



**HAL**  
open science

# Bases neurobiologiques des troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité : rôle de l'inflammation

Celia Fourier

## ► To cite this version:

Celia Fourier. Bases neurobiologiques des troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité : rôle de l'inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0359 . tel-01674185

**HAL Id: tel-01674185**

**<https://theses.hal.science/tel-01674185>**

Submitted on 2 Jan 2018

**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.

**THESE**

PRESENTEE A  
**L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

**Célia Fourier**

Pour le grade de

**DOCTEUR EN NEUROSCIENCES**

Bases neurobiologiques des troubles de l'humeur et de la cognition associés à  
l'obésité : rôle de l'inflammation

Soutenue le 16 décembre 2016

**Membres du jury :**

<b>Dr Lucile CAPURON</b> , Directrice de recherche à l'INRA, Université de Bordeaux, Bordeaux	<b>Président</b>
<b>Dr Joëlle CHABRY</b> , Directrice de recherche au CNRS, Université de Nice, Valbonne	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr Mariano Ruiz-Gayo</b> , Professeur, Universidad CEU San Pablo, Madrid	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr Daniela Cota</b> , Chargée de Recherche à l'INSERM, Université de Bordeaux, Bordeaux	<b>Examineur</b>
<b>Pr Harald Engler</b> , Professeur, Essen University Hospital, Essen	<b>Examineur</b>
<b>Dr Nathalie Castanon</b> , Chargée de recherche à l'INRA, Université de Bordeaux, Bordeaux	<b>Directrice de thèse</b>



## **REMERCIEMENTS**





Cette thèse est loin d'avoir été un travail solitaire et je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidée dans cette étape.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail. Je remercie chaleureusement le **Dr Lucile Capuron** d'avoir accepté de présider ce jury. Merci pour ta gentillesse et tes conseils. Je remercie également le **Dr Joëlle Chabry** et le **Pr Mariano Ruiz-Gayo** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci au **Dr Daniela Cota** d'avoir bien voulu examiner ce travail. I also would like to thank **Pr Harald Engler** for examining this work.

Je souhaite également remercier **Sophie Layé** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire NutriNeurO il y a quelques années déjà, d'abord en tant que stagiaire sous ta direction puis en tant que doctorante.

Bien sûr, je tiens à remercier sincèrement **Nathalie Castanon** d'avoir encadré cette thèse. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ta gentillesse. Merci également pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidée au quotidien ou plus ponctuellement, en particulier à **Camille Kropp, Julie Sauvant, Agnès Aubert, Véronique De Smedt-Peyrusse** et **Corinne Joffre**. Merci à l'**Itegr** pour les dosages réalisés sur mes échantillons. Un grand merci à **Clémentine Bosch-Bouju** pour m'avoir initiée au monde de l'électrophysio avec tant de pédagogie. Merci à l'ensemble des chercheurs et des ITAs du laboratoire pour leur sympathie et leurs conseils.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, un peu dans l'ombre, font en sorte que tout fonctionne au quotidien, en particulier **Marie-Pierre Manain** et **Flavie Tregan** au secrétariat et **Isabelle Moreau** à la laverie. Un grand merci à **Mathieu Cadet** et à **Sara Delbary** pour le soin qu'ils ont apporté à mes « petites » souris !

Je souhaite remercier les anciens doctorants et post-docs pour leur sympathie et pour nous avoir montré la voie, en particulier **Amandine Lépinay, Frédéric Tantot** et **Gabriela de Medeiros**. Un grand merci à tous les autres étudiants : **Yootana Janthakhin** (merci d'être là pour partager cette dure période), **Fabien Ducrocq, Quentin Leyrolle, Marion Rincel, Chloé Lacabanne, Hortense Fanet, Suzanne van der Veldt, Amélie Dinca, Roman Walle** et **Essi Biyong**. Merci pour votre bonne humeur quotidienne et bon courage pour la suite !

Il y a aussi des personnes sans qui cette thèse aurait été très différente. Merci à **Charlotte Rey**, d'avoir été là du tout début (et même avant) jusqu'à la fin ! Merci pour toutes ces

discussions, ces bons moments au labo et ailleurs, ces râleries et tout le reste ! Je te souhaite du courage pour la suite et surtout beaucoup de bonheur ! Un grand merci également à **Anne-Laure Dinel**, même si tu nous as un peu abandonnées, c'était un plaisir de partager ton bureau ! Et merci pour ton expérience et tes conseils (l'expérience de l'âge... J'étais obligée !). Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta jolie famille, Madame ! Merci d'être revenue du chalet aux baleines !

On m'a demandé un paragraphe spécial « personne sans qui je ne peux pas vivre »... Donc merci à **Lison Huet** (la fille qui est dans le bureau psy), pour ta folie, ta bonne humeur quotidienne, tes délires (bon courage **Sandra Dexpert** !) ! Merci de t'être préoccupée de ma survie mentale et alimentaire pendant cette dernière année ! Et bon courage pour la suite !

J'espère que vous viendrez nous voir les filles, peu importe où nous irons !

Bien sûr, la thèse est également plus facile grâce à toutes les personnes « à côté ». Je tiens donc à remercier **Damien** et **Marion**, pour tous les moments passés ensemble ! Merci pour votre présence, votre amitié et tout le reste ! Merci également à **Guillaume** et **Mélissa** (et **Camille** bien sûr !), de toujours vous être intéressés à l'avancée de ma thèse et de ma recherche de post-doc, et d'être de si bons amis ! Enfin, merci à **Charlotte**, qui est toujours là malgré la distance ! Promis, il y aura de la place pour chacun d'entre vous là où nous irons !

Un grand merci bien sûr à **mes parents**, pour m'avoir toujours encouragée à faire ce qui me plaisait et pour m'en avoir donné les moyens, mais surtout merci de m'avoir toujours permis de changer d'avis. Un grand merci également à **Fabien**, et à l'ensemble de ma famille, la plus formidable qu'il soit ! Je tiens également à remercier ma belle-famille pour leur gentillesse. Merci à tous de vous intéresser à ce que je fais !

Enfin, merci à **Julien**, pour tout ! Heureusement que tu étais là ces dernières semaines, merci pour ton soutien et ta compréhension. J'ai hâte qu'on passe ensemble à la suite !

## **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Publications**

---

**Fourrier C.**, Castanon N., and Layé S. (2015) Les troubles de l'humeur associés à l'obésité et au diabète de type 2 : rôle de la neuroinflammation. *Diabète et Obésité*, Volume 10, n°93.

**Fourrier C.**, Castanon N., and Layé S. (2015) Rôle de l'inflammation dans la dépression associée au diabète. *Nutrition et Endocrinologie*. Volume 13, n°73.

Larrieu T., Hilal M.L., **Fourrier C.**, De Smedt-Peyrusse V., Sans N., Capuron L., and Laye S. (2014). Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl Psychiatry* 4, e437.

Larrieu, T., Hilal, L.M., **Fourrier, C.**, De Smedt-Peyrusse, V., Sans N., Capuron L., and Laye S. (2013) Étude du rôle des oméga-3 alimentaires dans les troubles de l'humeur : rôle de l'axe du stress. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 48:S53.

Fernandez de Cossio Gomez L., **Fourrier C.**, Sauvant J., Everard A. Capuron L., Cani P.D., Layé S., Castanon N. (2016). Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity* 2016 Dec 24.

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Boursereau R., Sauvant J., Aubert A., Capuron L., Ferreira G., Layé S., Castanon N. (En preparation) Brain TNF- $\alpha$  mediates anxiety-like behavior in a mouse model of obesity

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Aubert A., Kropp C., Fonseca L., Djoukitch S., Vaysse C., Layé S., Joffre C., Castanon N. (En preparation) Omega-3 antioxidants supplemented diet improves cognitive alterations associated with metabolic syndrome

### **Communications orales**

---

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Sauvant J., Layé S., Joffre C., and Castanon N. Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on cognitive and neurobiological alterations associated with obesity. 9<sup>th</sup> Meeting Nutrition & Neurosciences, 2015, Bordeaux, France.

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Sauvant J., Layé S., Joffre C., and Castanon N. Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on cognitive alterations associated with obesity. 4<sup>e</sup> Journée des doctorants et post-doctorants du laboratoire NutriNeuro, 2015, Bordeaux, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. Neurobiological basis of cognitive and emotional alterations associated with obesity. 3<sup>e</sup> Journée des doctorants et post-doctorants du laboratoire NutriNeuro, 2014, Bordeaux, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. Bases neurobiologiques des troubles émotionnels et cognitifs associés à l'obésité : rôle du TNF $\alpha$ . 2<sup>e</sup> Journée des doctorants et post-doctorants du laboratoire NutriNeuro, 2013, Bordeaux, France.

## **Communications affichées**

---

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on emotional and cognitive alterations and neuroinflammatory processes associated with obesity.* 23rd Annual PNIRS Scientific Meeting, 2016, Brighton, England.

**Fourrier C.**, Bosch-Bouju C., Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on cognitive and neurobiological alterations associated with obesity.* 16<sup>e</sup> Journée de l'École Doctorale de Bordeaux 2016, Arcachon, France.

Castanon N., **Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Joffre C., and Layé S. *Effet d'une diète enrichie en acides gras polyinsaturés n-3 et en antioxydants sur les altérations émotionnelles et cognitives associées à l'obésité.* Journées Francophones de Nutrition, 2015, Marseille, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on cognitive alterations and neuroinflammatory processes associated with obesity.* 2<sup>nd</sup> International Bordeaux Neurocampus/Brain Conference Glisyn, 2015, Talence, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on emotional and cognitive alterations and neuroinflammatory processes associated with obesity.* 12<sup>th</sup> European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2015, Bilbao, Spain.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on emotional and cognitive alterations associated with obesity.* 12<sup>e</sup> Colloque de la Société des Neurosciences, 2015, Montpellier, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on emotional and cognitive alterations associated with obesity.* Journée Bordeaux Neurocampus 2015, Talence, France.

**Fourrier C.**, Sauvant J., Aubert A., Layé S., Joffre C., and Castanon N. *Effect of an omega-3/antioxidants supplemented diet on emotional and cognitive alterations associated with obesity.* 15<sup>e</sup> Journée de l'École Doctorale de Bordeaux 2015, Arcachon, France.

# **RESUME**



**Titre :** Bases neurobiologiques des troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité

**Résumé :** L'obésité est une maladie associée à des altérations métaboliques et inflammatoires et constitue un facteur de risque important de développer des comorbidités telles qu'un diabète de type 2. De plus, la prévalence de troubles de l'humeur et de la cognition est élevée chez les sujets obèses. Ces troubles neuropsychiatriques compliquent la prise en charge de l'obésité, contribuent à son aggravation et peuvent à terme favoriser le développement des comorbidités associées. Diminuer le développement de ces troubles pourrait donc permettre d'améliorer la santé et la qualité de vie des individus obèses. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de comprendre les mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'apparition de ces troubles neuropsychiatriques, dans le but d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques visant à les réduire. Dans ce but, des modèles animaux d'obésité tels que la souris *db/db*, qui présentent une obésité sévère associée à des altérations caractéristiques du syndrome métabolique, peuvent être particulièrement utiles. En effet, ces souris présentent des comportements de type anxieux et des déficits cognitifs, associés à des altérations neurobiologiques dont une neuroinflammation chronique à bas bruit et une plasticité neuronale altérée dans l'hippocampe. Nous avons donc utilisé ce modèle pour cibler dans un premier temps l'inflammation, afin d'étudier son implication dans ces altérations comportementales. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet d'un régime enrichi en acides gras polyinsaturés de type n-3 et antioxydants, connus pour avoir des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices, sur les altérations neuropsychiatriques associées à l'obésité. Enfin, nous avons mesuré l'effet de l'administration chronique d'un prébiotique, l'oligofructose, sur les altérations neuropsychiatriques des souris *db/db*, puisque des études précédentes ont mis en évidence un rôle important du microbiote intestinal dans la régulation du comportement. De plus, nous avons tenté d'identifier les potentiels mécanismes intermédiaires, en mesurant en particulier l'impact de l'administration d'oligofructose sur le métabolisme et l'inflammation systémique, mais aussi sur les systèmes neurobiologiques connus pour être impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du comportement.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'une restriction calorique ou un traitement anti-inflammatoire diminuait les comportements de type anxieux chez la souris *db/db*. Cette amélioration était associée à une diminution sélective de l'expression génique du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe, ce qui suggère une contribution de cette cytokine pro-inflammatoire dans les comportements de type anxieux associés à l'obésité. Nous avons ensuite confirmé cette hypothèse en montrant que le blocage sélectif du TNF- $\alpha$  cérébral par administration i.c.v. d'étanercept (un récepteur leurre du TNF- $\alpha$ ) diminuait les comportements de type anxieux chez les souris *db/db*. De façon intéressante, des mesures électrophysiologiques ont permis de montrer que cette amélioration des comportements émotionnels



par l'étanercept impliquait la modulation de l'activité spontanée des neurones dans l'hippocampe ventral, région connue pour son rôle dans la régulation des émotions.

Dans un second temps, nous avons essayé d'identifier de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques pour améliorer l'humeur et la cognition chez les sujets obèses. Nous avons donc évalué l'effet d'un régime enrichi en acides gras polyinsaturés de type n-3 et antioxydants sur les altérations comportementales des souris *db/db*. En effet, ces nutriments sont connus pour moduler différents paramètres neurobiologiques impliqués dans la régulation du comportement. Nous avons montré que la consommation chronique de ce régime supprimait les déficits de mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez les souris *db/db* dans le test de la piscine de Morris et que cette amélioration cognitive était probablement sous-tendue par des changements de plasticité neuronale.

Enfin, nous avons évalué si des manipulations du microbiote intestinal pouvaient représenter une stratégie préventive et/ou thérapeutique pour améliorer les altérations neuropsychiatriques associées à l'obésité. Nous avons donc mesuré l'impact d'une manipulation du microbiote intestinal par des prébiotiques sur les altérations métaboliques et comportementales des souris *db/db*, mais également sur les systèmes biologiques et neurobiologiques auxquels elles sont associées. Nous avons montré que les améliorations métaboliques induites par l'administration de prébiotiques chez la souris *db/db* étaient accompagnées d'une diminution de l'inflammation périphérique et centrale. Cependant, ces améliorations n'étaient pas associées à une diminution visible des comportements de type anxieux et des déficits de mémoire spatiale.

Pour conclure, ces expériences contribuent à montrer que l'inflammation, en particulier le TNF- $\alpha$ , pourrait être une cible importante pour le développement de traitements visant à améliorer les troubles de l'humeur chez les sujets obèses ; alors que des interventions nutritionnelles avec des nutriments d'intérêt pourrait plutôt aider à protéger des altérations métaboliques et/ou cognitives chez ces patients.

**Mots clés :** obésité, troubles de l'humeur, cognition, neuroinflammation, TNF- $\alpha$ , plasticité neuronale, AGPI n-3, antioxydants, prébiotiques

---

Laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro)

UMR INRA 1286

146 Rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX Cedex - FRANCE

## **SUMMARY**



**Title:** Neurobiological basis of mood and cognitive alterations associated with obesity

**Summary:** Obesity is a metabolic and inflammatory disorder that represents a major risk factor for the development of comorbidities such as type 2 diabetes. Obese patients also often experience mood and cognitive dysfunctions that represent important risk factors for aggravation of obesity and related outcomes. Reducing the development of such alterations may therefore allow improving health and quality of life of obese subjects. In this context, this thesis aimed to decipher the neurobiological mechanisms underlying such neuropsychiatric alterations, in order to identify new targets for the development of potential preventive and/or therapeutic strategies aiming to reduce these alterations. To do so, rodent models of obesity such as the *db/db* mice, which display severe obesity associated with classical features of metabolic syndrome, can be particularly useful. Indeed, these mice display anxiety-like behavior and cognitive alterations, together with neurobiological dysfunctions including chronic low-grade neuroinflammation and impaired hippocampal neuronal plasticity. We therefore used this model to first target inflammation, in order to assess its involvement in these behavioral alterations. Second, we have investigated whether a nutritional intervention with n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and antioxidants, which are well-known to display anti-inflammatory and neuroprotective properties, improved obesity-associated neuropsychiatric alterations. In addition, we have measured the consequences of chronic administration of the prebiotic oligofructose on the behavioral alterations displayed by *db/db* mice since previous studies pointed to the gut microbiota as an important player in the regulation of behavior. Finally, we have investigated the potential underlying mechanisms by measuring the impact of this treatment on the metabolism and systemic inflammation, but also on neurobiological systems known to be involved in the control of food intake and behavior.

We first showed that an anti-inflammatory treatment or caloric restriction reduced anxiety-like behaviors, and this was associated with a selective decrease of hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression, suggesting that this pro-inflammatory cytokine likely contributes to induce anxiety-like behavior associated with obesity. We then nicely confirmed this assumption by showing that selectively blocking brain TNF- $\alpha$  by chronically administering etanercept i.c.v. (TNF- $\alpha$  decoy receptor) indeed decreased anxiety-like behaviors in obese *db/db* mice. Interestingly, we showed by electrophysiological studies that this behavioral

improvement involved etanercept-induced modulation of spontaneous activity in the ventral hippocampus, which is a brain area known to participate to mood regulation.

Secondly, we tried identifying new preventive and/or therapeutic strategies aiming to improve mood and cognitive alterations associated with obesity. Hence, we measured if an n-3 polyunsaturated fatty acids/antioxidants enriched diet, well-known to modulate different neurobiological mechanisms potentially involved in behavioral alterations displayed by *db/db* mice, improved their behavioral alterations. We showed that chronic consumption of this diet reversed hippocampus-dependent spatial memory deficits displayed by *db/db* mice in a water-maze task and that this effect likely involved modulation of neuronal plasticity.

Thirdly, we tested whether manipulating the gut microbiota composition may constitute a preventive and/or therapeutic strategy to improve the neuropsychiatric alterations associated with obesity. Hence, we assessed for the first time the effect of microbiota manipulation with a prebiotic on the metabolic and behavioral alterations displayed by *db/db* mice, but also on their systemic and neurobiological correlates. We showed that improvement of metabolic alterations following prebiotic administration in *db/db* mice was associated with selective reduction of peripheral and central inflammation, which is however not accompanied by detectable improvement of anxiety-like behavior or spatial memory deficits.

To conclude, these experiments contribute to show that inflammation, and especially TNF- $\alpha$ , could be an important target to develop therapeutic treatments for mood alterations associated with obesity, whereas nutritional interventions with selective nutrients of interest may rather help preventing associated metabolic and/or cognitive alterations.

Key words: obesity, mood alterations, cognition, neuroinflammation, TNF- $\alpha$ , neuronal plasticity, n-3PUFAs, antioxidants, prebiotics

---

Laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro)

UMR INRA 1286

146 Rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX Cedex - FRANCE

# **TABLE DES MATIERES**



<b>RESUME</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	<b>19</b>
<b>AVANT PROPOS</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>25</b>
<b>I- Obésité</b>	<b>27</b>
A. Généralités	27
1. Définition et caractérisation	27
2. Prévalence et causes	28
3. Rappels sur la régulation de la prise alimentaire	30
i. La leptine	32
ii. L'insuline	33
B. Troubles associés à l'obésité	35
1. Altérations métaboliques et comorbidités associées	36
2. Obésité et dérégulations de l'axe corticotrope	37
i. L'axe corticotrope en conditions physiologiques	37
ii. L'axe corticotrope en conditions d'obésité	39
3. Obésité et inflammation à bas bruit	40
i. La réponse inflammatoire en conditions physiologiques	41
• Immunité innée et adaptative	41
• Réaction de phase aigüe	43
• Les cytokines : acteurs moléculaires de l'inflammation	44
• Réaction inflammatoire locale	48
• Réaction inflammatoire systémique	48
• Réaction inflammatoire centrale	49
ii. L'obésité : une pathologie inflammatoire chronique à bas bruit	51
4. Interactions entre inflammation et axe corticotrope	54
i. En conditions physiologiques	55
ii. Dans un contexte d'obésité	55



<b>II- Obésité et comorbidités neuropsychiatriques</b>	<b>57</b>
A. Altérations cognitives	58
1. La mémoire	58
i. Plasticité synaptique hippocampique et mémoire	60
ii. Neurogenèse hippocampique et mémoire	62
2. Obésité et mémoire	63
i. Chez l'Homme	63
ii. Dans des modèles d'obésité chez le rongeur	64
B. Troubles de l'humeur	65
1. La dépression	66
2. L'anxiété	67
3. Rôle de l'hippocampe ventral dans les troubles de l'humeur	67
4. Obésité et troubles de l'humeur	68
i. Chez l'Homme	68
ii. Dans des modèles d'obésité chez le rongeur	70
C. Mécanismes sous-tendant les altérations comportementales associées à l'obésité	71
1. L'axe corticotrope	71
2. L'inflammation	74
<b>III-La nutrition : une stratégie thérapeutique non pharmacologique</b>	<b>80</b>
A. Les acides gras polyinsaturés (AGPI)	81
1. Généralités	81
2. AGPI n-3 et troubles neuropsychiatriques	83
B. Les antioxydants	85
1. Généralités sur les antioxydants	86
2. Antioxydants et troubles neuropsychiatriques	87
C. Les prébiotiques	88
1. Généralités sur les prébiotiques	88
2. Prébiotiques et troubles neuropsychiatriques	89
<b>OBJECTIFS</b>	<b>91</b>
<b>OBJECTIVES</b>	<b>97</b>
<b>DEMARCHE EXPERIMENTALE</b>	<b>101</b>
<b>I- Choix du modèle utilisé</b>	<b>103</b>

