MR, Degroot A, Nomikos GG (2006) Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *Eur J Pharmacol* 551:162-167.

Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322-328.

Watanabe S, Doshi M, Hamazaki T (2003) n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:51-59.

Weiland NG, Orchinik M, Tanapat P (1997) Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. *Neuroscience* 78:653-662.

Wellman CL (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 49:245-253.

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.

Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682.

Wittmann G, Deli L, Kallo I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 503:270-279.

Wood JT, Williams JS, Pandarinathan L, Janero DR, Lammi-Keefe CJ, Makriyannis A (2010) Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *J Lipid Res* 51:1416-1423.

Wotjak CT (2005) Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* 5:659-670.

Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD (2006) Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci* 24:595-605.

## X

Xiao Y, Huang Y, Chen ZY (2005) Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr* 94:544-550.

## Y

Yasuda H, Huang Y, Tsumoto T (2008) Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3106-3111.

Yehuda R, Flory JD, Southwick S, Charney DS (2006) Developing an agenda for translational studies of resilience and vulnerability following trauma exposure. *Ann N Y Acad Sci* 1071:379-396.

Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI (1999) Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res* 56:565-570.

Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI (2005) Mixture of essential fatty acids lowers test anxiety. *Nutr Neurosci* 8:265-267.

Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI (1998) Fatty acids and brain peptides. *Peptides* 19:407-419.

## Z

- Zimmer L, Durand G, Guilloteau D, Chalon S (1999) n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and dopamine metabolism in the rat frontal cortex. *Lipids* 34 Suppl:S251.
- Zimmer L, Delpal S, Guilloteau D, Aioun J, Durand G, Chalon S (2000a) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* 284:25-28.
- Zimmer L, Kodas E, Guilloteau D, Garreau L, Besnard J, Chalon S (2000b) Microdialysis as a tool for in vivo study of dopamine transporter function in rat brains. *J Neurosci Methods* 103:137-144.
- Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S (1998) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 240:177-181.
- Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S (2002) The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 75:662-667.
- Zhu PJ, Lovinger DM (2007) Persistent synaptic activity produces long-lasting enhancement of endocannabinoid modulation and alters long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 97:4386-4389.
- Zoppi S, Perez Nievas BG, Madrigal JL, Manzanares J, Leza JC, Garcia-Bueno B (2011) Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 36:805-818.