## **TABLE DES MATIERES**

A. Modèles d'obésité induite par le régime	103
B. Modèles monogéniques d'obésité	104
1. Mutation spontanée <i>ob/ob</i>	104
2. Mutation spontanée <i>db/db</i>	104
<b>II- Choix des tests comportementaux</b>	<b>106</b>
A. Evaluation de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe	106
1. Labyrinthe aquatique de Morris (ou de la Piscine de Morris)	106
2. Labyrinthe en Y	107
B. Evaluation des comportements de type anxieux	108
1. Test de champ ouvert (ou Open Field)	108
2. Test du labyrinthe en croix surelevé (ou Elevated Plus Maze)	109
3. Test de la boîte claire/obscur (ou Light/Dark Box)	109
<b>III-Choix des stratégies anti-inflammatoires</b>	<b>110</b>
A. Restriction alimentaire	110
B. Administration d'ibuprofène	111
C. Inhibition du TNF- $\alpha$ cérébral par l'Etanercept	111
<b>IV- Choix des régimes</b>	<b>112</b>
A. AGPI n-3 et antioxydants	112
B. Oligofructose	113
<b>RESULTATS</b>	<b>115</b>
- Brain TNF- $\alpha$ mediates anxiety-like behavior in a mouse model of besity	117
- Omega-3/antioxydants supplemented diet improves cognitive alterations associated with obesity	153
- Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome	193
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>236</b>
<b>I- Synthèse des principaux résultats</b>	<b>238</b>
<b>II- Rôle de l'inflammation dans les altérations émotionnelles associées à l'obésité</b>	<b>239</b>
A. Altérations émotionnelles associées à l'obésité	240

B. Inflammation et obésité _____	241
C. Rôle du TNF- $\alpha$ hippocampique dans les comportements de type anxieux associés à l'obésité _____	244
<b>III-Approches nutritionnelles et altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité _____</b>	<b>247</b>
A. Altérations métaboliques associées à l'obésité _____	248
B. Approches nutritionnelles, altérations métaboliques et mécanismes biologiques associés _____	250
C. Altérations cognitives associées à l'obésité _____	252
D. Approches nutritionnelles, altérations comportementales et mécanismes neurobiologiques associés _____	254
<b>IV- Conclusion générale et perspectives _____</b>	<b>258</b>
<b>V- General conclusion and perspectives _____</b>	<b>260</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>264</b>
<b>ANNEXES _____</b>	<b>298</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

$\alpha$ MSH : *alpha-melanocytes stimulating hormone*  
AA : acide arachidonique  
ACTH : *adrenocorticotropic hormone*  
AGMI : acide gras monoinsaturé  
AGPI : acide gras polyinsaturé  
ARC : *arcuate nucleus*  
AgRP : *agouti-related peptide*  
AGS : acide gras saturé  
ALA : acide  $\alpha$ -linoléinique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
APP : *acute phase protein*  
AVP : arginine vasopressine  
BH4 : tétrahydrobiopterine  
BHE : barrière hémato-encéphalique  
CART : *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*  
CD : cluster de différentiation  
CoQ10 : co-enzyme Q10  
CRH : *corticotrophin releasing hormone*  
CRP : *C-reactive protein*  
DAMP : *danger-associated molecular patterns*  
DG : *dentate gyrus*  
DHA : *docosahexaenoic acid*  
DIO : *diet-induced obesity*  
DLT : dépression à long terme  
DSM-V : *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5<sup>e</sup> édition  
DT2 : diabète de type 2  
EPA : *eicosapentaenoic acid*  
FADD : *Fas-associated death domain protein*  
G6P : Glucose-6-phosphate  
GABA : *gamma-aminobutyric acid*  
GC : glucocorticoids  
GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*  
GLUT 2 : *glucose transporter 2*  
gp : glycoprotéine  
GR : récepteur aux glucocorticoïdes  
GTP-CH1 : GTP-cyclohydrolase 1  
HDL : *high-density lipoprotein*  
HSP : *heat shock protein*  
ICE : *Il-1 $\beta$  converting enzyme*  
IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase  
IFN : interféron  
IFNAR : *interferon alpha receptor*  
IFNGR : *interferon gamma receptor*  
IL : interleukine

IL-1Ra : *interleukin-1 receptor antagonist*  
IL-6R : *interleukin-6 receptor*  
IMC : indice de masse corporelle  
IR : *insulin receptor*  
IRS : *insulin receptor substrate*  
JAK : *janus kinases*  
LA : *linoleic acid*  
LPS : lipopolysaccharide  
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*  
MCP-1 : *monocytes chemoattractant protein-1*  
mEPSC : *miniature excitatory post-synaptic current*  
MR : récepteur aux minéralocorticoïdes  
NFκB : *nuclear factor-kappa B*  
NGF : *nerve growth factor*  
NIH : *national institute of health*  
NMDA : *N-methyl-D-aspartate*  
NPY : neuropeptide Y  
NT-3 : neutrophine 3  
NTS : noyau du tractus solitaire  
Ob-R : récepteur de la leptine  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*  
PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*  
PKB : *protein kinase B*  
PLT : potentialisation à long terme  
POMC : *pro-opiomelanocortin*  
PPARγ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*  
PRR : *pattern-recognition receptor*  
PVN : *paraventricular nucleus*  
RTH : ratio taille/hanches  
SAA : *serum amyloid A*  
SNC : système nerveux central  
STAT : *signal transducer and activator of transcription*  
TACE : *TNF-α-converting enzyme*  
tmTNF : TNF transmembranaire  
TNF : *tumor necrosis factor*  
TNF-R : *TNF-receptor*  
TRADD : *TNF-R1-associated death domain protein*  
TRAF2 : *TNF-R-associated factor 2*  
VMN : *ventromedial nucleus*

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

- Figure 1 : Répartition de la masse grasse chez la femme et l'homme (cliniquedelobesite.com)
- Figure 2 : Répartition mondiale du nombre d'adultes obèses de sexe masculin en pourcentage de la population (OMS, 2014)
- Figure 3 : Schéma de (A) la localisation de l'hypothalamus dans le cerveau humain et (B) la localisation des noyaux hypothalamiques
- Figure 4 : Voie de signalisation de l'insuline
- Figure 5 : Schéma simplifié de l'action de l'insuline et de la leptine sur la régulation de la prise alimentaire (adapté de Varela and Horvath, 2012)
- Figure 6 : Axe corticotrope et glucocorticoïdes
- Figure 7 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire
- Figure 8 : Récepteurs du TNF- $\alpha$  et leurs voies de signalisation (adapté de Urschel and Cicha 2015)
- Figure 9 : Schéma simplifié des cytokines et de leurs voies de signalisation
- Figure 10 : Voies d'accès des cytokines de la périphérie au cerveau (Capuron and Miller, 2011)
- Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la mise en place de l'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité (Castanon 2014)
- Figure 12 : Communication bidirectionnelle entre le système immunitaire et l'axe corticotrope (adapté de Irwin and Cole 2011)
- Figure 13 : Classification des systèmes de la mémoire à long terme (Henke 2010)
- Figure 14 : Localisation de l'hippocampe dans le cerveau de rongeur et schéma des connexions synaptiques
- Figure 15 : Schéma de la PLT dépendante des récepteurs NMDA (Source : Sciences et Avenir)
- Figure 16 : Neurogenèse hippocampique et marqueurs associés (adapté de Manns et al., 2011)

Figure 17 : Modulation de l'activité de l'IDO et de la GTP-CH1 par les cytokines (Capuron et al., 2016)

Figure 18 : Voies de synthèse des AGPI n-3 et n-6 (adapté de Bazinet and Layé 2014)

Figure 19 : Etapes du protocole utilisé dans le test de la piscine de Morris (Bensalem et al., 2016)

Figure 20 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y

Figure 21 : Test de champ ouvert (ou Open Field) (source : ncnj.go.jp)

Figure 22 : Schéma du labyrinthe en croix surélevé (source : biotechniques.com)

Figure 23 : Schéma de la boîte claire/obscur (source : btc.psych.ucla.edu)

Figure 24 : Différents mécanismes sont impliqués dans la régulation des altérations émotionnelles et cognitives associées à l'obésité / Different mechanisms are involved in the emotional and cognitive alterations associated with obesity

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1 :** Les troubles de l'humeur associés à l'obésité et au diabète de type 2 : rôle de la neuroinflammation. *Diabète et Obésité*, Volume 10, n°93. (Fourrier C., Castanon N., and Layé S. (2015))

**Annexe 2 :** Rôle de l'inflammation dans la dépression associée au diabète. *Nutrition et Endocrinologie*. Volume 13, n°73. (Fourrier C., Castanon N., and Layé S. (2015))

**Annexe 3 :** Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl Psychiatry* 4, e437. (Larrieu T., Hilal M.L., Fourrier C., De Smedt-Peyrusse V., Sans N., Capuron L., and Layé S. (2014))





## **AVANT PROPOS**



Aujourd'hui, l'obésité est devenue une véritable pandémie au niveau mondial puisque sa prévalence ne cesse d'augmenter, non seulement dans les pays à revenus élevés mais également dans les pays à revenus faibles et moyens. Elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». En effet, l'obésité est associée à de multiples altérations biologiques, telles que des troubles métaboliques (hyperglycémie, insulino-résistance...), qui augmentent le risque de développer des comorbidités comme des maladies cardiovasculaires, des troubles musculo-squelettiques invalidants et certains cancers (Despres and Lemieux, 2006; Whiteman and Wilson, 2016). Outre les altérations métaboliques, l'obésité sévère est associée à un plus grand risque de développer des altérations neuropsychiatriques telles que la dépression, des troubles anxieux et des altérations cognitives (Alosco and Gunstad, 2014; Lasselin and Capuron, 2014). Chez le sujet obèse, les troubles neuropsychiatriques compliquent la prise en charge médicale du patient : en effet, la mauvaise estime de soi et l'auto-négligence qui résultent de ces troubles participent au mauvais suivi des traitements et des recommandations d'hygiène et de diététique, avec un impact considérable sur la qualité de vie des patients (Brunault et al., 2012). Ces altérations neuropsychiatriques sont également un facteur de risque pour le développement d'autres comorbidités, dont les risques cardiovasculaires. De plus, une relation bidirectionnelle existe entre l'obésité et la dépression, participant à la mise en place d'un cercle vicieux entre les deux pathologies. En effet, le développement d'une obésité chez des patients dépressifs participe à l'aggravation des symptômes neuropsychiatriques. La compréhension des mécanismes impliqués dans cette relation entre l'obésité et les troubles neuropsychiatriques est donc nécessaire afin d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients.

Bien que différents mécanismes neurobiologiques puissent avoir un rôle dans la mise en place des troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité, des études récentes réalisées au laboratoire et dans d'autres équipes, tant chez l'Homme que chez l'animal, ont mis en évidence un rôle de l'inflammation dans ce processus (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2014; Castanon et al., 2015). L'obésité est en effet associée à une inflammation chronique dite à bas bruit, qui se traduit par des concentrations circulantes de facteurs inflammatoires (dont les cytokines) supérieures à celles observées chez des sujets non obèses. Les cytokines ainsi libérées dans la circulation peuvent agir à distance sur différents organes dont le cerveau et entraîner la production de cytokines cérébrales par les cellules gliales, ceci y compris dans des structures clés dans la régulation de l'humeur et de la cognition, en particulier l'hippocampe

(Capuron and Miller, 2011). Dans ces structures, les cytokines sont capables de moduler différents mécanismes neurobiologiques impliqués dans la régulation de la cognition et des réponses émotionnelles, dont le métabolisme et la fonction de certains neurotransmetteurs, l'activité de l'axe corticotrope et la plasticité neuronale. Lors d'une infection, la synthèse transitoire de cytokines cérébrales coordonne un ensemble de changements comportementaux (anorexie, fatigue, altérations transitoires de la cognition et de l'humeur...) regroupés sous le terme de « comportement de maladie » (Dantzer, 2001). Nécessaire à la résolution de l'infection, le comportement de maladie est généralement réversible et ne dure que jusqu'à ce que le pathogène soit éliminé et que le système inflammatoire ne soit plus activé. Cependant, des conditions telles que l'obésité sont caractérisées par une activation prolongée du système immunitaire cérébral, conduisant ainsi à des altérations chroniques des systèmes impliqués dans la régulation du comportement.

Afin d'améliorer les altérations comportementales associées à l'obésité, la mise en place de stratégies préventives et/ou thérapeutiques non pharmacologiques telles que des approches nutritionnelles revêt un intérêt particulier (Blackburn, 1995; Goldstein, 1992). En effet, des modifications du mode de vie, notamment des habitudes alimentaires, ont un effet bénéfique sur la santé, en particulier chez des sujets obèses. Par exemple, des nutriments tels que les acides gras polyinsaturés de type n-3, les antioxydants ou ceux présents dans les prébiotiques pourraient représenter une stratégie intéressante puisqu'ils peuvent agir de manière non spécifique et avoir un impact à la fois sur le métabolisme, l'inflammation, l'axe corticotrope et les troubles neuropsychiatriques.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a visé à identifier les mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'apparition des troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité, dans le but d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques permettant de réduire ces altérations chez le patient obèse.

# **INTRODUCTION GENERALE**



## I. Obésité

### A. Généralités

#### 1. Définition et caractérisation

L'**obésité** et le surpoids sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une « accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». L'**indice de masse corporelle (IMC)** est une mesure simple du surpoids et de l'obésité couramment utilisée chez l'adulte, basée sur le rapport du poids par la taille. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille et s'exprime en kg/m<sup>2</sup>. L'IMC d'une personne de corpulence normale est compris entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>. Lorsque cet indice est compris entre 25,0 et 29,9 kg/m<sup>2</sup>, on considère que la personne est en surpoids et un indice supérieur à 30,0 kg/m<sup>2</sup> est caractéristique d'une obésité. Celle-ci est ensuite subdivisée en obésité de grade I (modérée ou commune) entre 30,0 et 34,9 kg/m<sup>2</sup>, de grade II (sévère) entre 35,0 et 39,9 kg/m<sup>2</sup> et de grade III (massive ou morbide) lorsque l'IMC est supérieur à 40,0 kg/m<sup>2</sup>. Bien que le calcul de l'IMC soit une méthode acceptée pour définir le surpoids et l'obésité, cet indice ne prend pas en compte le degré d'**adiposité** de l'individu et peut conduire à des conclusions erronées. Par exemple, une personne peut avoir un IMC supérieur à 30,0 kg/m<sup>2</sup> car il a une masse musculaire élevée mais ne pas être obèse. Il est donc important de prendre en compte les proportions de masse grasse, de tissu osseux, de tissu musculaire et de l'eau composant l'organisme. Certains indices, tels que le rapport entre le tour de taille et le tour de hanche (RTH pour ratio taille/hanches) tiennent compte de cette adiposité. Le RTH, qui doit être inférieur à 1 chez l'homme et à 0,85 chez la femme, permet de prendre en compte les différences de répartition de la masse grasseuse entre les hommes et les femmes. En effet, les hommes sont généralement caractérisés par une obésité de type androïde, avec une accumulation de **tissu adipeux** dans la région abdominale et de la poitrine (rappelant une forme de pomme), alors que les femmes sont caractérisées par une obésité de type gynoïde, avec une accumulation de masse grasse au niveau des hanches, des cuisses et des fesses (rappelant une forme de poire) (Fig. 1). Pour une quantité de masse grasse similaire, l'accumulation de tissu adipeux viscéral sera environ deux fois plus importante chez les hommes que chez les femmes. La répartition de la masse grasse chez l'homme, en particulier cette accumulation de tissu adipeux viscéral, est un important facteur de risque pour les comorbidités associées à l'obésité. En revanche, l'obésité gynoïde, et l'accumulation



de tissu adipeux sous-cutané, est moins délétère (Blouin et al., 2008; Mogensen, 2009; Shi and Clegg, 2009).

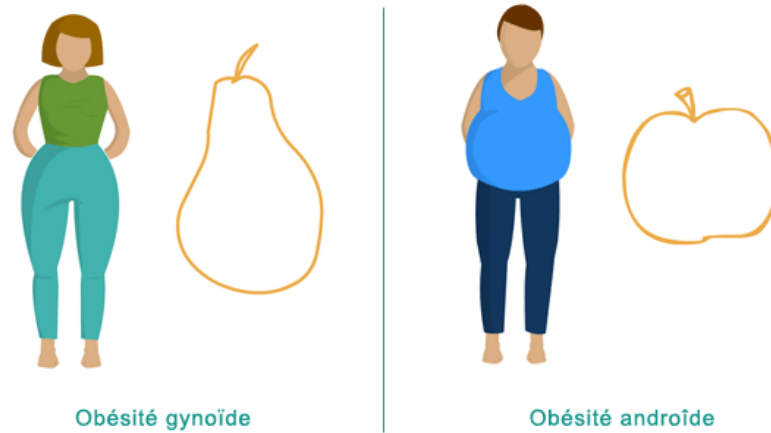


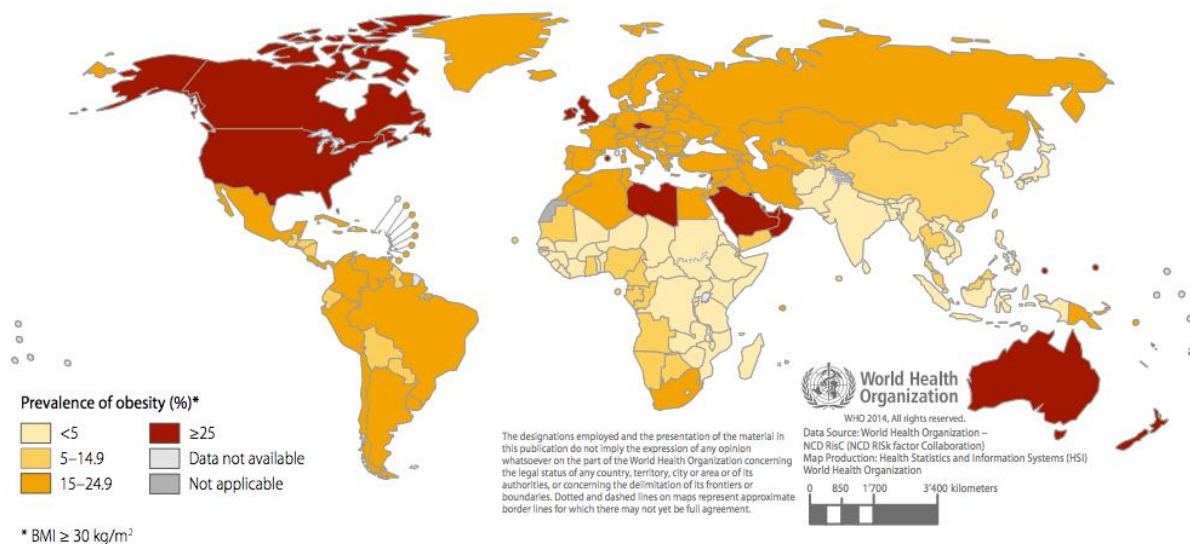
Figure 1 : Répartition de la masse grasse chez la femme et l'homme (cliniquedelobesite.com)

### 2. Prévalence et causes

Bien que longtemps considérés comme des problèmes spécifiques des pays à revenus élevés, le surpoids et l'obésité sont désormais en augmentation dans les pays à revenus faibles et moyens. La prévalence de l'obésité au niveau mondial ne cesse d'augmenter, au point que de nos jours, l'obésité est devenue une véritable pandémie (épidémie étendue à toute la population d'un continent, voire au monde entier). D'après de récentes estimations de l'OMS, le nombre de cas d'obésité dans le monde a plus que doublé depuis les années 1980. En 2014, 39 % des adultes âgés de 18 ans et plus (soit plus d'1,9 milliard d'adultes) étaient en surpoids et 13 % étaient obèses (soit plus de 600 millions d'individus) (Fig. 2). A la même période, 41 millions d'enfants de moins de 5 ans dans le monde étaient en surpoids ou obèses (OMS, 2014). En France, près de 15 millions des individus âgés de 18 ans et plus (32,3 % de la population) étaient en surpoids en 2012 et près de 7 millions étaient obèses (15 % de la population) (source : étude ObEpi-Roche 2012 réalisée auprès de 25 714 français de 18 ans et plus).

Les causes de l'obésité sont nombreuses et multifactorielles : en effet, l'obésité résulte d'une relation complexe entre des facteurs biologiques, psychologiques, comportementaux et environnementaux (Apovian, 2016). La cause fondamentale de l'obésité est un dérèglement de la balance énergétique. Pour maintenir son poids corporel, un individu doit maintenir un équilibre entre la quantité de calories ingérées, *via* l'alimentation et les boissons, et la quantité

de calories dépensées par le corps lors de la respiration, de la digestion et de l'activité physique. Le surpoids et l'obésité résultent principalement d'une quantité de calories ingérées supérieure à la quantité de calories dépensées. Le mode de vie actuel associe en effet une augmentation de la consommation d'aliments riches en calories, facilement accessibles et bon marché, à une diminution de l'activité physique (Jaworowska et al., 2013) liée en particulier à l'augmentation du temps passé devant des écrans et l'utilisation presque systématique de véhicules motorisés pour les déplacements (Oppert and Charreire, 2012). En plus de ces facteurs environnementaux, des facteurs génétiques peuvent également être impliqués dans le développement de l'obésité. Ainsi, 12 *loci* associés à un risque plus élevé de devenir obèse ont été identifiés (Li et al., 2010). De plus, les risques d'obésité sont augmentés si l'un des parents ou les deux sont obèses. Cependant, les enfants partageant les habitudes de vie de leurs parents (type d'alimentation, fréquence des activités physiques, etc.), la transmission de l'obésité entre générations dépend vraisemblablement à la fois de facteurs génétiques et des habitudes familiales. Enfin, d'autres facteurs tels que le stress, l'âge, le manque de sommeil, certaines maladies endocriniennes et métaboliques (ex : syndrome de Cushing) et la prise chronique de traitements médicamenteux peuvent également contribuer au développement de l'obésité (McAllister et al., 2009).



**Figure 2 : Répartition mondiale du nombre d'adultes obèses de sexe masculin en pourcentage de la population (OMS, 2014)**

### 3. Rappels sur la régulation de la prise alimentaire

Des altérations des mécanismes contribuant à réguler la prise alimentaire sont sans aucun doute impliquées dans la mise en place de l'obésité. La compréhension de ces processus physiologiques est donc une question fondamentale.

Pour la majorité d'entre nous, la composition et la quantité de ce que nous mangeons varient d'un repas à l'autre et d'un jour à l'autre. Les émotions, les facteurs sociaux et l'heure de la journée, sont autant de facteurs qui régulent à court terme ce que nous mangeons. Cependant, alors que chaque individu ingère en moyenne 60 tonnes de nourriture au cours de sa vie, son poids en tant qu'adulte reste relativement stable. Cette régulation du poids corporel se fait grâce à un phénomène nommé « **homéostasie énergétique** », qui implique un ensemble de processus permettant un équilibre entre les apports énergétiques et les dépenses et le maintien du poids corporel autour d'une constante. Le physiologiste Claude Bernard a été le premier à introduire ce concept d'homéostasie avec le terme « milieu intérieur » il y a plus de 150 ans. Il est également le premier à avoir suggéré que le **système nerveux central** (SNC) régule directement la concentration de glucose dans le sang. Par la suite, des études ont confirmé un rôle du glucose, ainsi que d'autres signaux périphériques, dans la régulation centrale des dépenses énergétiques, de l'homéostasie du glucose et du comportement alimentaire. La principale fonction du comportement alimentaire est d'assurer l'apport de substrats énergétiques et de composés biochimiques nécessaires au bon fonctionnement de l'ensemble des cellules de l'organisme. Le comportement alimentaire comprend une phase préprandiale, caractérisée par la sensation de faim et qui aboutit à la recherche et à la sélection de nourriture. Elle est suivie de la phase prandiale qui correspond à la consommation de nourriture. Pendant cette phase, le besoin de manger diminue progressivement au cours de l'ingestion des aliments. Enfin, la phase postprandiale est caractérisée par un état de satiété dont la durée est variable et qui détermine l'intervalle entre les repas. En 1973, Gibbs et Smith suggèrent que des signaux produits pendant la phase prandiale, appelés facteurs de satiété, fournissent des informations au cerveau afin d'inhiber la prise alimentaire (Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000).

Le cerveau est un organe essentiel dans la détection et l'intégration des signaux métaboliques provenant des différents tissus de l'organisme. Il doit être capable de réguler non seulement la prise alimentaire et le poids corporel, mais également les apports en nutriments, en particulier en glucose (Cota et al., 2007; Sandoval et al., 2008). Le contrôle de

la prise alimentaire a lieu notamment au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) du tronc cérébral, qui reçoit des afférences sensorielles gustatives et viscérales, et de **l'hypothalamus**. L'hypothalamus est une structure majeure du cerveau qui reçoit et intègre des informations venant de la périphérie (Fig. 3A). Parmi les noyaux hypothalamiques, le noyau arqué (ARC) est un acteur important de la régulation métabolique : localisé dans l'hypothalamus médiobasal, le ARC (Fig. 3B) peut détecter des signaux provenant de la circulation grâce à la proximité de l'éminence médiane où la barrière hémato-encéphalique (BHE) est perméable, notamment aux hormones métaboliques circulantes. Deux populations neuronales majoritaires dans le ARC participent à la régulation du métabolisme. La première produit les peptides anorexigènes (qui inhibent l'appétit)  $\alpha$ MSH (*alpha-melanocytes-stimulating hormone*), dérivé du précurseur POMC (*pro-opiomelanocortin*), et CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*). L'autre population neuronale produit les peptides orexigènes (qui stimulent l'appétit) NPY (neuropeptide Y) et AgRP (*agouti-related peptide*) (Coll and Loraine Tung, 2009; Stanley et al., 2005). Par ailleurs, il a été décrit que des délétions génétiques de POMC, AgRP ou NPY dans le ARC induisaient des troubles métaboliques modérés ou sévères. Les signaux métaboliques détectés par le ARC sont ensuite relayés vers des régions hypothalamiques de second ordre, parmi lesquelles le noyau paraventriculaire (PVN) et le noyau ventromédian (VMN) (Fig. 3B), qui contrôlent l'homéostasie énergétique (Jastroch et al., 2014). L'activité des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire est finement régulée par des signaux périphériques provenant du tissu adipeux, du pancréas et du système gastro-intestinal. Parmi ces signaux périphériques, nous détaillerons seulement les rôles de **la leptine** et de **l'insuline**. En effet, le modèle d'obésité que nous avons choisi d'utiliser au cours de cette thèse, la souris *db/db*, est caractérisé par une mutation spontanée inactivant le récepteur de la leptine, empêchant ainsi les effets physiologiques de cette hormone. L'insuline quant à elle, possède au-delà de son activité dans le métabolisme, un rôle dans la régulation de la mémoire et des réponses émotionnelles, auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse.

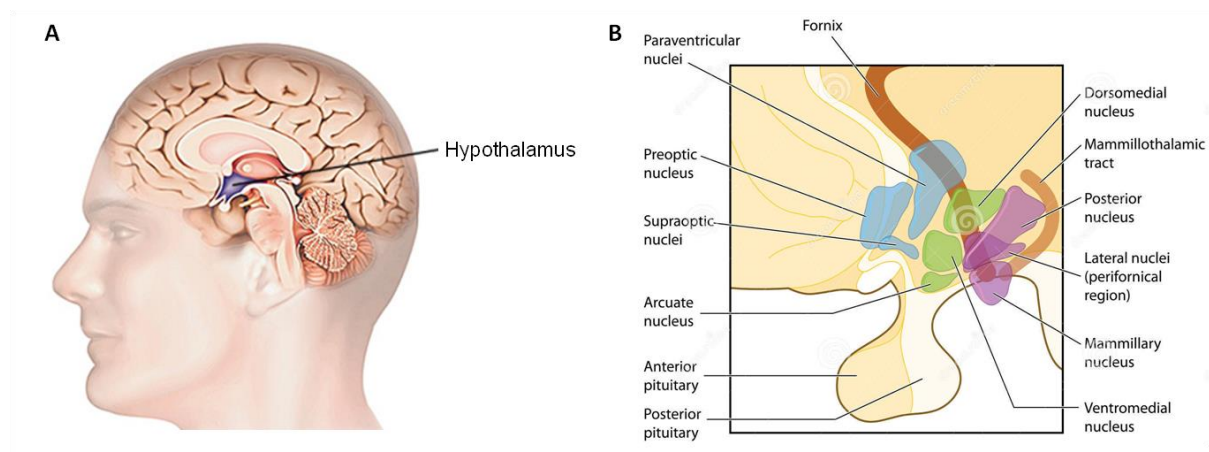


Figure 3 : Schéma de (A) la localisation de l'hypothalamus dans le cerveau humain et (B) la localisation des noyaux hypothalamiques

*i. La leptine*

La leptine (du grec *leptos*, mince) est une hormone peptidique de 16 kDa. Cette hormone est le produit du gène *ob* qui est exprimé de façon prédominante dans les adipocytes mais aussi, dans une moindre mesure, dans l'épithélium intestinal, le placenta, et différentes structures cérébrales, notamment l'hypothalamus et l'hypophyse (Considine, 2001; Jin et al., 1999).

La leptine est une hormone anorexigène dont la production est modulée par la prise alimentaire : une diminution de la prise alimentaire diminue les taux circulants de leptine, qui sont à l'inverse restaurés suite à la consommation de nourriture ou à l'administration d'insuline. La leptine agit *via* un récepteur transmembranaire de la famille du récepteur de l'**interleukine** (IL)-6. Par épissage alternatif de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) et modifications post-traductionnelles, de multiples isoformes du récepteur de la leptine (Ob-R) sont obtenus. Ils peuvent être classifiés en 3 formes : longue, courte et sécrétée (ou soluble). La leptine circulante peut traverser la BHE, par un mécanisme impliquant probablement les formes courtes du récepteur Ob-R (Boado et al., 1998). La forme sécrétée du récepteur Ob-R pourrait, quant à elle, se fixer à la leptine circulante et ainsi moduler sa biodisponibilité et donc son activité (Lammert et al., 2001). Enfin, la forme longue, Ob-Rb, possède un domaine intracellulaire de longue taille, qui interagit avec des protéines impliquées dans des voies de signalisation cellulaire notamment responsables de la survie et de la prolifération cellulaire. Parmi ces protéines, la voie de signalisation implique la protéine de type tyrosine kinase *janus kinase* (JAK)-2 et le facteur de transcription **STAT-3** (*signal transducer and activator of transcription 3*). L'effet de la leptine sur la régulation de la prise alimentaire se fait par la

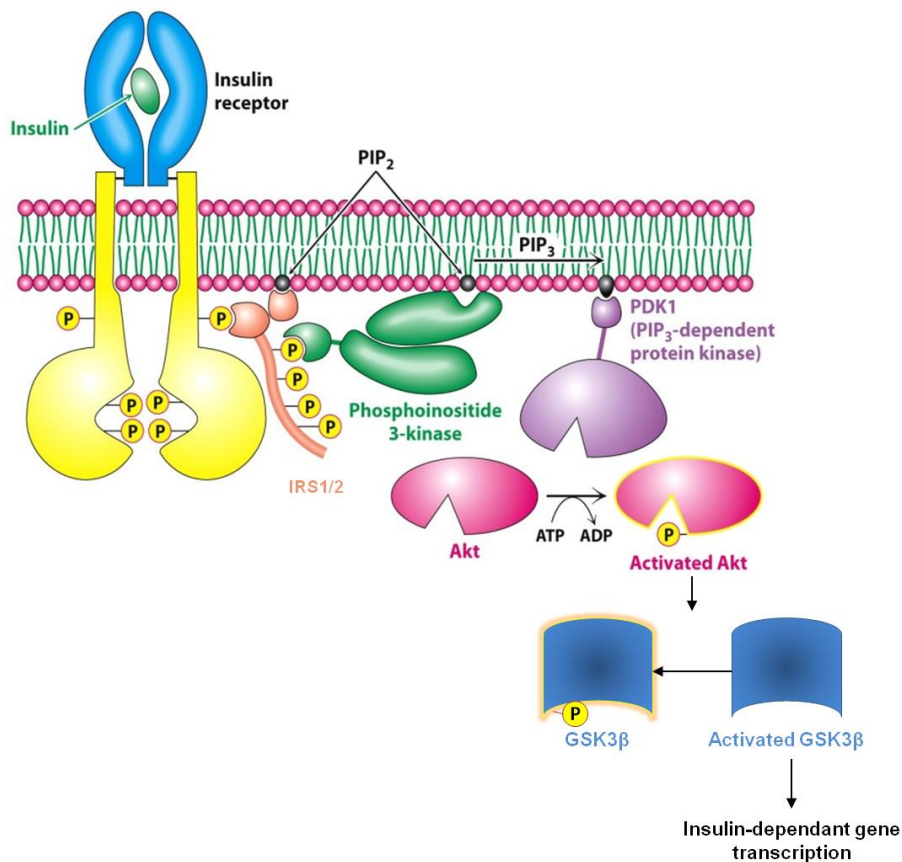
fixation de l'hormone sur son récepteur Ob-Rb (Vaisse et al., 1996). Cette forme est très exprimée dans l'hypothalamus, en particulier dans les ARC, VMN et dorsomédian (Fig. 3B). Dans le ARC, l'ARNm du récepteur Ob-Rb est exprimé dans les neurones NPY/AgRP et POMC/CART, dont nous avons précédemment décrit le rôle dans la régulation de la prise alimentaire : la leptine inhibe l'activité des neurones orexigènes NPY/AgRP et diminue l'expression de ces deux peptides. En parallèle, elle active les neurones anorexigènes POMC/CART (Fig. 5). Ainsi, dans des conditions telles que la restriction alimentaire, dans lesquelles les taux circulants de leptine sont faibles, les neurones NPY/AgRP sont activés et l'expression de ces peptides est augmentée. Au contraire, lorsque les niveaux plasmatiques de leptine sont élevés, comme c'est le cas en phase postprandiale, les neurones POMC/CART sont activés (Ebihara et al., 1999; Schwartz et al., 1997).

L'absence de leptine a des effets importants sur le poids corporel (Fried et al., 2000). Ainsi, les souris *ob/ob*, qui sont totalement dépourvues de leptine suite à une mutation du gène *ob*, développent une hyperphagie associée à un phénotype d'**obésité sévère**. De même, une déficience en leptine chez l'Homme provoque une obésité sévère, qui peut être améliorée par une administration chronique de leptine (Farooqi et al., 2002; Heymsfield et al., 1999). De façon similaire, une déficience pour le gène codant pour le récepteur de la leptine induit une prise de poids importante, comme c'est le cas dans un **modèle murin d'obésité**, la souris *db/db*. Bien qu'une petite proportion des patients obèses ait une déficience de production de leptine, la majorité des individus obèses ont au contraire des taux plasmatiques de leptine élevés. Cette observation suggère que l'obésité soit plus associée à une résistance à la leptine qu'à un déficit de production. En effet, une administration de leptine chez un modèle rongeur d'obésité induite par le régime ne permet pas de réduire la prise alimentaire (Friedman and Halaas, 1998).

### *ii. L'insuline*

L'insuline est une hormone peptidique de 6 kDa sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. A la périphérie, l'insuline a un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie du glucose, notamment dans sa recapture et son stockage. La production d'insuline augmente rapidement après la consommation d'un repas. Tout comme la leptine, elle possède un rôle anorexigène en agissant au sein du SNC. Une administration intra-hypothalamique d'insuline chez le rat diminue la prise alimentaire et le poids corporel et altère l'expression hypothalamique des gènes qui régulent la prise alimentaire. A l'inverse,

une injection d'anticorps dirigés contre l'insuline dans le VMN de l'hypothalamus stimule la prise alimentaire (McGowan et al., 1992). L'insuline entre dans le cerveau par un mécanisme saturable qui implique des récepteurs localisés au niveau de la BHE. Elle peut également être produite localement, mais cette production au niveau central reste minoritaire. L'insuline agit sur son récepteur (IR pour *insulin receptor*) composé d'une sous-unité  $\alpha$  extracellulaire, sur laquelle elle se fixe, et d'une sous-unité  $\beta$  intracellulaire possédant une activité tyrosine kinase. Les récepteurs à l'insuline sont exprimés dans de nombreuses structures cérébrales, en particulier dans des noyaux de l'hypothalamus tels que le ARC et le PVN, mais également dans d'autres structures comme l'**hippocampe** (Schulingkamp et al., 2000). L'activation d'IR induit la phosphorylation des sites tyrosine des protéines IRS-1 et IRS-2 (*insulin-receptor substrate-1* et 2). IRS-2, qui est fortement exprimé dans le ARC, est impliqué dans les effets anorexigènes de l'insuline. Puis, l'activation d'IRS-1 et IRS-2 induit l'activation de la voie de signalisation associée à l'enzyme PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (Fig. 4) (Ghasemi et al., 2013b; Porte et al., 2005). Comme dans le cas de la leptine, les neurones POMC/CART et NPY/AgRP sont des cibles essentielles de l'insuline et sont des médiateurs de l'effet de celle-ci sur l'homéostasie du glucose (Fig. 5) (Varela and Horvath, 2012).



**Figure 4 : Voie de signalisation de l'insuline**



Il est clairement établi qu'une prise de poids diminue la sensibilité à l'insuline. De plus, lorsque le poids augmente, la sécrétion d'insuline augmente en conditions basales, mais également en réponse à une prise alimentaire, ceci afin de compenser cette résistance à l'insuline. Comme pour la leptine, les taux élevés d'insuline dans le plasma de patients obèses suggèrent que l'obésité est associée à une insulino-résistance plus qu'à une déficience en insuline (Stanley et al., 2005).

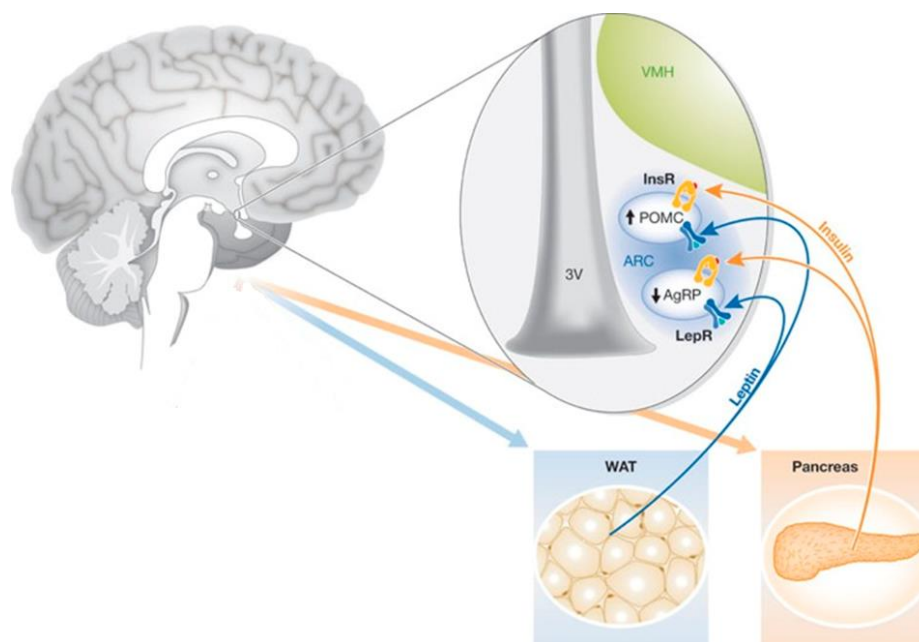


Figure 5 : Schéma simplifié de l'action de l'insuline et de la leptine sur la régulation de la prise alimentaire (adapté de Varela and Horvath, 2012)

### **B. Troubles associés à l'obésité**

L'obésité est associée à de multiples altérations biologiques qui affectent considérablement la qualité de vie du patient. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux altérations de différents systèmes biologiques et neurobiologiques altérés chez les sujets obèses, en particulier aux troubles métaboliques, aux dysfonctionnements de **l'axe corticotrope** et aux dérégulations du **système immunitaire**. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre II, il a été décrit que ces différents systèmes biologiques pouvaient participer au développement des troubles de l'humeur et de la cognition chez des individus obèses. De plus, des systèmes altérés chez les sujets obèses, comme l'axe corticotrope ou le système immunitaire, sont connus pour interagir. Cette interaction peut ainsi conduire à la mise en place d'un cercle vicieux et à l'aggravation des différents troubles associés à l'obésité.



### 1. Altérations métaboliques et comorbidités associées

Une hausse de l'IMC est un facteur de risque majeur de développer des comorbidités telles que des maladies cardiovasculaires (première cause de décès au niveau mondial en 2012), des troubles musculo-squelettiques invalidants comme l'arthrose et certains cancers (OMS). En effet, de 11 à 43 % de certains cancers (vésicule biliaire, œsophage, rein, endomètre) sont attribuables à l'obésité et au surpoids (Whiteman and Wilson, 2016).

L'obésité est également associée à une augmentation du risque de diagnostic d'un **syndrome métabolique** (Despres and Lemieux, 2006). Ce diagnostic est établi lorsque le patient présente au moins trois des cinq critères suivants (*National Institute of Health, NIH*) :

- Obésité abdominale (ou androïde) : l'excès de tissu adipeux au niveau abdominal représente un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires plus important qu'un excès d'adiposité sur une autre partie du corps,
- Hypertriglycémie,
- Faible taux de cholestérol HDL (*high-density lipoprotein*). Le cholestérol HDL permet de conduire le cholestérol des artères vers le foie pour qu'il soit ensuite éliminé,
- Hypertension,
- Hyperglycémie à jeun.

Enfin, l'obésité est l'un des facteurs de risque majeurs du **diabète de type 2 (DT2)**. Les mécanismes sous-tendant cette association semblent impliquer une inflammation du tissu adipeux induisant une résistance à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993). Une étude réalisée aux Etats-Unis montre qu'une obésité sévère (IMC compris entre 30 et 34,9 kg/m<sup>2</sup>) à l'âge de 18 ans prédit 57 % de risques de développer un DT2 au cours de la vie de l'individu, alors que ce risque n'est que de 19,8 % chez un sujet ayant une corpulence normale (IMC entre 20,0 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>) au même âge (Narayan et al., 2007). De plus, 23,6 % des nouveaux cas de DT2 diagnostiqués entre 2006 et 2011 concernaient des individus en surpoids et 47,9 % des individus obèses (Nichols et al., 2015). Le DT2 est caractérisé par une hyperglycémie à jeun et par une diminution de la tolérance au glucose, toutes deux induites par une résistance à l'insuline périphérique et une altération progressive de la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas (Jaacks et al., 2016).

## 2. Obésité et dérégulations de l'axe corticotrope

### i. *L'axe corticotrope en conditions physiologiques*

La survie et le bien-être nécessitent une adaptation permanente aux stimuli externes et aux variations de l'environnement interne (McEwen, 2007). Cette adaptation est possible grâce à l'intégration centrale de signaux sensoriels permettant une coordination des réponses comportementale, autonome et endocrine. L'ensemble de ces réponses va permettre le maintien de l'homéostasie. Une des réponses endocrines majeures est celle de l'axe corticotrope. Lors d'une modification de l'homéostasie, la stimulation des neurones parvocellulaires du PVN de l'hypothalamus induit la libération d'arginine vasopressine (AVP), responsable de la libération de corticolibérine ou CRH (*corticotrophin releasing hormone*). Ces neuropeptides stimulent alors la production de l'hormone adrénocorticotrope ou ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) par l'hypophyse. L'ACTH stimule ensuite les glandes surrénales qui sécrètent alors le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez le rongeur (Fig. 6). Le cortisol et la corticostérone, regroupés sous le terme de **glucocorticoïdes (GC)**, permettent l'initiation d'une réponse adaptative de l'organisme aux changements de l'homéostasie. L'activation de l'axe corticotrope en situations physiologiques se fait de manière autonome, selon un rythme circadien, mais également en réponse à des changements de l'homéostasie (sommeil, prise alimentaire...). De plus, l'exposition à un stress, qu'il soit systémique (ou homéostatique, c'est-à-dire provenant de stimuli physiques, par exemple le froid, l'hypoxie, une hémorragie ou un malaise gastrique) ou bien psychogénique (ou psychologique, c'est-à-dire nécessitant une intégration et une interprétation des stimuli sensoriels, ex : stress de contrainte, stress social, peur) va engendrer une forte activation de l'axe corticotrope (Tsigos and Chrousos, 2002).

Les GC agissent au niveau de leurs tissus cibles en se liant à deux types de récepteurs nucléaires localisés en périphérie et dans le cerveau : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) et **le récepteur aux GC (GR)**. A l'état inactif, les récepteurs aux GC sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexe multiprotéique composé du récepteur et de protéines chaperonnes ou HSP (*heat shock protein*) (Zhou and Cidlowski, 2005). La liaison des GC à leurs récepteurs entraîne la dissociation des HSP et du récepteur, permettant la translocation nucléaire de celui-ci. Dans le noyau, les récepteurs s'associent entre eux pour former des dimères (GR/GR, GR/MR ou MR/MR). Ils peuvent alors induire ou réprimer la transcription de gènes cibles en interagissant avec un élément de réponse aux glucocorticoïdes ou GRE (*glucocorticoid response element*) ou avec d'autres facteurs de transcription déjà présents sur

l'ADN (Zhou and Cidlowski, 2005). Le MR possède une affinité pour les glucocorticoïdes environ 10 fois plus élevée que le GR. Dans le cerveau, l'expression des MR est restreinte aux structures limbiques (dont l'hippocampe). Le GR est quant à lui exprimé de façon quasi-ubiquitaire dans le cerveau, même si son expression est particulièrement élevée dans l'hippocampe (Derijk and de Kloet, 2008). Les GR, moins liés aux GC en conditions basales, vont progressivement être occupés lors d'une hypersécrétion de GC notamment lors d'un stress. Ainsi, la fixation des GC aux GR engendre la plupart des effets physiologiques connus permettant la réponse au stress. Celle-ci regroupe l'ensemble des adaptations psychologiques, comportementales et biologiques mises en place face à un changement de l'environnement interne ou externe (Mormede et al., 2002). Parmi ces effets physiologiques, il a été décrit que l'activation de l'axe corticotrope pouvait induire la production de glucose par le foie, l'inhibition de la synthèse de glycogène et l'inhibition de la recapture de glucose par le muscle et le tissu adipeux. L'exposition à une sécrétion élevée de GC peut quant à elle provoquer une accumulation de tissu adipeux et une diminution de la synthèse d'insuline par le pancréas (Rosmond, 2003). Comme la plupart des systèmes neuroendocriniens, l'axe corticotrope est un système en cascade, avec une boucle de rétroaction négative grâce à laquelle les GC inhibent leur propre sécrétion (Keller-Wood and Dallman, 1984). Ce rétrocontrôle négatif s'effectue au niveau des différentes structures cérébrales constituant l'axe corticotrope et implique l'inhibition, par les GC, de la transcription des gènes conduisant à la synthèse et la libération de la CRH et de l'ACTH. Il a pour but final de réduire la production et la libération des GC dans le sang et ainsi limiter la durée d'exposition des organes cibles à ces hormones, délétères à long terme pour l'organisme.

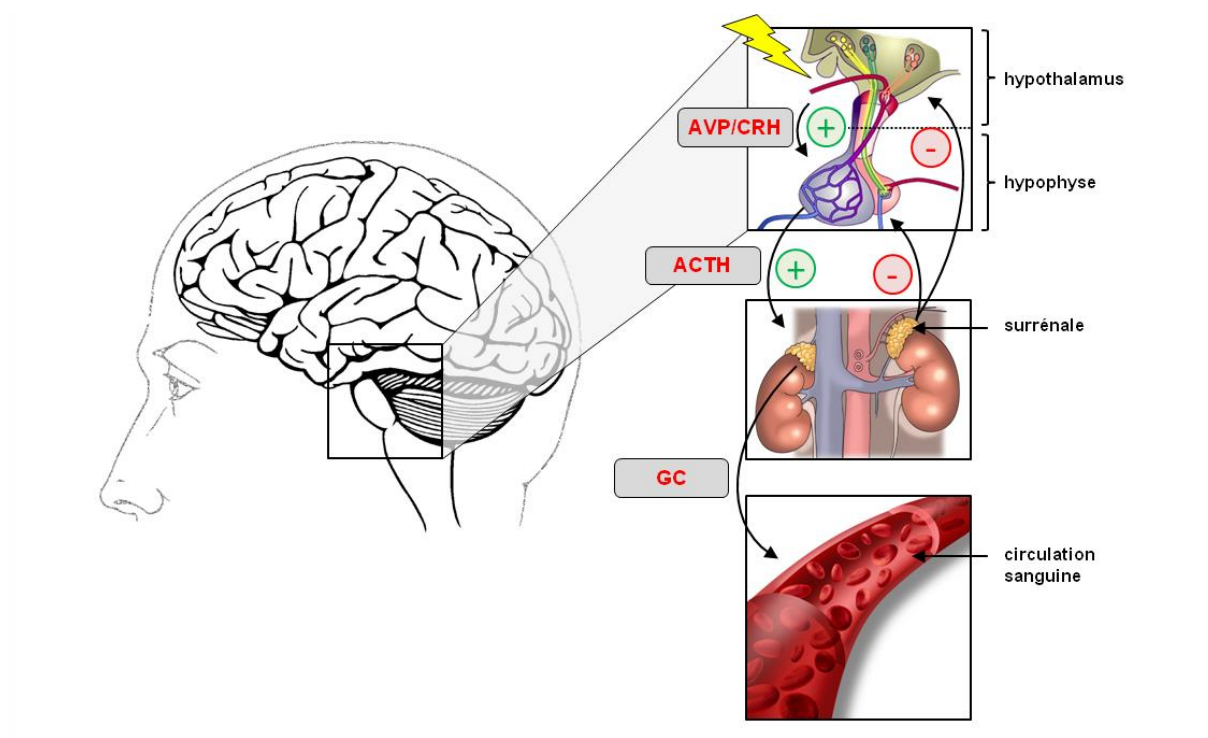


Figure 6 : Axe corticotrope et glucocorticoïdes

ii. *L'axe corticotrope en conditions d'obésité*

Comme décrit précédemment, l'activation de l'axe corticotrope en conditions physiologiques entre en jeu dans la régulation du stockage énergétique, notamment dans le métabolisme du glucose. Cependant, dans des contextes d'activation soutenue et/ou répétée de l'axe corticotrope comme un stress chronique, un syndrome métabolique ou des maladies comme le syndrome de Cushing, la sécrétion accrue de GC induit des effets délétères sur l'organisme. Parmi ceux-ci, une accumulation de tissu adipeux ou une diminution de la synthèse de l'insuline peut accentuer ou contribuer à la mise en place progressive d'une obésité viscérale et/ou d'une insulino-résistance (Rosmond, 2003). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence des dérégulations de l'axe corticotrope chez des individus obèses, suggérant ainsi la mise en place d'un cercle vicieux entre altérations de l'axe corticotrope et troubles métaboliques.

Chez l'Homme, l'obésité est associée à des altérations de l'axe corticotrope, en particulier lorsqu'elle est caractérisée par une accumulation de tissu adipeux au niveau de la région abdominale (obésité androïde). En effet, des femmes présentant une obésité de type androïde ont une augmentation de concentration plasmatique et salivaire de cortisol en réponse à une injection d'ACTH (Duclos et al., 2001). Différentes études réalisées dans des

modèles animaux d'obésité ont permis de préciser la nature des dérégulations de l'axe corticotrope associées à l'obésité. En effet, les taux plasmatiques de corticostérone sont élevés dans le modèle murin d'obésité génétique *db/db*, indépendamment de toute stimulation (Dinel et al., 2011, 2014; Stranahan et al., 2008; Wosiski-Kuhn et al., 2014). Cette augmentation des taux plasmatiques de corticostérone est également observée chez des rats dès la première semaine de consommation d'un régime hyperlipidique, en comparaison avec des rats nourris avec un régime standard (Tannenbaum et al., 1997). Enfin, l'exposition à un régime hyperlipidique pendant 12 semaines chez la souris engendre une perturbation du rythme circadien de sécrétion de corticostérone, avec une diminution des taux plasmatiques de corticostérone et des taux de CRH dans le PVN lors des pics circadiens, comparativement aux souris contrôles (Auvinen et al., 2012).

L'obésité est également caractérisée par une altération de la réponse de l'axe corticotrope à différents neuropeptides, stress psychologiques ou nutriments et par une augmentation de la densité de GR dans des tissus comme le tissu adipeux (Pasquali et al., 2006). Par exemple, l'étude de Tannenbaum et collaborateurs montre que la réponse de l'axe corticotrope à un stress aigu de contention est amplifiée chez les rats nourris avec le régime hyperlipidique, en comparaison aux rats nourris avec le régime standard (Tannenbaum et al., 1997). De façon similaire, l'augmentation des taux plasmatiques de corticostérone en réponse à une injection de LPS (**lipopolysaccharide**, un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) est plus importante chez des souris nourries avec un régime hypercalorique pendant 20 semaines que chez des souris nourries avec un régime standard (Andre et al., 2014). De plus, de nombreuses données indiquent que les peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et des hormones telles que la leptine, dont l'activité est altérée dans des contextes d'obésité, peuvent également moduler l'activité de l'axe corticotrope (Malendowicz et al., 2007). En effet, la production de leptine et ses récepteurs sont localisés dans les structures centrales de l'axe corticotrope : l'hypothalamus et l'hypophyse. Au sein de ces structures, la leptine module la sécrétion de CRH et d'ACTH.

### 3. Obésité et inflammation à bas bruit

Outre les dérégulations métaboliques et de l'axe corticotrope observées chez l'Homme et l'animal obèses, une **inflammation chronique à bas bruit** est également très souvent décrite chez ces sujets, tant à la périphérie que dans le cerveau. Cette inflammation à bas bruit est caractérisée par une synthèse chronique de cytokines inflammatoires, à des niveaux

toutefois inférieurs à ceux observés en réponse à une stimulation immunitaire. Ainsi, l'obésité est désormais considérée comme une véritable pathologie inflammatoire. Le lien entre inflammation et troubles métaboliques a été d'abord suggéré par l'observation de nombreux cas d'insulino-résistance chez des patients en situations infectieuses comme ceux étant atteints de septicémies (Hillenbrand et al., 2012). Puis, il a été démontré que le tissu adipeux sécrétait des cytokines inflammatoires, qui pouvaient inhiber la voie de signalisation de l'insuline (Tsatsoulis et al., 2013). Ainsi, si l'obésité induit la mise en place d'une inflammation chronique à bas bruit, cette dernière a des effets inhibiteurs sur la voie de l'insuline et altère le métabolisme énergétique dans différents tissus comme le tissu adipeux, le foie et le cerveau. Nous nous sommes donc intéressés, au cours de cette thèse, aux altérations du système immunitaire associées à l'obésité.

### *i. La réponse inflammatoire en conditions physiologiques*

Avant de décrire l'état d'inflammation à bas bruit qui s'établit chez les sujets obèses, il est important de comprendre le fonctionnement du système immunitaire et de la réponse inflammatoire en conditions physiologiques. La réponse inflammatoire regroupe l'ensemble des réactions destinées à lutter contre une infection, c'est-à-dire l'entrée d'un pathogène (bactérie, virus...) dans l'organisme.

Le système immunitaire est un système biologique qui sert de ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et leurs toxines. Le but de ce système est de maintenir l'intégrité de l'individu en discriminant le « soi » du « non-soi ». Le système immunitaire doit donc d'une part reconnaître et tolérer les cellules de l'organisme (le « soi ») et d'autre part éliminer les pathogènes porteurs de molécules du « non-soi » ou antigènes. Le système immunitaire est caractérisé par l'activation de deux composantes qui agissent en synergie : **l'immunité innée et l'immunité adaptative.**

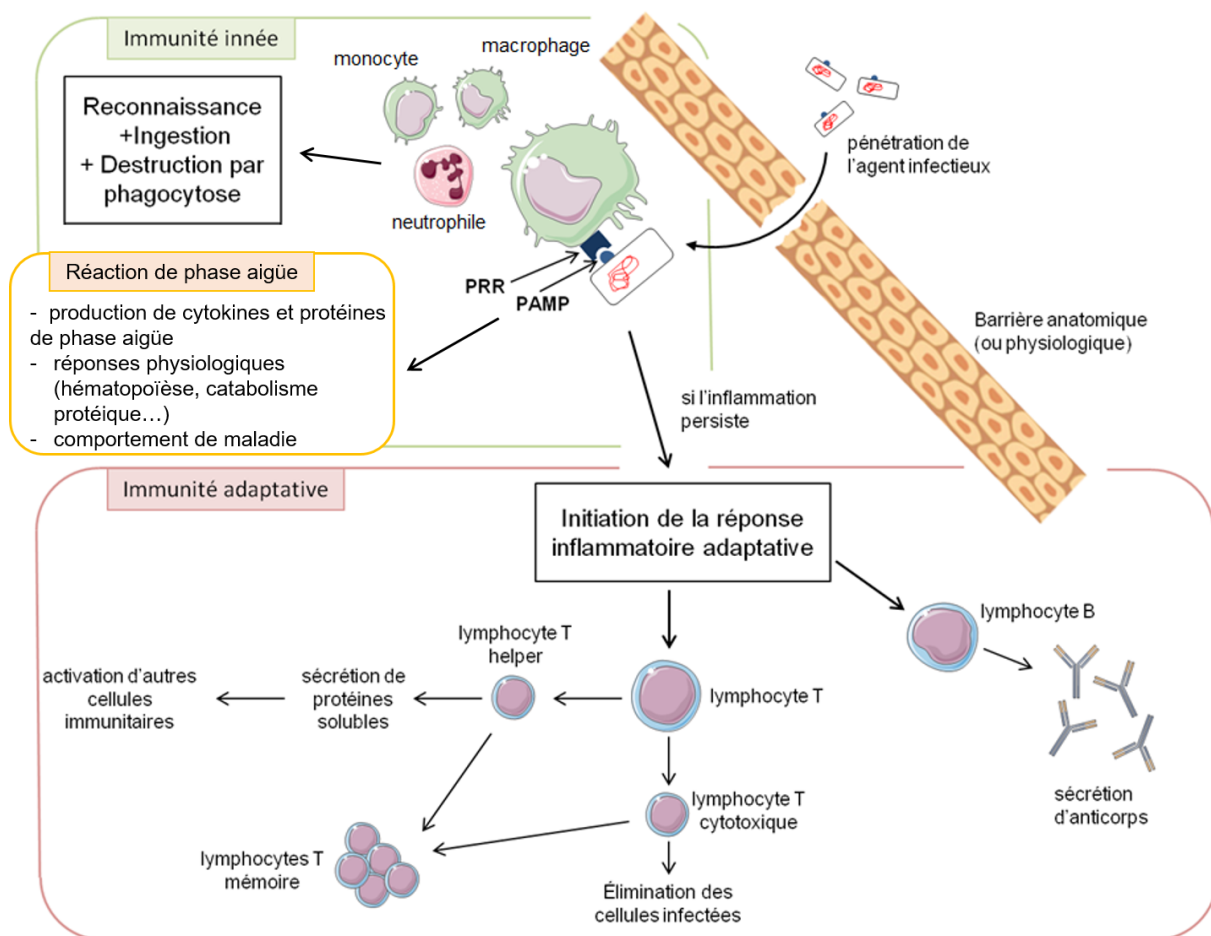
- Immunité innée et adaptative

L'immunité innée est la première ligne de défense lors d'une infection par un agent pathogène. Elle est toujours activée lors de l'infiltration d'un agent pathogène dans l'organisme (Janeway, 1992). Son action est immédiate et non-spécifique. Elle met en jeu différents modules de défense. Les barrières anatomiques et physiologiques empêchent la pénétration des pathogènes dans l'organisme par des mécanismes chimiques, mécaniques ou biologiques. Ces barrières incluent la peau, le mucus et ses mécanismes de clairance, le pH stomacal, les lysozymes bactériolytiques des larmes, la salive et autres sécrétions, ou encore

la BHE. Lorsqu'un pathogène parvient à passer ces barrières anatomiques et physiologiques, l'immunité innée met alors principalement en jeu les cellules phagocytaires mononucléaires (monocytes et macrophages) et polynucléaires (neutrophiles) qui reconnaissent, ingèrent et détruisent les pathogènes par phagocytose (Fig. 7). Lors d'une infection, la détection des agents pathogènes se fait par la reconnaissance de leurs motifs moléculaires, appelés PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Janeway, 1989). Ces motifs sont communs à de nombreux pathogènes mais sont absents chez l'hôte. La fixation des PAMPs à leurs récepteurs spécifiques PRR (*pattern-recognition receptors*), qui sont exprimés par les cellules phagocytaires, active des voies de signalisation intracellulaires contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la **réponse inflammatoire** (Mogensen, 2009). Le système immunitaire inné peut donc détecter des agents pathogènes exogènes, mais il a également évolué dans le but de détecter des signaux de danger endogènes dérivés de cellules ayant subi des dommages, par exemple des cellules soumises à un stress tel qu'une nécrose. Cette détection se fait grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques, appelés DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) (Wada and Makino, 2016). La vitesse d'action du système immunitaire inné lui est caractéristique : après la détection du PAMP ou du DAMP, quelques minutes suffisent à induire la réponse immunitaire. Le rôle primordial de cette réponse est d'éliminer les substances étrangères ou les cellules lésées par phagocytose et de présenter ces antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes (Alberts, 2002).

Lorsque l'infection n'a pas pu être résolue par le système immunitaire inné, la réponse du **système immunitaire adaptatif** se met en place (Fig. 7) (Medzhitov, 2007). Contrairement au système immunitaire inné, la réponse immunitaire adaptative est hautement spécifique de l'agent pathogène qui l'induit et fournit une protection contre celui-ci sur une longue durée. La mise en place du système immunitaire adaptatif peut se faire de façon active (par infection ou vaccination) ou de façon passive (par transmission des anticorps de la mère à l'enfant). La réponse immunitaire adaptative est effectuée par les lymphocytes qui sont de deux types, B et T, et qui se différencient par les molécules de reconnaissance qu'ils expriment (Bendelac et al., 2001). Les lymphocytes B possèdent comme molécules de reconnaissance des immunoglobulines, et produisent des anticorps spécifiques des antigènes permettant la destruction du pathogène et la mise en place d'une mémoire immunitaire durable. Les molécules de reconnaissance des lymphocytes T sont appelées « récepteurs des cellules T », et l'activation de ces récepteurs permet la transformation des lymphocytes T en cellules T effectrices. Ces cellules T effectrices sont soit des cellules T cytotoxiques,

exprimant le cluster de différenciation (CD) 8 à leur surface et ayant comme fonction d'éliminer les cellules infectées, soit des cellules T auxiliaires (ou cellules Th pour cellules T helper), qui expriment la glycoprotéine CD4 et qui sécrètent des protéines solubles permettant d'activer les autres cellules immunitaires. Une fois l'antigène éliminé, la majorité des lymphocytes T meurent par apoptose, afin d'assurer le maintien d'un pool de cellules T naïves pour faire face à de nouvelles stimulations antigéniques. Cependant, une proportion de cellules T sont conservées et constituent un panel de cellules T dites « mémoire », permettant une réponse immunitaire plus rapide et efficace lors de réexpositions antigéniques (Alberts, 2002).



**Figure 7 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire**

- Réaction de phase aiguë

**La réaction de phase aiguë** est une réponse physiologique immédiate permettant la défense de l'organisme et le maintien de l'homéostasie (Baumann and Gauldie, 1994). Elle se met en place précocement, suite à l'activation des macrophages et aux lésions tissulaires provoquées par l'infection. Son rôle est d'isoler et de neutraliser les agents pathogènes, ainsi



que de minimiser les dommages des tissus, tout en favorisant les processus de réparation. La réaction de phase aigüe met en jeu des médiateurs de l'inflammation appelés **cytokines** et comprend trois composantes : une **composante locale**, une **composante systémique** et une **composante centrale**.

- Les cytokines : acteurs moléculaires de l'inflammation

Les cytokines sont des polypeptides de masse moléculaire en général inférieure à 60 kDa, produites par de nombreux types cellulaires dont des cellules immunitaires (telles que les macrophages, cellules microgliales et les monocytes) et non immunitaires (telles que les astrocytes et les neurones). Ce sont des médiateurs à court rayon d'action ayant une fonction autocrine (sur la cellule productrice) ou paracrine (sur les cellules voisines), mais qui peuvent aussi agir à distance comme de véritables hormones (fonction endocrine). Leur activité biologique se manifeste à de très faibles concentrations, par liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Les cytokines peuvent avoir une activité pro- ou anti-inflammatoire et sont nécessaires à la résolution de l'inflammation suite à une stimulation du système immunitaire par un agent infectieux. Elles forment un réseau interdépendant de médiateurs qui influencent mutuellement leur synthèse par des boucles de rétroaction positives et négatives (Cavaillon and Haeffner-Cavaillon, 1993) (Fig. 9). Par exemple, l'IL-10, anti-inflammatoire, inhibe la synthèse de TNF- $\alpha$ . Les grandes familles de cytokines sont les **interférons (IFN)**, les interleukines, les **chémokines** et la famille du **facteur de nécrose tumorale (TNF pour tumor necrosis factor)- $\alpha$** .

- L'interleukine-1 $\beta$  :

Appartenant à la famille de l'IL-1, l'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa qui doit être clivé par l'enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$  (ICE pour *interleukin-1 $\beta$  converting enzyme*) pour donner la forme active de la cytokine de 17,5 kDa. Dans le SNC, l'IL-1 $\beta$  est majoritairement synthétisée par les cellules microgliales, les macrophages périvasculaires et les astrocytes. Sa fixation sur son récepteur fonctionnel, l'IL-1RI induit l'activation des **voies de signalisation NF $\kappa$ B (Nuclear Factor-Kappa B)** et **MAPK (mitogen-activated protein kinases)**, qui va conduire à la transcription de gènes codant pour de nombreuses protéines de l'immunité innée. Au niveau cérébral, des études ont mis en évidence la présence de récepteurs de l'IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus et l'hippocampe (Farrar et al., 1987; Pesce et al., 2011). L'action de l'IL-1 $\beta$  a été démontrée comme étant critique dans la réponse inflammatoire locale et systémique

(Dinarello, 2009). L'IL-1 $\beta$  est considérée comme le chef d'orchestre de la synthèse des cytokines périphériques et cérébrales. En effet, elle joue un rôle majeur dans le développement de la réponse inflammatoire à un stimulus immunitaire systémique tel qu'une injection intrapéritonéale de **LPS** (Laye et al., 2000).

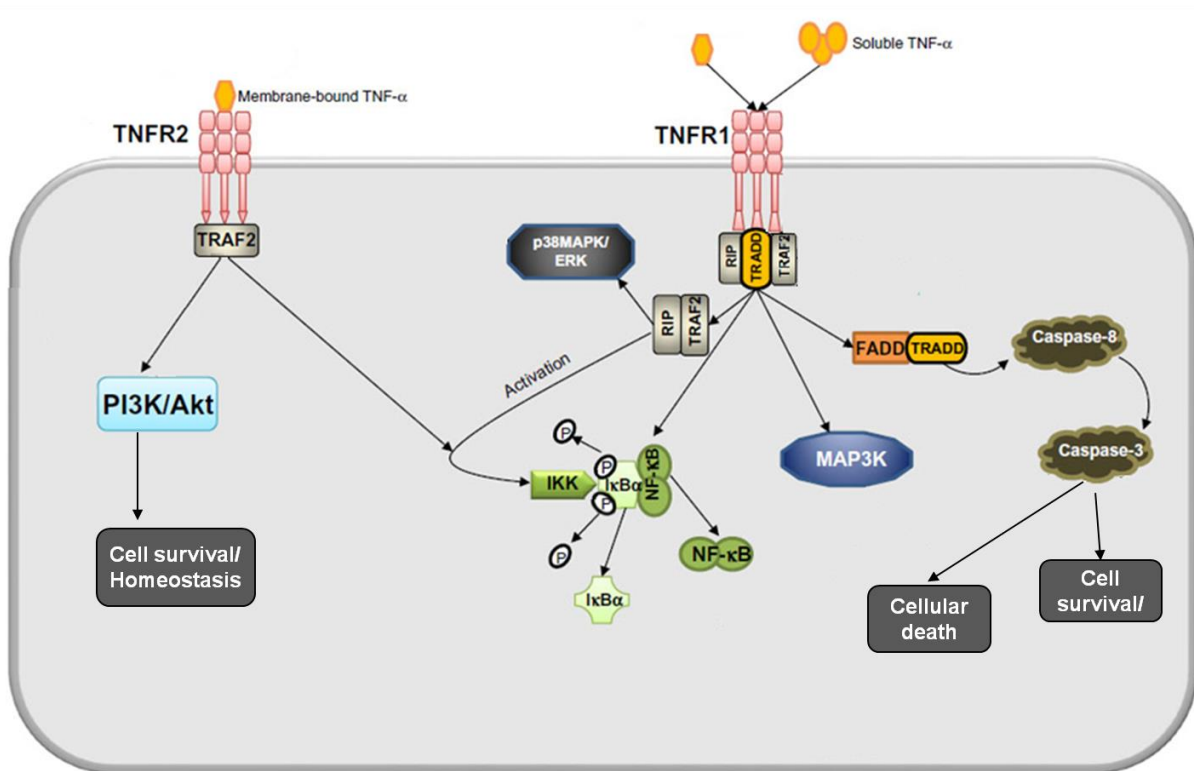
- L'interleukine-6 :

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les cellules de l'immunité innée (lymphocytes T et B, macrophages et cellules microgliales) et par des cellules non-immunitaires (cellules musculaires, endothéliales, neurones...). Elle se fixe sur son récepteur composé de deux glycoprotéines (gp)-130 et d'un récepteur de l'IL-6 (IL-6R). L'IL-6R n'est exprimé que sur un nombre restreint de types cellulaires, dont les hépatocytes, certains leucocytes et les cellules microgliales. La principale voie de signalisation activée par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur est la voie JAK-STAT (Hunter and Jones, 2015; Scheller et al., 2011). Dans le cerveau, l'ARNm de l'IL-6R a été localisé dans l'hippocampe, l'hypothalamus et certaines zones du cortex (Aniszewska et al., 2015).

- Le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  :

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire exprimée sous forme d'un précurseur transmembranaire (tmTNF- $\alpha$ ) de 26 kDa, qui est ensuite clivé par la métalloprotéinase TACE (*TNF- $\alpha$ -converting enzyme*). Le produit de ce clivage est libéré sous la forme de TNF- $\alpha$  soluble de 17 kDa. Pour être actifs, le tmTNF- $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  soluble doivent être sous la forme d'homodimères. Le TNF- $\alpha$  est produit par de nombreux types cellulaires dont les macrophages, cellules dendritiques, monocytes, cellules microgliales et astrocytes. Cette cytokine interagit avec deux récepteurs : les récepteurs au TNF de type I (TNF-RI ou p55) et de type II (TNF-RII ou p75) (Probert, 2015). Brièvement, Le TNF-RI est exprimé de façon constitutive par les cellules nucléées et peut être activé à la fois par le tmTNF- $\alpha$  et par la forme soluble du TNF- $\alpha$ , bien qu'il lie préférentiellement cette dernière. L'activation du TNF-RI induit le recrutement d'une plateforme TRADD (*TNF-RI-associated death domain protein*) permettant l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans des actions diamétralement opposées : la survie et la mort cellulaires (Fig. 8). Le recrutement de la protéine TRADD induit celui de la protéine FADD (pour *Fas-associated death domain protein*) et de la caspase-8, induisant la mort cellulaire. TNF-RI n'a pas une action cytotoxique dans tous les types cellulaires, il possède également une action pro-inflammatoire grâce au recrutement par TRADD de tout un ensemble de protéines permettant l'activation de

voies de signalisation telles que les voies NFκB et MAPK. La réponse inflammatoire des souris déficientes pour le récepteur TNF-RI est altérée en comparaison à des souris contrôles (Rothe et al., 1994). Contrairement au TNF-RI, l'expression du TNF-RII est plus restreinte : elle est inducible et localisée seulement dans les cellules de lignées myéloïde et lymphoïde. Le TNF-RII lie préférentiellement la forme tmTNF-α. Ses activités sont plus limitées que celles du TNF-RI : le recrutement de la protéine TRAF2 (*TNF-R-associated factor 2*) induit l'activation des voies de signalisation Akt (ou PKB pour *proteine kinase B*) et NFκB (Fig. 8). Son activation semble jouer un rôle dans des processus impliqués dans la survie cellulaire et l'homéostasie (Wajant et al., 2003). Au sein du SNC, la production du TNF-α se fait dans différents types cellulaires : cellules microgliales, astrocytes, cellules épendymaires du plexus choroïde et différentes populations de neurones (Sonar and Lal, 2015).

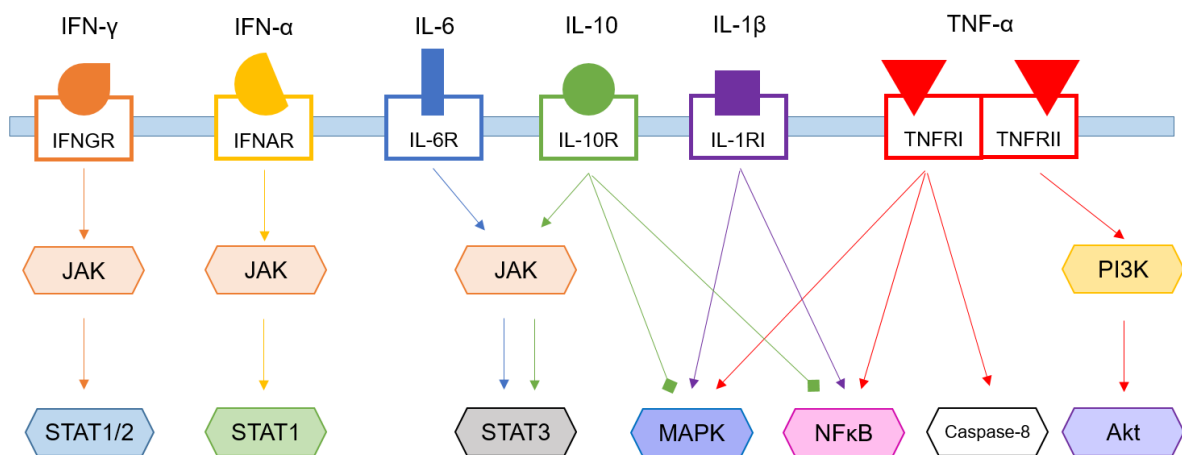


**Figure 8 : Récepteurs du TNF-α et leurs voies de signalisation (adapté de Urschel and Cicha 2015)**

- Les interférons α et γ :

Les IFN sont des petites protéines de la famille des cytokines et se répartissent en deux familles : la famille des IFN de type I (à laquelle appartient l'IFN-α) et la famille des IFN de type II (comprenant l'IFN-γ). Les IFN de type I sont produits par les cellules du système immunitaire mais également par d'autres cellules (cellules épithéliales, cellules dendritiques...) alors que ceux de type II sont produits uniquement par les cellules du système

immunitaire (lymphocytes B et T, cellules natural killer...) (Pestka 2007). L'IFN- $\alpha$  se fixe à un récepteur appelé IFNAR (*IFN- $\alpha$  receptor*) constitué des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. L'IFN- $\gamma$  quant à lui se fixe sur le récepteur IFNGR (*IFN- $\gamma$  receptor*) constitué des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2. La fixation des IFN- $\alpha$  et  $\gamma$  à leurs récepteurs respectifs active les protéines JAK qui y sont associées, ce qui induit l'activation des voies de signalisation STAT1 (pour l'IFNGR) et STAT1/STAT2 (pour l'IFNAR). Les dimères STAT formés sont ensuite transloqués dans le noyau où ils activent la transcription des gènes cibles des IFN (Schindler et al., 2007). Les IFN sont entre autres impliqués dans la lutte contre les virus dont ils inhibent la réplication (Stetson and Medzhitov, 2006).



**Figure 9 : Schéma simplifié des cytokines et de leurs voies de signalisation**

- L'interleukine-10 :

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui, une fois sécrétée, forme un homodimère covalent de 35 kDa, considéré comme la forme active de l'IL-10. Sa fixation sur son récepteur l'IL-10R induit l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT. Elle interagit également avec d'autres voies et inhibe notamment les voies MAPK et NFκB utilisées par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Moore et al., 2001). Ainsi, l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10 passe par le blocage de l'action des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules de l'immunité innée. De plus, l'IL-10 induit la synthèse de l'antagoniste endogène de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*), ainsi que de la forme soluble du récepteur du TNF- $\alpha$ , permettant par un deuxième mode d'action de limiter l'action de ces cytokines pro-inflammatoires (Couper et al., 2008). Enfin, l'IL-10 inhibe la libération d'IL-1 $\beta$

et de TNF- $\alpha$  induite par le LPS, la prolifération microgliale et l'astrogliose (Balasingam and Yong, 1996; Sawada et al., 1999).

- Réaction inflammatoire locale

Durant de nombreuses années, **l'inflammation** a été caractérisée par les quatre signes cardinaux de l'inflammation décrits par Aulus Cornelius Celsus dès le premier siècle avant J.C. : *rubor et tumor cum calor et dolor* (rougeur et tuméfaction avec chaleur et douleur) (Freire and Van Dyke, 2013). Le cinquième signe cardinal de l'inflammation *functio laesa* (perte de fonction) aurait ensuite été inclus dans la description de l'inflammation par Rudolph Virchow en 1858. Au niveau du site d'infection, la réaction inflammatoire se manifeste également par une dilatation des vaisseaux, une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins, un flux sanguin augmenté et un recrutement des leukocytes. Enfin, la réaction de phase aigüe s'accompagne de l'attraction par chimiotactisme des cellules de l'immunité telles que les monocytes, macrophages ou neutrophiles. La liaison de ces cellules aux molécules antigéniques induit d'une part leur phagocytose, et d'autre part la synthèse de molécules inflammatoires telles que les cytokines et les chémokines.

- Réaction inflammatoire systémique

La réaction inflammatoire systémique est caractérisée par un ensemble de réponses physiologiques coordonnées permettant de limiter la propagation de l'agent pathogène dans l'organisme et de lutter contre l'infection. Elle favorise également la guérison et la récupération. Ces réponses comprennent entre autres une activation de l'hématopoïèse (production des diverses cellules sanguines), une diminution de la néoglucogénèse, un catabolisme protéique accru et une diminution de la concentration plasmatique de nutriments et minéraux. La réponse inflammatoire systémique est également caractérisée par l'augmentation de la concentration sanguine de certaines protéines. Ces dernières sont appelées protéines de phase aigüe (APP pour *acute phase protein*) et participent à la réaction inflammatoire (Cray, 2012; Monshouwer and Witkamp, 2000). Les APP sont importantes dans la neutralisation des pathogènes et de leurs produits, dans l'activation du système du complément, dans la phagocytose et dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. La protéine C réactive (CRP pour *C-reactive protein*) a été la première protéine de phase aigüe décrite, dans les années 1930. Aujourd'hui, la CRP reste un marqueur majeur d'une infection. Elle joue un rôle capital dans la réponse inflammatoire puisqu'elle possède des effets immuno-modulateurs (régule positivement ou négativement la production de cytokines)

(Li and Chen, 2003), active le système du complément (Mold et al., 1999) et stimule la phagocytose (Schultz and Arnold, 1990). La protéine sérique amyloïde A (SAA pour *serum amyloid A*) joue également un rôle majeur dans la réaction de phase aigüe. Elle agit comme facteur attractant des monocytes, cellules polynucléaires et cellules T (Badolato et al., 1994). De plus, la SAA tient un rôle important dans la régulation négative des processus inflammatoires. Les concentrations sanguines de la CRP et de la SAA peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois en situation d'inflammation (Pepys and Baltz, 1983; Schultz and Arnold, 1990). Ainsi l'organisme met en place pendant les premières heures suivant l'infection un système de défense périphérique de l'organisme via la production de cytokines et d'APP. Mais cette réponse inflammatoire présente également une composante centrale.

- Réaction inflammatoire centrale

Le cerveau a longtemps été considéré comme un organe immunologiquement privilégié puisque la BHE et ses jonctions serrées limitent le passage des cellules immunitaires et des molécules inflammatoires du sang jusqu'au cerveau. Cependant, l'étude des relations neuro-immunes a montré qu'un épisode infectieux s'accompagne de modifications comportementales telles qu'une grande fatigue, une apathie, une difficulté à se concentrer, une perte d'appétit, des troubles du sommeil, une réduction de l'intérêt pour l'environnement physique et social ou une anhédonie. Ces modifications comportementales sont regroupées sous le terme de **comportement de maladie** (Dantzer, 2001). Elles sont associées à des changements neuroendocriniens et à de la fièvre et ne sont pas le reflet de processus délétères, mais représentent un état motivationnel (Dantzer, 2001, 2006). En effet, il s'agit d'une réorganisation des priorités de l'organisme afin de lutter efficacement contre l'agent pathogène responsable de l'infection. L'ensemble de ces fonctions comportementales étant contrôlé par le cerveau, cela implique que le SNC possède son propre système de défense. Ce système de l'immunité innée cérébrale est décrit comme un système essentiel dans le maintien de l'homéostasie cérébrale.

Les cytokines synthétisées à la périphérie pendant la réaction inflammatoire sont des protéines relativement larges et peuvent difficilement passer la BHE pour induire une réponse immune au niveau du SNC. Plusieurs voies ont été décrites pour expliquer la relation qui existe entre cytokines inflammatoires périphériques et leur production dans le SNC (Fig. 10) (Capuron and Miller, 2011; Dantzer, 2006; Dantzer et al., 2008) :

- La voie neurale : les cytokines produites localement à la périphérie activent des afférences nerveuses, comme le nerf vague lors d'infections abdominales et viscérales. Ces afférences nerveuses relaient l'information au cerveau par l'intermédiaire du NTS et de l'*area postrema*.
- La voie humorale : les cytokines périphériques peuvent accéder au cerveau par certaines régions perméables de la BHE (plexus choroïdes et organes circumventriculaires). Ce mécanisme induit la synthèse de messagers secondaires (ex : prostaglandines et oxyde nitrique) qui vont agir sur leurs cibles cérébrales spécifiques.
- La voie cellulaire : les cytokines périphériques, en particulier le TNF- $\alpha$ , induisent l'activation des cellules microgliales et la production par ces cellules de facteurs chémo-attractants nécessaires à l'infiltration et au recrutement de monocytes dans le cerveau (D'Mello et al., 2009).

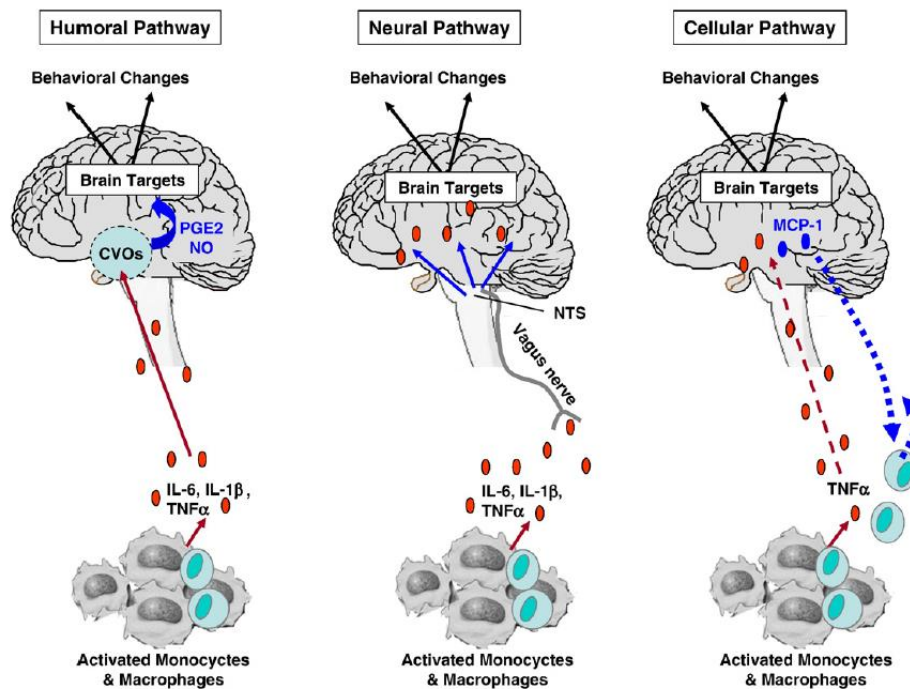


Figure 10 : Voies d'accès des cytokines de la périphérie au cerveau (Capuron and Miller, 2011)

L'activation de la réaction immunitaire au niveau central en réponse à un signal inflammatoire périphérique se fait par l'intermédiaire de deux types cellulaires : les **cellules microgliales** et **astrocytaires**. Les cellules microgliales sont les effecteurs principaux du système immunitaire cérébral. Elles ont été décrites pour la première fois par Pío del Río-Hortega en 1918. Del Río-Hortega décrit alors une méthode de marquage permettant de

distinguer les cellules microgliales des autres cellules du SNC. Dans les années suivantes, il décrit leur capacité de phagocytose et leur plasticité morphologique en réponse à des changements environnementaux. Les cellules microgliales sont dérivées de macrophages présents dans le sac vitellin, qui vont coloniser le cerveau au cours de la période embryonnaire (Ransohoff and El Khoury, 2015). Elles représentent 10% des cellules du cerveau et possèdent des fonctions similaires aux macrophages périphériques : en réponse à toute perturbation moléculaire de l'environnement cérébral, elles mettent en place un ensemble de processus comprenant la prolifération, la migration vers le site lésé et des changements fonctionnels incluant la synthèse de facteurs moléculaires tels que les cytokines, chémokines, radicaux libres... Un autre type de cellules gliales participe également à l'immunité innée cérébrale : les cellules astrocytaires (ou astrocytes), qui sont nommées ainsi en référence à leur phénotype en forme d'étoile. Les astrocytes sont responsables du bon fonctionnement neuronal, de l'intégrité de la structure des synapses et de la transmission synaptique. Les astrocytes détectent tout changement d'activité neuronale et de composition de l'espace extracellulaire. En réponse à une infection dans le SNC, ils mettent en place un ensemble de mécanismes homéostatiques permettant le maintien des fonctions neuronales tels que des changements de leur morphologie (hypertrophie du soma et des prolongements astrocytaires), de leur capacité proliférative ou de leurs fonctions. L'ensemble de ces processus est appelé astroglie et permet la mise en place d'une « cicatrice astrogliale », et donc l'isolation du site lésé (Birch, 2014; Burda et al., 2016). L'activation des cellules microgliales et des astrocytes et la libération accrue de facteurs inflammatoires sont regroupés sous le terme « **neuroinflammation** ». Ce processus s'accompagne souvent d'une augmentation de la perméabilité de la BHE et du recrutement de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau. Dans le cas d'une infection par un pathogène, la réponse inflammatoire systémique et centrale est transitoire et permet le retour à l'homéostasie. Cependant, dans certains contextes pathologiques, l'inflammation persiste et s'installe. La sécrétion de cytokines est moins élevée qu'en réponse à une infection mais elle est constante. On parle d'**inflammation chronique à bas bruit**.

### *ii. L'obésité : une pathologie inflammatoire chronique à bas bruit*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'obésité est caractérisée par une inflammation chronique à bas bruit. En effet, une augmentation des niveaux plasmatiques de cytokines inflammatoires (dont l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et la CRP), ainsi qu'une activation des voies de signalisation associées à ces cytokines, sont classiquement décrites chez des

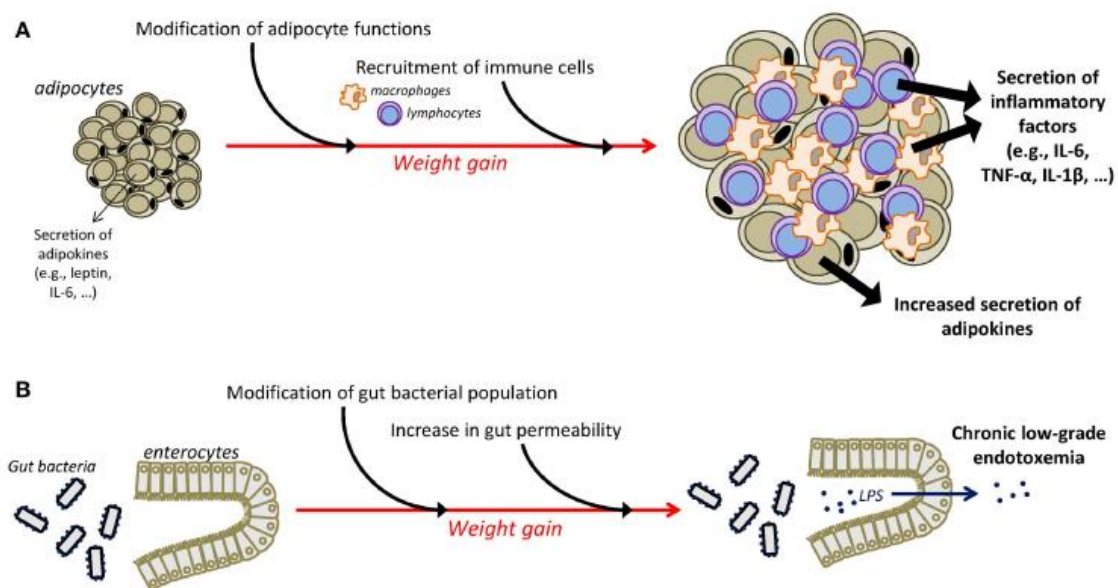


patients obèses (Hansen et al., 2010; Lasselin et al., 2014) et dans différents modèles animaux d'obésité (Cani et al., 2008; Dinel et al., 2011, 2014).

Différents mécanismes complémentaires participent à la mise en place progressive de l'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité (Capuron et al., 2016). Un des acteurs principaux est le **tissu adipeux blanc** : en effet, des études ont rapporté une association entre les niveaux circulants de CRP, TNF- $\alpha$  et IL-6 et des mesures d'adiposité (Park et al., 2005). De plus, les concentrations de CRP sont corrélées, chez le sujet obèse, à l'IMC et au RTH (reflétant l'adiposité viscérale) (Visser et al., 1999). A l'inverse, une perte de poids chez des patients ou des animaux obèses est associée à une diminution de l'inflammation périphérique (Erion et al., 2014; Forsythe et al., 2008; Rao, 2012). L'obésité induit des modifications de la morphologie et de la fonction sécrétrice des adipocytes, principaux constituants cellulaires du tissu adipeux blanc, en particulier une hypertrophie et une hyperplasie. Les adipocytes sécrètent des protéines dont les cytokines et la leptine, susceptibles de circuler dans le plasma et d'avoir une influence systémique. Ces protéines sont regroupées sous le terme d'adipokines. L'augmentation de la sécrétion d'adipokines par les adipocytes chez le sujet obèse engendre le recrutement et l'activation de macrophages. L'ensemble de ces cellules synthétisent des facteurs inflammatoires (MCP-1 pour *monocyte chemoattractant protein-1*, TNF- $\alpha$ , IL-6), ce qui provoque l'intensification du recrutement de nouveaux macrophages, qui synthétisent à leur tour de nouvelles cytokines (Heilbronn and Campbell, 2008) (Fig. 11A). Par ailleurs, l'infiltration de cellules immunitaires activées dans d'autres organes, en particulier le foie et les muscles, contribue également au maintien d'une inflammation chronique à bas bruit (McNelis and Olefsky, 2014; Pedersen and Febbraio, 2012).

Plus récemment, différentes études ont décrit l'importance du **microbiote intestinal** dans la mise en place de l'inflammation à bas bruit associée à l'obésité (Cani et al., 2012; Cani et al., 2009; Patterson et al., 2016; Paun and Danska, 2016). Le microbiote humain est constitué d'autant de microorganismes que de cellules constituant le corps humain. Il est clairement démontré que ces microorganismes intestinaux sont impliqués dans de nombreuses fonctions métaboliques et biologiques dont la régulation du métabolisme du glucose, de la balance énergétique et de l'inflammation à bas bruit chez les sujets obèses (Cani et al., 2012; Ley, 2010). La diversité de la flore microbienne intestinale chez les sujets obèses est diminuée en comparaison à des sujets minces. De plus, chez le sujet obèse et dans des modèles animaux

d'obésité, une faible quantité de gènes bactériens est associée à une augmentation de l'adiposité et de l'inflammation systémique (Le Chatelier et al., 2013). Une perméabilité anormale de la barrière intestinale est également décrite dans des contextes d'obésité et contribue à la mise en place d'une **endotoxémie métabolique**, c'est-à-dire le passage de bactéries et d'endotoxines bactériennes (en particulier le LPS) dans la circulation sanguine (Fig. 11B). L'utilisation de **probiotiques** (micro-organismes vivants), de **prébiotiques** (substrats pour certains de ces micro-organismes) ou d'antibiotiques chez l'Homme et chez l'animal obèses permettent de moduler cette endotoxémie métabolique (Cani et al., 2008; Cani and Delzenne, 2007).



**Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la mise en place de l'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité (Castanon 2014)**

L'inflammation à bas bruit observée dans le cadre de l'obésité est impliquée dans le développement des altérations métaboliques associées décrites précédemment telles que le DT2 (Calle and Fernandez, 2012; Pickup, 2004). Il est notamment clairement établi que certaines cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, ont des effets cytotoxiques sur les cellules  $\beta$  du pancréas et détériorent l'action de l'insuline sur ses tissus cibles périphériques, en interférant en particulier avec sa voie de signalisation (Donath, 2014; Hotamisligil, 2006; Mooney et al., 2001). Ainsi, la production accrue de TNF- $\alpha$  dans des modèles d'obésité pourrait participer à la mise en place d'un DT2.

A l'image de ce qui a été décrit dans le cadre d'une infection, l'inflammation périphérique à bas bruit observée dans l'obésité est associée à une augmentation de l'inflammation centrale. En effet, des données récentes mettent en évidence une augmentation des processus inflammatoires dans le cerveau de sujets obèses (Buckman et al., 2014; Rummel et al., 2010). Ceci est en particulier le cas dans l'hypothalamus, structure dans laquelle une augmentation de l'activation des cellules gliales a été démontrée chez l'Homme obèse (Thaler et al., 2010). Il est intéressant d'évoquer le rôle potentiel que peut jouer l'inflammation hypothalamique dans la mise en place de l'obésité induite par un régime hyperlipidique. En effet, l'inhibition de l'inflammation dans l'hippocampe empêche le développement de l'obésité et des altérations métaboliques associées chez le rat (Milanski 2009). De plus, l'exposition prénatale à des cytokines (IL-6 ou TNF- $\alpha$ ) facilite le développement des troubles métaboliques, en particulier de la résistance à l'insuline, à l'âge adulte chez le rat (Dahlgren et al., 2001). Enfin, les cytokines inflammatoires favorise la prise de poids, *via* des altérations des réseaux neuronaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire (Thaler et al., 2010; Velloso et al., 2008). Une augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires a également été mesurée dans des modèles animaux d'obésité, en situation basale mais aussi en réponse à un stimulus immunitaire (Andre et al., 2014; Cai and Liu, 2012; De Souza et al., 2005; Gao et al., 2014; Maric et al., 2014; Pohl et al., 2009; Zhang et al., 2008). La neuroinflammation est également observée dans d'autres structures cérébrales, en particulier dans l'hippocampe et le cortex (Dinel et al., 2011, 2014; Erion et al., 2014; Pistell et al., 2010). Par exemple, l'inflammation systémique observée dans des modèles génétiques d'obésité comme la souris *db/db* est associée à une augmentation de l'expression et de la synthèse de cytokines inflammatoires dans l'hippocampe (Dinel et al., 2011, 2014; Erion et al., 2014). De façon similaire, une exacerbation de l'inflammation hippocampe a été décrite dans des modèles d'obésité induite par le régime (Andre et al., 2014; Boitard et al., 2014; Dinel et al., 2014). Cependant, les processus conduisant à la mise en place de la neuroinflammation associée à l'obésité ne sont pas encore bien caractérisés.

#### 4. Interactions entre inflammation et axe corticotrope

Comme évoqué précédemment, l'axe corticotrope et le système immunitaire interagissent (Irwin and Cole, 2011). En conditions physiologiques, les cytokines libérées lors d'une infection par un agent pathogène activent l'axe corticotrope au niveau périphérique et au niveau central. Les GC sécrétés suite à cette activation agissent à leur tour en diminuant la synthèse de cytokines inflammatoire, permettant un retour à l'homéostasie. Dans le cadre de

l'obésité, ces relations entre système inflammatoire et l'axe corticotrope sont dérégulés. En effet, l'inflammation chronique à bas bruit qui caractérise l'obésité induit une synthèse continue et prolongée de GC, entraînant une désensibilisation des GR et l'incapacité des GC à produire leur effet anti-inflammatoire. Ceci peut alors conduire à la mise en place d'un cercle vicieux et ainsi contribuer à l'aggravation des altérations associées à l'obésité.

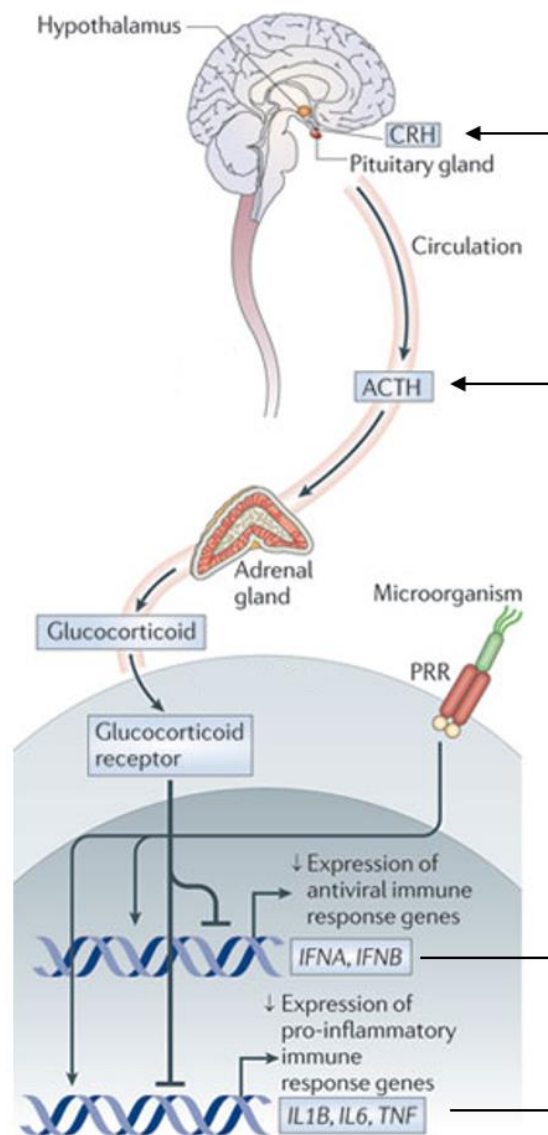
### *i. En conditions physiologiques*

Il est bien établi qu'un stimulus inflammatoire périphérique ou central conduit à l'activation de l'axe corticotrope (Bellavance and Rivest, 2014; Silverman and Sternberg, 2012). En effet, les cytokines inflammatoires activent l'axe corticotrope à la périphérie et au niveau central en stimulant la sécrétion de CRH et d'ACTH. Comme décrit précédemment, la libération de cytokines à la périphérie peut stimuler le nerf vague et engendrer l'activation du PVN de l'hypothalamus, responsable de la libération de CRH. En retour, les GC libérés possèdent une activité anti-inflammatoire, notamment au travers du blocage de l'action de NF $\kappa$ B, ce qui a pour effet d'inhiber la sécrétion de cytokines (De Bosscher et al., 2003; Rhen and Cidlowski, 2005). D'autre part, la sécrétion de GC induite par un stress aigu conduit dans un premier temps à la synthèse locale de cytokines pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux sous-cutané, ce qui va avoir pour effet de stimuler la lipolyse permettant la libération d'énergie nécessaire à la réponse au stress. Puis, l'action anti-inflammatoire des GC permet le retour à l'homéostasie (Fig. 12) (Speaker and Fleshner, 2012).

### *ii. Dans un contexte d'obésité*

Des altérations de l'activité de l'axe corticotrope ont été décrites chez l'Homme et chez l'animal dans de nombreux contextes de maladies auto-immunes et inflammatoires (Bomholt et al., 2004; Bornstein and Rutkowski, 2002). Si lors d'un stress aigu l'activation immunitaire est transitoire et régulée grâce aux effets anti-inflammatoires des GC, cette régulation n'est pas observée dans des contextes d'inflammation chronique tels que l'obésité. En effet, comme c'est le cas lors d'un stress chronique, les altérations de l'axe corticotrope observées dans des situations d'obésité se traduisent par l'incapacité des GC à atténuer la réponse immunitaire, contribuant ainsi à maintenir une libération forte et prolongée de cytokines pro-inflammatoires (Sorrells et al., 2009). Au niveau central, l'élévation des niveaux de GC plasmatiques induit une augmentation du nombre de cellules microgliales et de la synthèse de cytokines inflammatoires dans l'hippocampe des souris obèses *db/db* (Dey et al., 2014). Ces cytokines vont à leur tour augmenter la sécrétion des GC de façon

prolongée. Cela va notamment engendrer une désensibilisation des GR (Makhija and Karunakaran, 2013; Silverman and Sternberg, 2012), entretenant ainsi des altérations de l'axe corticotrope. Au laboratoire, une étude réalisée chez la souris a montré que l'augmentation de corticostérone plasmatique induite par une injection de LPS est exacerbée chez les souris nourries avec un régime hypercalorique en comparaison à des souris nourries avec un régime standard (Andre et al., 2014). Chez ces souris, la production basale de cytokines à la périphérie et dans le cerveau était similaire entre les souris nourries avec le régime standard et celles nourries avec le régime enrichi. Ces données confirment donc la relation entre le statut inflammatoire et la régulation de l'axe corticotrope.



**Figure 12 : Communication bidirectionnelle entre le système immunitaire et l'axe corticotrope (adapté de Irwin and Cole 2011)**

Comme nous l'avons vu dans ce premier chapitre, le système immunitaire et l'axe corticotrope sont deux systèmes biologiques dont le bon fonctionnement participe au maintien de l'homéostasie de l'organisme. En situations physiologiques, leur activation est transitoire mais dans un contexte d'obésité, leur activité est dérégulée et la synthèse prolongée de cytokines et de glucocorticoïdes qui en résulte participe au maintien et/ou à l'aggravation de l'obésité et des altérations biologiques qui lui sont associées. De plus, nous allons voir dans le chapitre II que les altérations de ces deux systèmes pourraient également contribuer à la mise en place des altérations émotionnelles et cognitives qui sont fréquemment observées chez les individus obèses.

## **II- Obésité et comorbidités neuropsychiatriques**

Outre les altérations biologiques décrites dans le chapitre précédent, l'obésité est également un facteur de risque important de développer des troubles neuropsychiatriques, tels que des **altérations cognitives** et des **troubles de l'humeur** (Andre et al., 2014; Boitard et al., 2014; Boitard et al., 2015; Dinel et al., 2011, 2014; Lasselin et al., 2012). En effet, près de 30 % des sujets obèses sont déprimés alors que l'incidence de la dépression chez des sujets sains est de l'ordre de 10-15 % (Lasselin and Capuron, 2014). La fréquence des altérations cognitives est également augmentée chez les sujets obèses en comparaison à des sujets sains (Alosco and Gunstad, 2014). La prévalence élevée de troubles de l'humeur et de la cognition chez les patients obèses a non seulement un impact sur leur qualité de vie, mais compromet également leur perte de poids et le bon suivi du traitement (Brunault et al., 2012; Dixon et al., 2003; Kinzl et al., 2006; Mazzeschi et al., 2012). En effet, chez l'adulte, ces altérations comportementales contribuent à une mauvaise estime de soi et à une auto-négligence, et leur occurrence dans un contexte d'obésité peut entraîner, entre autres choses, un mauvais suivi du traitement par le patient. Par exemple, des sujets obèses adhèrent moins à un changement de style de vie comprenant des sessions d'exercices physiques lorsqu'ils sont déprimés (Mazzeschi et al., 2012) Des troubles de l'humeur comme une dépression ou des troubles anxieux chez des sujets obèses sont par exemple associés à une perte de poids moins importante après une chirurgie bariatrique que des patients n'ayant pas de troubles neuropsychiatriques (Brunault et al., 2012; Kinzl et al., 2006). Ces altérations comportementales facilitent également l'aggravation de l'obésité et des troubles qui lui sont associés. Par exemple, la sur-activation de l'axe corticotrope associée à la dépression favorise

le développement d'une obésité abdominale (Bjorntorp, 1991). La dépression dans le contexte de l'obésité est également un facteur de risque supplémentaire de maladies cardiovasculaires (Carney et al., 2002). De plus, la mesure de la qualité de vie est plus faible chez des patients obèses souffrant de troubles de l'humeur que chez des sujets obèses sans troubles neuropsychiatriques (Nigatu et al., 2016). Ainsi, bien que les altérations neuropsychiatriques associées à l'obésité n'affectent pas directement des fonctions vitales de l'organisme, elles revêtent tout de même une importance particulière et leur prise en charge est donc d'une importance majeure.

### A. Altérations cognitives

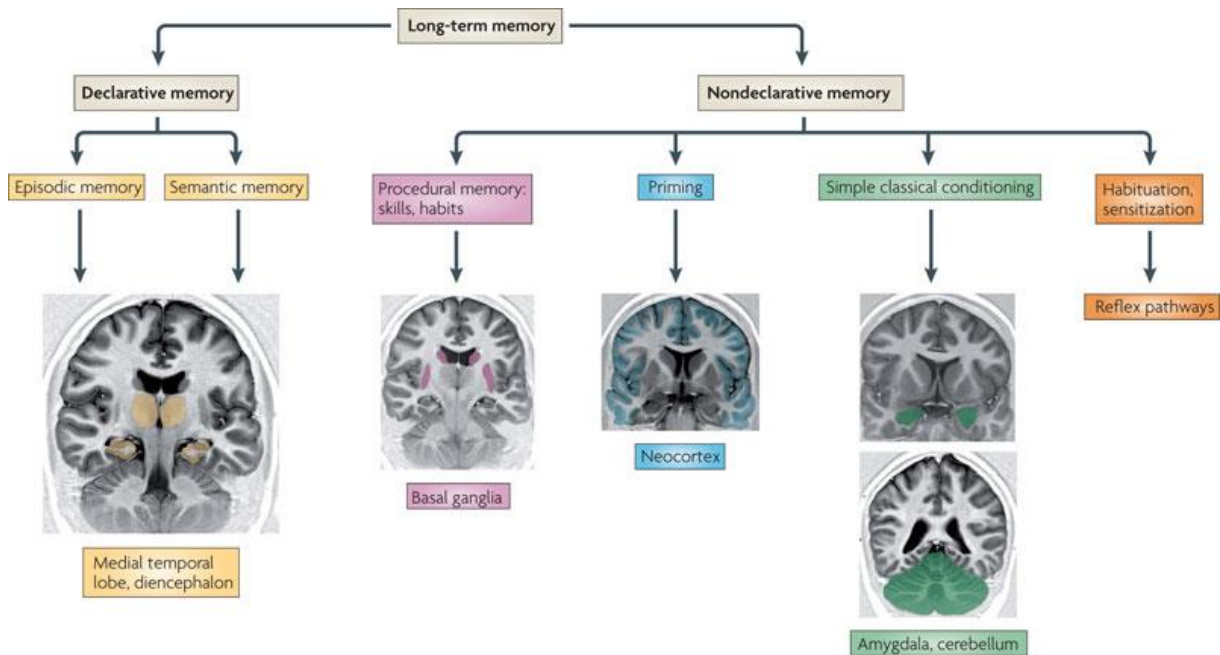
Les sujets obèses ont un risque de développer des altérations cognitives augmenté en comparaison à des sujets de corpulence normale. Par exemple, l'obésité est associée à des altérations de l'attention, des fonctions exécutives et de la mémoire (Alosco and Gunstad, 2014). Chez l'animal, des altérations de la **mémoire** dépendante de l'hippocampe ont été mises en évidence dans des modèles d'obésité génétique (Dinel et al., 2011; Erion et al., 2014) et d'obésité induite par des régimes hypercaloriques (Andre et al., 2014; Boitard et al., 2014). Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc tout particulièrement intéressés à la mémoire dépendante de l'hippocampe.

#### 1. La mémoire

La mémoire est une fonction complexe dépendant de l'intégrité de plusieurs structures cérébrales. En psychologie, il a été proposé de distinguer deux grands types de mémoire : la **mémoire à court terme** et la **mémoire à long terme**. La mémoire à long terme, par opposition à la mémoire à court terme, est la capacité à retenir une information pendant une durée beaucoup plus importante. Squire en 1992 a proposé une classification dichotomique de la mémoire à long terme. Même si elle a été améliorée au cours de ces dernières années, cette classification a peu évolué (Henke, 2010; Squire, 2004) et reste encore la plus communément utilisée de nos jours. Elle sépare la mémoire à long terme en deux grands sous-systèmes : la **mémoire déclarative** et la mémoire non-déclarative (Fig. 12). Ces différents systèmes de mémoire sont interactifs et se différencient par leur mode de codage, de stockage et de rappel de l'information, ainsi que par les structures cérébrales qu'ils mettent en jeu (McDonald et al., 2004).

Chez l'Homme, la mémoire déclarative, également appelée mémoire explicite, est accessible à la conscience et dépend essentiellement de l'intégrité de l'hippocampe (Clayton

and Dickinson, 1998). Elle se divise en deux sous-mémoires : la mémoire sémantique et la mémoire épisodique (Fig. 13). Ce système de mémoire, relativement bien défini anatomiquement, implique des interactions entre les structures corticales et les régions sous-corticales limbiques, dont l'**hippocampe**. Alors que la mémoire sémantique regroupe nos connaissances générales des faits publics (Quoi ?), la mémoire épisodique quant à elle, constitue nos souvenirs autobiographiques et intègre une notion spatiale et temporelle à ceux-ci (Quoi, Où et Quand?). Ainsi l'hippocampe interviendrait dans ce type de mémoire en permettant la mémorisation des faits et des événements dans un contexte spatio-temporel et/ou de les lier entre eux (notion de mémoire relationnelle) (Henke, 2010; Squire, 2004). Chez l'animal, la mémoire déclarative n'est pas évaluable en tant que telle car elle constitue par définition une mémoire verbalisable, permettant d'exprimer des souvenirs. Une des stratégies mises en œuvre afin de la modéliser consiste à étudier la capacité de l'animal à réaliser des tâches d'apprentissage et de mémoire dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe. Le test du labyrinthe aquatique de Morris (ou de la piscine de Morris) est classiquement utilisé pour étudier la mémoire spatiale chez l'animal (Morris, 1984; D'Hooge and De Deyn, 2001).



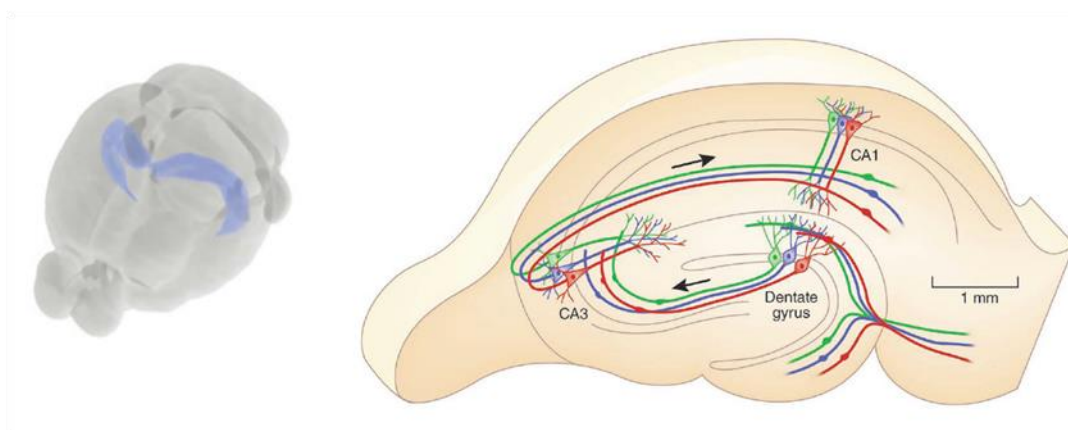
**Figure 13 : Classification des systèmes de la mémoire à long terme (Henke 2010)**

Le système limbique est un ensemble de structures impliquées dans l'intégration de processus cognitifs et dans la régulation des émotions. Il fait partie du lobe temporal médian et est principalement constitué du gyrus cingulaire, du gyrus parahippocampique, de l'hippocampe, de l'amygdale, du septum et de l'hypothalamus (Rajmohan and Mohandas,



2007). Parmi ces structures, le rôle de l'hippocampe dans la régulation des altérations émotionnelles et cognitives a été mis en évidence (Dey et al., 2014; Diné et al., 2011, 2014; Mueller et al., 2012b). L'hippocampe est composé du gyrus denté (DG pour *dentate gyrus*) et de la corne d'Ammon (constitué des sous-unités CA1, CA2, CA3) (Fig. 14). La voie perforante en provenance du cortex entorhinal transmet les informations à l'hippocampe en projetant vers les neurones du DG et de la région CA3. Les cellules granulaires du DG sont reliées à la sous-unité CA3 par les fibres moussues. Les cellules pyramidales de la région CA3 projettent en direction de la sous-unité CA1 *via* les collatérales de Schaeffer. Enfin, les fibres issues de la région CA1 projettent vers le subiculum (Amaral and Witter, 1989). L'hippocampe reçoit également des informations en provenance d'autres régions telles que le tronc cérébral, l'hypothalamus ou l'amygdale. Les projections en provenance de l'hippocampe se font *via* le subiculum sur un grand nombre d'aires associatives corticales, notamment sur le cortex préfrontal et sur des aires sous-corticales, dont notamment le noyau accumbens et l'amygdale (van Groen and Wyss, 1990).

L'hippocampe joue donc un rôle central dans l'encodage des relations entre les différentes informations, nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémoire. Il est maintenant bien établi que les processus d'apprentissage et de mémoire nécessitent la mise en place de modifications durables dans l'**hippocampe dorsal**, regroupées sous le terme de plasticité cérébrale, qui inclut notamment la **plasticité synaptique** et la **neurogenèse**.



**Figure 14 : Localisation de l'hippocampe dans le cerveau de rongeur et schéma des connexions synaptiques**

*i. Plasticité synaptique hippocampique et mémoire*

La plasticité synaptique se définit comme la capacité des neurones à modifier leurs propriétés (morphologiques, chimiques et fonctionnelles) au cours du temps. L'hippocampe,

structure clé dans les processus d'apprentissage et de mémoire, a été largement décrit comme étant le siège de phénomènes de plasticité synaptique (Morris, 2006). La **potentialisation à long terme (PLT)** est la première forme de plasticité synaptique mise en évidence chez le mammifère (Bliss and Lomo, 1973). Elle se caractérise par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (au niveau extracellulaire) enregistrés dans le DG, mais également par une diminution du seuil d'induction du potentiel d'action. Cette PLT est observée après une stimulation "tétanique" (stimulation à haute fréquence) des neurones pré-synaptiques. L'hypothèse selon laquelle la PLT sous-tendrait la formation de la mémoire a été appuyée par de nombreuses études. En effet, les niveaux de PLT dans l'hippocampe ont été corrélés aux niveaux de performance des animaux dans de nombreux tests d'apprentissage et de mémoire spatiale (Jaffard and Jeantet, 1981; Jaffard et al., 1996; Jodar and Kaneto, 1995).

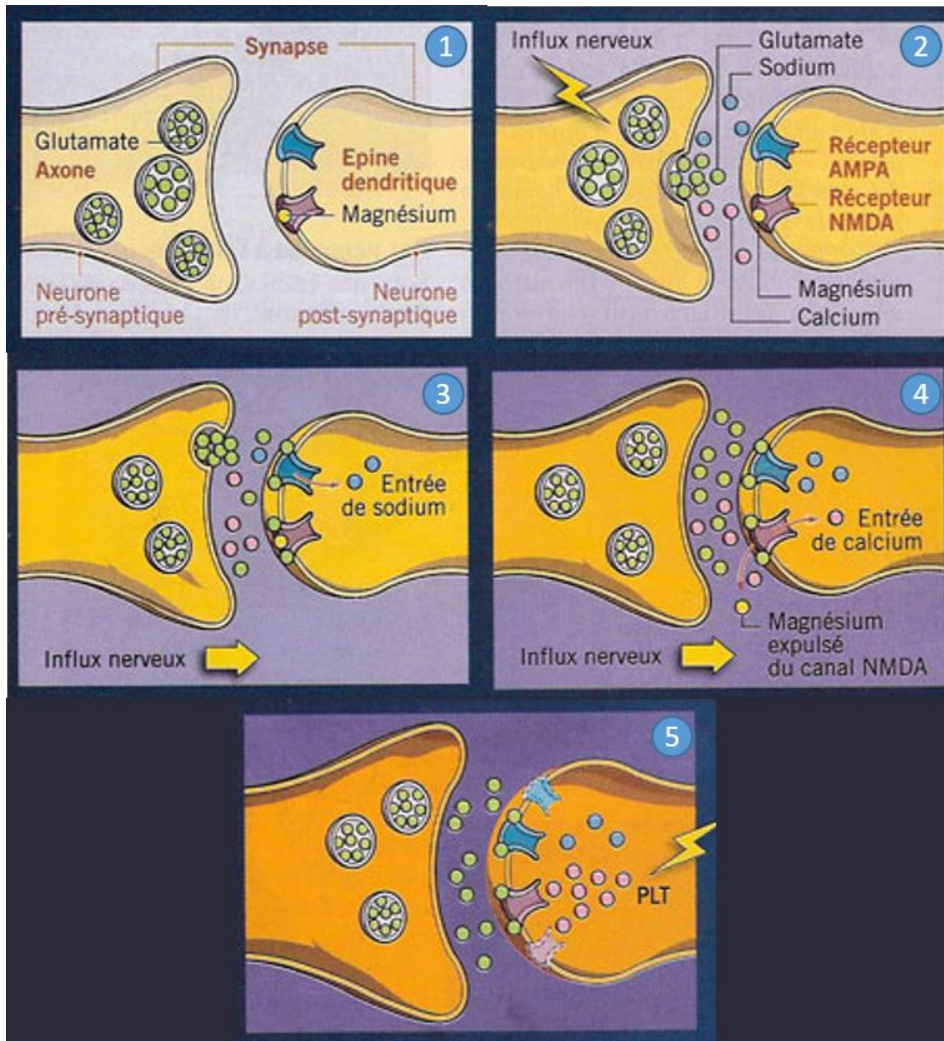


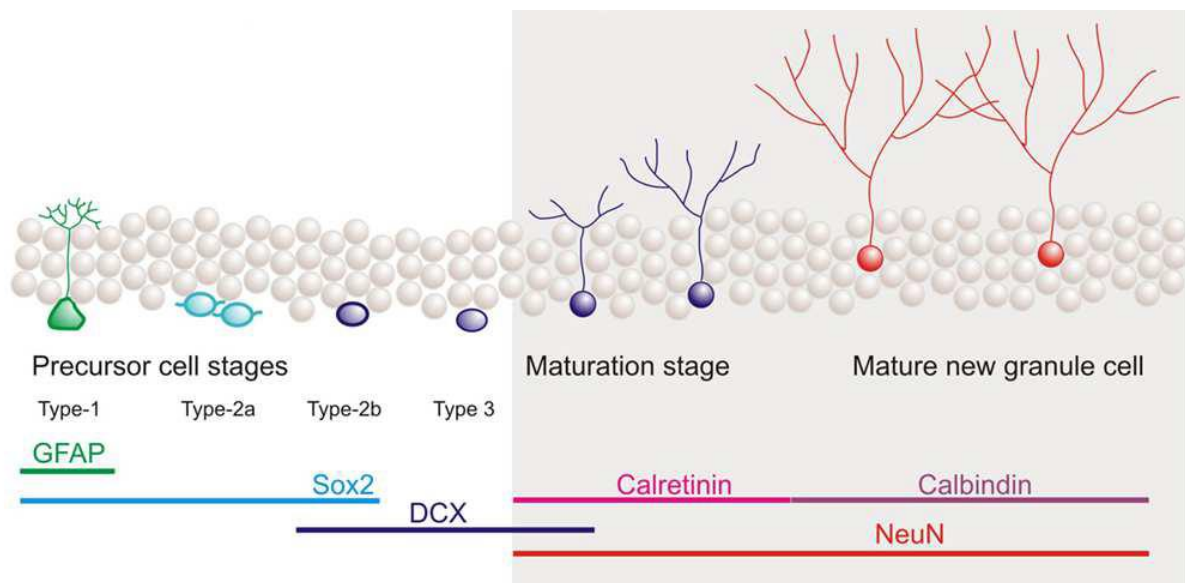
Figure 15 : Schéma de la PLT dépendante des récepteurs NMDA (Source : Sciences et Avenir)

Il existe plusieurs formes de PLT mais au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à celle dépendante de l'activation des récepteurs au glutamate NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), puisque ce type de PLT est connu pour être altéré dans l'hippocampe dorsal dans des modèles d'obésité (Drever et al., 2011; Zhong et al., 2006). Le phénomène de PLT-NMDA peut être décrit de la manière suivante (Fig. 15): (1) au repos, le neurone présynaptique contient des vésicules de glutamate, un des principaux neurotransmetteurs excitateurs. Les récepteurs NMDA présents à la surface du neurone postsynaptique sont bloqués par des ions  $Mg^{2+}$ , (2) une stimulation à haute fréquence de la région présynaptique entraîne une libération de glutamate au niveau de la synapse, (3) la fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA (acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et NMDA entraîne une dépolarisation au niveau synaptique, (4) la dépolarisation post-synaptique associée à la fixation du glutamate sur le récepteur NMDA induit la libération du bloc  $Mg^{2+}$  et permet l'ouverture des canaux calciques et ainsi l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule (5) l'augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  va être à l'origine de l'activation d'une cascade moléculaire de signalisation aboutissant à des mécanismes de synthèse protéique impliqués dans la restructuration de la synapse. Ceci aboutit à des changements durables de l'efficacité de la transmission du signal, qui peuvent se traduire par exemple au niveau présynaptique par une augmentation de la libération de neurotransmetteurs ou, au niveau post-synaptique, par le recrutement de récepteurs AMPA.

### *ii. Neurogenèse hippocampique et mémoire*

La **neurogenèse** se définit comme l'ensemble des processus conduisant à l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones dans les circuits cérébraux. Les travaux démontrant l'existence de la formation de nouvelles cellules, à la morphologie similaire à celle des neurones, dans différentes régions du cerveau adulte telles que le DG de la formation hippocampique, le néocortex et le bulbe olfactif datent des années 60 (Altman, 1962). Depuis cette découverte, différentes études ont confirmé le fait que les nouveaux neurones étaient produits tout au long de la vie. La neurogenèse hippocampique du cerveau adulte prend son origine dans la zone sous-granulaire du DG. Elle se déroule en trois étapes. Brièvement, les cellules se divisent à plusieurs reprises, au moins pendant les quatre jours qui suivent leur naissance. A l'issue de la prolifération, environ 40 % des cellules survivent. Elles migrent ensuite vers la couche granulaire où elles vont se différencier pour s'insérer dans le réseau préexistant (Cameron et al., 1993; Dayer et al., 2003; Manns et al., 2011) (Fig. 16).

Il existe une relation entre la neurogenèse hippocampique et la mémoire. En effet, de nombreux travaux suggèrent qu'une amélioration des performances dans des tâches dépendantes de l'hippocampe résulterait d'une augmentation de la neurogenèse hippocampique. Ainsi, des études rapportent que des animaux élevés en environnement enrichi présentent une amélioration de la neurogenèse hippocampique associée à de meilleures performances mnésiques mesurées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Kempermann et al., 1998; Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999). D'autre part, plusieurs travaux dans lesquels la neurogenèse a été induite ou inhibée démontrent que les nouveaux neurones adultes hippocampiques sont nécessaires dans différentes tâches de mémoire spatiale dépendantes de l'hippocampe (Clelland et al., 2009; Goodman et al., 2010; Nakashiba et al., 2012). Ces données montrent également que les nouveaux neurones sont préférentiellement recrutés dans les réseaux hippocampiques codant les informations spatiales et contextuelles, et qu'ils jouent ainsi un rôle crucial dans les processus mnésiques.



**Figure 16 : Neurogenèse hippocampique et marqueurs associés (adapté de Manns et al., 2011)**

## 2. Obésité et mémoire

### *i. Chez l'Homme*

De nombreuses altérations cognitives sont observées chez les sujets obèses, quel que soit leur âge. En effet, un IMC élevé est corrélé à une augmentation des déficits cognitifs chez l'enfant, l'adolescent, l'adulte et le sujet âgé (Alosco and Gunstad, 2014). L'obésité est également associée à des déficits cognitifs dans des tests permettant d'évaluer l'attention, les

fonctions exécutives et la mémoire. Plusieurs études réalisées chez une population adulte montrent que les sujets obèses présentent des performances cognitives diminuées en comparaison aux sujets minces, et ce même après correction pour d'autres facteurs de risque comme l'hypertension, le cholestérol total et le tabagisme (Benito-Leon et al., 2013; Elias et al., 2005). De plus, une étude réalisée au laboratoire montre que des patients obèses et diabétiques de type 2 ont des scores de fatigue plus élevés, ainsi qu'une augmentation des altérations cognitives en comparaison à des sujets diabétiques de type 1 (Lasselin et al., 2012). Ainsi, ces études montrent un effet délétère de l'obésité sur les fonctions cognitives (Bischof and Park, 2015). Chez l'Homme comme chez l'animal, la consommation de régimes hypercaloriques ou hyperglycémiques a été associée à une perturbation des altérations cognitives (Francis and Stevenson, 2013; Lakhan and Kirchgessner, 2013). Cependant, bien que des mécanismes comme une inflammation augmentée ou une plasticité neuronale diminuée aient été suggérés, beaucoup d'incertitudes demeurent quant à leur rôle dans cette relation. Enfin, l'obésité a été décrite comme étant un facteur de risque important de développer la maladie d'Alzheimer (Reitz and Mayeux, 2014). Il est intéressant de noter que les effets de l'obésité sur les fonctions cognitives peuvent être améliorés par une perte de poids. En effet, une amélioration des fonctions mnésiques est observée 12 semaines après une chirurgie bariatrique (Gunstad et al., 2011). En parallèle de ces effets sur les fonctions cognitives, et notamment mnésiques, l'obésité induit également une diminution de la densité de matière grise dans l'hippocampe de sujets adultes (Mueller et al., 2012a), structure possédant un rôle majeur dans les processus mnésiques, comme décrit précédemment.

### *ii. Dans des modèles d'obésité chez le rongeur*

Chez le rongeur, la consommation de régimes hypercaloriques engendre des altérations cognitives (Andre et al., 2014; Boitard et al., 2014; Boitard et al., 2015; Lakhan and Kirchgessner, 2013). Dans ces études, les animaux sont exposés à différentes conditions expérimentales (durée et âge de début d'exposition au régime différents, teneur en lipides variable, ajout ou non de sucres...) et différents systèmes de mémoire sont évalués. Etant donné l'importance des perturbations de la mémoire déclarative chez l'Homme, et notamment l'augmentation de la prévalence de la maladie d'Alzheimer chez les sujets obèses, la majorité de ces études a porté sur des tâches d'apprentissage et de mémoire nécessitant l'intégrité de l'hippocampe. Ainsi, la consommation d'un régime contenant 60 % de lipides à l'âge adulte pendant 5 (Heyward et al., 2012) et 22 semaines (Pathan et al., 2008) altère l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le rat et la souris. La consommation d'un régime contenant 45 % de

lipides pendant 8 semaines altère la mémoire spatiale chez la souris dans le test du labyrinthe radiaire (Valladolid-Acebes et al., 2011). Au laboratoire, des études ont également mis en évidence des altérations de la cognition chez des rongeurs nourris avec des régimes hypercaloriques. La consommation d'un régime hypercalorique diminue la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe dans le test du labyrinthe en Y chez la souris (Andre et al., 2014). Un régime similaire consommé dès le sevrage altère également la flexibilité de la mémoire relationnelle dans le test du labyrinthe radiaire à l'âge adulte (Boitard et al., 2012)(Boitard et al 2012). Un régime hyperlipidique consommé à partir de 5 semaines d'âge pendant 5 semaines altère également la mémoire dépendant de l'hippocampe dans le test de reconnaissance d'objet (Del Rio et al., 2016; Valladolid-Acebes et al., 2011). Ces résultats sont transposables à une autre espèce puisque chez le rat, la consommation d'un régime hypercalorique pendant l'adolescence altère la mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris à l'âge adulte (Boitard et al., 2014). De façon similaire, l'administration d'un régime hyperlipidique et/ou hyperglycémique chez le rat à l'âge adulte induit des déficits cognitifs dans le test de la piscine de Morris (Goldbart et al., 2006; Molteni et al., 2002; Molteni et al., 2004; Stranahan et al., 2008; Wu et al., 2003). Les modèles d'obésité génétique chez le rongeur développent également des altérations mnésiques dépendantes de l'hippocampe. Ainsi, les souris *db/db* présentent des altérations des performances mnésiques dans les tests de labyrinthe en Y et de la piscine de Morris (Dey et al., 2014; Diné et al., 2011, 2014; Wosiski-Kuhn et al., 2014). Ces altérations cognitives sont associées à une altération de la PLT dans l'hippocampe dorsal et peuvent être améliorées par une diminution du poids corporel des souris (Erion et al., 2014). Des altérations de la cognition sont également décrites chez les souris *ob/ob*. Les performances d'apprentissage et de mémoire spatiale de ces souris sont diminuées dans le test de la piscine de Morris en comparaison aux souris témoins. Ces altérations sont associées à une diminution de l'expression hippocampique de protéines impliquées dans la plasticité synaptique et dans la cognition, comme la synaptophysine (Jeon et al., 2016).

### **B. Troubles de l'humeur**

En plus d'être un facteur de risque pour des altérations cognitives, l'obésité est également associée à un plus grand risque de développer des troubles de l'humeur, regroupant à la fois les symptômes dépressifs et les troubles anxieux (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2014; Castanon et al., 2015). On peut noter que les troubles anxieux peuvent être observés

chez des patients souffrant d'anxiété mais peuvent également être inclus dans la symptomatologie dépressive.

### 1. La dépression

D'après l'OMS, **la dépression** est un trouble mental qui touche plus de 350 millions de personnes dans le monde (OMS, 2016). Selon les critères diagnostiques du DSM-V, un épisode dépressif majeur se définit par la présence de cinq des symptômes suivants sur une période d'au moins deux semaines. Un de ces symptômes doit être soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir.

1. Humeur dépressive présente pratiquement toute la journée, presque tous les jours, signalée par le sujet ou observée par les autres.
2. Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités pratiquement toute la journée, presque tous les jours.
3. Perte ou gain de poids significatif (5 %) en l'absence de régime, ou diminution ou augmentation de l'appétit tous les jours.
4. Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours.
5. Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours.
6. Fatigue ou perte d'énergie tous les jours.
7. Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée presque tous les jours.
8. Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours.
9. Pensées de mort récurrentes, idées suicidaires récurrentes sans plan précis ou tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.

Chez le rongeur, différents tests comportementaux ont été développés afin de mesurer les comportements de type dépressif. Des comportements tels que l'immobilité dans les tests de nage forcée et de suspension par la queue sont censés refléter le comportement de résignation observé chez le sujet dépressif. La perte de plaisir (ou anhédonie) est modélisée par une diminution de la consommation de sucrose dans le test de préférence au sucrose et par une augmentation de la latence à approcher et consommer la nourriture dans le « *novelty suppressed feeding test* » (Powell et al., 2012).



## 2. L'anxiété

Le mot « **anxiété** » dérive du latin *anxietas* qui veut dire « disposition à l'inquiétude ». L'anxiété est une émotion faisant partie du registre émotionnel humain qui peut être décrite comme étant une peur anticipée. Contrairement à la peur qui survient face à un danger réel, l'anxiété se déclenche face à un danger potentiel, incertain. Elle se traduit par des réactions physiologiques (accroissement de la pression artérielle, tachycardie, sueurs...) et comportementales (augmentation de la vigilance et des réponses d'évitement). L'anxiété est une émotion normale qui possède une valeur adaptative. Cependant, lorsqu'elle est continue et excessive, on parle de pathologie anxieuse ou de **troubles anxieux**. La cinquième version du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux, ou DSM-V, classe les troubles anxieux en plusieurs entités : le trouble panique, le trouble d'anxiété sociale, l'agoraphobie, la phobie spécifique, le trouble d'anxiété généralisée, le trouble d'anxiété de séparation et le mutisme sélectif. L'anxiété est le trouble mental dont la prévalence est la plus élevée (14 %) en Europe (Wittchen et al., 2011). Chez l'animal, les tests utilisés pour évaluer les **comportements de type anxieux** sont basés sur des aversions naturelles (ou tests non conditionnés) ou sur des aversions acquises (ou tests conditionnés). Parmi les tests non conditionnés, les tests basés sur le conflit approche/évitement tels que les **tests de champ ouvert (ou Open-field)**, de la **boîte claire/obscur**e et du **labyrinthe en croix surélevé** sont couramment utilisés (Sartori et al., 2011). Bien que les moyens d'évaluer les émotions chez le rongeur soient limités, ces tests modélisent les symptômes principaux de l'anxiété et sont donc complémentaires. De plus, ces tests ont été validés pharmacologiquement puisque l'administration de composés anxiolytiques chez des rongeurs diminue les comportements de type anxieux dans ces paradigmes expérimentaux (Cryan and Slattery, 2007).

## 3. Rôle de l'hippocampe ventral dans les troubles de l'humeur

Les émotions sont complexes et leur régulation implique nécessairement différentes structures, dont celles du système limbique (Rajmohan and Mohandas, 2007). Parmi ces structures (amygdale, cortex cingulaire...), l'hippocampe peut être particulièrement intéressant dans le contexte de l'obésité puisqu'il est particulièrement affecté dans cette condition (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2014; Castanon et al., 2015). De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de l'hippocampe dans la régulation des troubles de l'humeur (Bannerman et al., 2014). Une diminution du volume total de l'hippocampe est observée chez des patients déprimés (Bremner et al., 2000; Campbell et al., 2004; Frodl et al., 2006; Sheline et al., 2003), pouvant être due à une diminution de la densité de neurones et/ou



de cellules gliales, de la taille des neurones, ou de la neurogénèse (Campbell et al., 2004). De façon intéressante, des études de lésions ont mis en évidence que les sous-régions dorsale et ventrale de l'hippocampe étaient impliquées de façon différente dans la régulation de fonctions comportementales. En effet, alors que la sous-région dorsale de l'hippocampe est préférentiellement associée à des fonctions mnésiques, la sous-région ventrale est quant à elle plutôt impliquée dans la régulation des réponses émotionnelles chez les rongeurs (Fig. 12). La lésion de **l'hippocampe ventral** chez le rat entraîne une diminution des comportements de type anxieux dans des tests inconditionnés (basés sur des aversions spontanées chez le rongeur). Par exemple, les rats ayant une lésion de l'hippocampe ventral entrent plus rapidement dans le compartiment éclairé, anxiogène, de la boîte claire/obscur (Bannerman et al., 2002; Bannerman et al., 2003; Kjelstrup et al., 2002). De plus, l'inhibition de la transmission GABAergique, inhibitrice de la LTP, dans l'hippocampe ventral possède un effet anxiolytique chez le rat (Zhang et al., 2014b). Des altérations biologiques mesurées dans l'hippocampe ventral des rongeurs sont également associées à des comportements de type anxieux. En effet, dans un modèle de séparation maternelle chez le rat, le stress induit une diminution des niveaux de neurotrophines NGF (*nerve growth factor*) et NT-3 (neurotrophine-3) dans l'hippocampe ventral, associée à des comportements de type dépressif mesurés par une augmentation du temps d'immobilité dans le test de nage forcée (Marais et al., 2008). Enfin, deux études récentes suggèrent que des traitements antidépresseurs pourraient exercer leurs effets en augmentant la neurogénèse dans l'hippocampe ventral (Sahay and Hen, 2007). La première réalisée chez le rat décrit une augmentation de la neurogénèse dans l'hippocampe ventral par un traitement chronique avec un antidépresseur, l'agomélatine (Banast et al., 2006). La seconde montre qu'un stress chronique diminue la prolifération cellulaire dans l'hippocampe ventral, mais pas dans l'hippocampe dorsal, et diminue la consommation de sucrose dans le test de préférence au sucrose permettant d'évaluer l'anhédonie, caractéristique d'un comportement de type dépressif (Jayatissa et al., 2006). De façon intéressante, l'administration chronique d'escitalopram diminue l'anhédonie et cette amélioration comportementale est corrélée à une amélioration de la neurogénèse dans l'hippocampe ventral.

#### 4. Obésité et troubles de l'humeur

##### *i. Chez l'Homme*

De nombreuses données suggèrent en effet un lien bidirectionnel entre l'obésité et la dépression (Luppino et al., 2010). En effet, la dépression augmente le risque de prendre du

poids et de devenir obèse. Des individus développant des épisodes dépressifs entre 15 et 19 ans ont significativement plus de risques d'avoir un IMC important à l'âge adulte que des individus témoins (Carpenter et al., 2000). Cette observation peut être due aux effets des traitements antidépresseurs ainsi qu'aux modifications du mode de vie et du comportement alimentaire observées chez les patients dépressifs. De plus, le stress psychosocial ressenti par ces patients contribue également à la prise de poids et à des altérations métaboliques, et à terme au développement de l'obésité (Siervo et al., 2009).

A l'inverse, l'obésité est associée à une vulnérabilité aux symptômes dépressifs plus élevée que celle rapportée dans la population générale. Par exemple, la prévalence de symptômes dépressifs est augmentée chez des patients souffrant d'obésité, de DT2 et/ou de syndrome métabolique. Ces symptômes peuvent en partie être expliqués par un sentiment de mal-être lié à une mauvaise image de soi chez ces patients. Cependant, certains facteurs biologiques pourraient également participer à l'étiologie de ces troubles. De façon intéressante, la prévalence élevée de troubles de l'humeur chez les patients obèses est modulée par le degré d'adiposité : 23 % des patients obèses présentent des symptômes dépressifs, alors que la prévalence de la dépression est de 11 % chez les individus ayant un IMC normal (Carey et al., 2014). Des données suggèrent que l'adiposité viscérale en particulier serait importante dans le développement des symptômes dépressifs (Murabito et al., 2013). De plus, les symptômes dépressifs observés chez les patients obèses sont améliorés à la suite d'une chirurgie bariatrique (Lasselin and Capuron, 2014). Les symptômes dépressifs associés à l'obésité favorisent le développement des autres comorbidités de l'obésité, telles que les maladies cardiovasculaires et les altérations métaboliques. Ces complications peuvent induire l'instauration d'un cercle vicieux entre ces comorbidités et les symptômes dépressifs (Capuron et al., 2016).

De plus en plus d'études mettent également en évidence un lien entre obésité et anxiété. Entre autres, une méta-analyse conduite sur 16 études suggère une association positive entre obésité et anxiété (Garipey et al., 2010). Chez des femmes ayant été obèses pendant l'adolescence, le risque de développer des troubles anxieux à l'âge adulte est élevé, en comparaison à des femmes de corpulence normale pendant l'adolescence (Anderson et al., 2007). De plus, une étude réalisée en 2007 sur des femmes obèses montrent que 75 % d'entre elles présentaient un score positif au test d'auto-évaluation de la dépression, et environ 60 % souffraient d'anxiété moyenne à élevée (Giusti and Panchaud, 2007). Les symptômes

d'anxiété observés chez les sujets obèses sont au contraire diminués un an et deux ans après une chirurgie de type « *duodenal switch* » (Andersen et al., 2010). Comme pour la dépression, le lien entre obésité et anxiété est bidirectionnel. En effet, des sujets adultes ayant souffert de troubles anxieux au cours de leur vie ont plus de risque de devenir obèses que ceux n'ayant jamais eu ce diagnostic (Strine et al., 2008). Une étude dans laquelle les participants ont été suivi pendant 19 mois montre que les troubles neuropsychiatriques courants tels que l'anxiété sont prédictifs d'un surpoids ou d'une obésité au cours de l'étude (Kivimaki et al., 2009). De plus, cet effet est dépendant de la fréquence de ces troubles puisque les patients ayant eu plus d'occurrences de troubles anxieux ont un risque plus élevé de devenir obèses.

### *ii. Dans des modèles d'obésité chez le rongeur*

Quelques études précliniques établissent un lien entre anxiété et obésité chez le rongeur. Dans des modèles rongeurs d'obésité induite un régime hypercalorique, les comportements de types dépressif (mesurés dans les tests de préférence au sucrose et de nage forcée ...) et anxieux (boîte claire/obscur) sont augmentés en comparaison aux souris nourries avec le régime standard (Kurhe and Mahesh, 2015; Sivanathan et al., 2015; Souza et al., 2007). Les comportements de type anxieux mesurés chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique sont associés à une diminution de la plasticité synaptique dans l'hippocampe ventral après 11 semaines de régime (Krishna et al., 2015). La consommation de ce type de régime induit la mise en place progressive d'une obésité associée à des comportements de type anxieux, observés par une diminution du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé. Ces comportements de type anxieux sont plus importants après 18 semaines d'exposition au régime que chez les souris témoins, alors que les comportements de type dépressif restent inchangés. De façon intéressante, ces derniers sont en revanche exacerbés en réponse à une injection périphérique de LPS (Andre et al., 2014), ce qui suggère que le régime hypercalorique interfère avec la capacité de l'organisme à répondre de façon approprié à une stimulation immune. Les comportements de type dépressif sont d'ailleurs également augmentés dans des modèles animaux d'obésité lorsque les conditions sont particulièrement stressantes (exposition prolongée ou répétée à un test, expositions successives à différents tests comportementaux sur une courte période de temps) (Collin et al., 2000; Sharma and Fulton, 2013). De façon similaire, des souris rendues obèses par ablation post-natale des neurones POMC présentent des comportements de type anxieux dans les tests de la boîte claire/obscur et du labyrinthe en croix surélevé (Greenman et al., 2013). Les modèles d'obésité plus sévère, comme les souris *ob/ob* et *db/db*, développent

également des altérations des comportements émotionnels. Les souris *ob/ob*, déficientes en leptine, ont des comportements de type anxieux augmentés dans le test de la boîte claire/obscur et dans deux tests d'hyponéophagie en comparaison aux souris témoins (Finger et al., 2010). L'administration chronique de leptine à ces animaux pendant 5 jours permet de supprimer les comportements de type anxieux observés (Asakawa et al., 2003). Au laboratoire, une augmentation des comportements de type anxieux a été mise en évidence chez les souris obèses *db/db* en comparaison aux souris contrôles *db/+*. En effet, les souris *db/db* passent moins de temps au centre de l'open-field et entrent moins dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé que les souris *db/+* (Dinel et al., 2011, 2014). De façon intéressante, les souris *db/db* ne présentent pas plus de comportements de type dépressif que les souris *db/+* (Dinel et al., 2011), ce qui suggère que des mécanismes différents pourraient être impliqués dans la régulation de ces différents comportements.

Ainsi, l'obésité est associée à des troubles de l'humeur et de la cognition. Ces altérations neuropsychiatriques peuvent avoir un impact négatif sur le bien-être des patients et compromettre la prise en charge de l'obésité. La compréhension des mécanismes impliqués dans cette association est donc d'une importance majeure.

### C. Mécanismes sous-tendant les altérations comportementales associées à l'obésité

Comme décrit dans le chapitre I, l'obésité est associée à des dérégulations de différents systèmes biologiques, en particulier de l'axe corticotrope et du système immunitaire. Comme nous allons le détailler dans ce paragraphe, ces deux systèmes sont altérés à la fois chez des sujets obèses et chez des individus souffrant de troubles émotionnels et/ou cognitifs. De plus, leur implication dans la physiopathologie de ces troubles a déjà été décrite dans d'autres pathologies. Ils sont donc potentiellement impliqués dans le développement de troubles neuropsychiatriques chez les sujets obèses.

#### 1. L'axe corticotrope

Comme dans des situations d'obésité, des perturbations du fonctionnement de l'axe corticotrope ont été décrites chez des patients souffrant de troubles de l'humeur et dans des contextes d'altérations cognitives. L'axe corticotrope est donc un candidat potentiel pour expliquer l'association entre obésité et troubles neuropsychiatriques. Nous nous sommes intéressés à ce système puisque des altérations de l'axe corticotrope ont été décrites chez le modèle murin d'obésité *db/db* (Dinel et al., 2011; Stranahan et al., 2008) et qu'il a récemment

été démontré qu'elles pouvaient être impliquées dans le développement d'altérations cognitives chez ces souris (Dey et al., 2014).

L'hypercortisolémie qui caractérise la maladie d'Alzheimer, pourrait participer au développement des altérations cognitives associées à cette maladie puisqu'elle est associée à une atrophie de l'hippocampe (Pomara et al., 2003). L'hypothèse de la cascade GC, établissant un lien entre l'axe corticotrope et les altérations hippocampiques, a été suggérée par Sapolsky et collaborateurs en 1986 (Sapolsky, 1986). En effet, le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope est fortement atténué au cours du vieillissement (Bizon et al., 2001; Boscaro et al., 1998), ce qui conduit à une hypersécrétion de GC pendant les périodes d'exposition au stress (Born et al., 1995; Sapolsky, 1982). Une diminution d'expression des récepteurs des GC a pu être observée chez l'animal âgé dans l'hippocampe, mais également dans des structures corticales telles que le cortex préfrontal médian et le cortex olfactif (Bizon et al., 2001; Lee et al., 2012; Mizoguchi et al., 2009). Ce phénomène potentialiserait les effets délétères de la sur-activation de l'axe corticotrope sur ces structures en maintenant une hypersécrétion de GC. Dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, l'utilisation d'inhibiteurs des GC semble avoir une action bénéfique sur les altérations mnésiques (Pomara et al., 2003). Cette hypothèse est d'autant plus probante que des corrélations entre l'hyper-activation de l'axe corticotrope, l'altération de l'expression hippocampique des GR et le développement de troubles émotionnels et mnésiques ont été mises en évidence (Bizon et al., 2001; Issa et al., 1990; Lee et al., 2012).

Chez les patients souffrant de dépression majeure, une hyperactivité de l'axe corticotrope a également été décrite. En particulier, une augmentation du cortisol dans le plasma, l'urine et le liquide céphalorachidien (LCR) est observée chez ces patients, ainsi qu'une synthèse accrue de cortisol en réponse à l'ACTH et une augmentation de la taille de l'hypophyse et des glandes surrénales (Holsboer and Barden, 1996; Nemeroff, 1996). De plus, ces patients présentent des concentrations augmentées de CRH dans le LCR, une augmentation de l'expression génique et protéique de la CRH dans le PVN de l'hypothalamus (données post-mortem) et une synthèse d'ACTH atténuée en réponse à une stimulation de CRH (Nemeroff, 1996). Il a été suggéré que les niveaux augmentés de CRH dans l'hypothalamus soient dus à un rétrocontrôle négatif altéré (Pariante and Miller, 2001). Des manipulations expérimentales de ce rétrocontrôle de l'axe corticotrope peuvent induire des symptômes dépressifs (Pariante, 2006). De plus, des événements traumatisants pendant

l'enfance et des stress psychosociaux répétés, qui sont des facteurs de risque pour la dépression et les troubles anxieux, sont caractérisés par une hyperactivité de l'axe corticotrope (Pariante and Lightman, 2008). Certaines études suggèrent que les glucocorticoïdes contribueraient à l'atrophie de l'hippocampe observée chez les patients dépressifs (McEwen, 2005; Sapolsky, 2000). Chez la souris, une injection chronique de corticostérone pendant 6 semaines induit des comportements de type anxieux dans les tests de l'open field et de la boîte claire/obscur et de type dépressif dans le test de la nage forcée (Nicolas et al., 2015), associés à une neuroinflammation (Chabry et al., 2015) et à une diminution de la neurogenèse dans l'hippocampe (Nicolas et al., 2015). La dépression est de plus caractérisée par une diminution de la sensibilité aux GC (Pariante, 2006; Pariante and Lightman, 2008). L'utilisation d'antidépresseurs chez l'Homme, l'animal et dans des modèles *in vitro* semblent améliorer la fonction des GR (Zunszain et al., 2011). Des altérations de l'axe HPA ont également été décrites chez des patients souffrant de troubles anxieux. Par exemple, les taux salivaires de cortisol 1 h après le réveil sont plus élevés chez des patients anxieux que chez des patients sains (Vreeburg et al., 2010). De plus, certains patients souffrant de troubles paniques ont une hypercortisolémie pendant la nuit, corrélée à des altérations du sommeil (Abelson and Curtis, 1996). Chez des enfants souffrant de troubles anxieux, une inquiétude excessive prédit de faibles taux de cortisol salivaire le matin au réveil. De plus, l'intensité des symptômes anxieux chez ces enfants prédit les concentrations de cortisol dans la salive en milieu de journée (Kallen et al., 2008).

De façon similaire aux observations faites chez les individus âgés, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou chez les sujets dépressifs et/ou anxieux, les sujets obèses présentent également des altérations du métabolisme du cortisol (Rask et al., 2001). De même, des dysfonctionnements de l'axe corticotrope ont été observés dans des modèles animaux d'obésité. Ainsi, la souris *ob/ob* présente une hyper-corticostéronémie et une obésité réversible par surrénalectomie (Naeser, 1973). Ces altérations de l'axe corticotrope sont, comme décrit précédemment, associées à une augmentation des comportements de type anxieux. Le rat obèse Zucker présente également une hyper-corticostéronémie associée à une diminution de la réactivité de l'axe corticotrope après stimulation avec de la CRH (Castonguay et al., 1986). Cette hypersécrétion de corticostérone pourrait être à l'origine des troubles anxieux observés dans des situations d'obésité. Dans le modèle d'obésité *db/db*, les comportements de type anxieux et les altérations cognitives dépendantes de l'hippocampe sont associées à une augmentation des taux de corticostérone circulante (Dinel et al., 2011,

2014). Des études réalisées récemment par l'équipe de Stranahan montrent que les taux élevés de GC plasmatiques et hippocampiques chez ces souris contribuent directement aux altérations de plasticité synaptique et de neurogénèse dans l'hippocampe dorsal et aux déficits d'apprentissage et de mémoire qui leurs sont associés (Stranahan et al., 2008; Wosiski-Kuhn et al., 2014). De plus, il apparait que chez des animaux soumis à un régime hyperlipidique, les niveaux élevés de GC circulants, ainsi que l'expression des GR diminuée dans l'hippocampe, puissent contribuer à l'augmentation des comportements de type anxieux (Boukoulalas et al., 2008; Sasaki et al., 2013).

Ainsi, les dérégulations de l'axe corticotrope, manifestées par les individus obèses, sont avancées comme étant un des mécanismes potentiels dans l'apparition des troubles émotionnels et cognitifs décrits chez ces personnes. Par ailleurs, l'axe corticotrope et le système immunitaire, dont le rôle dans le développement de troubles neuropsychiatriques a déjà été décrit dans d'autres conditions, comme nous allons le voir, sont étroitement liés. Ceci suggère donc que ces deux systèmes pourraient, par leurs actions combinées, jouer un rôle majeur dans la mise en place des altérations émotionnelles et cognitives observées chez les individus obèses.

### 2. L'inflammation

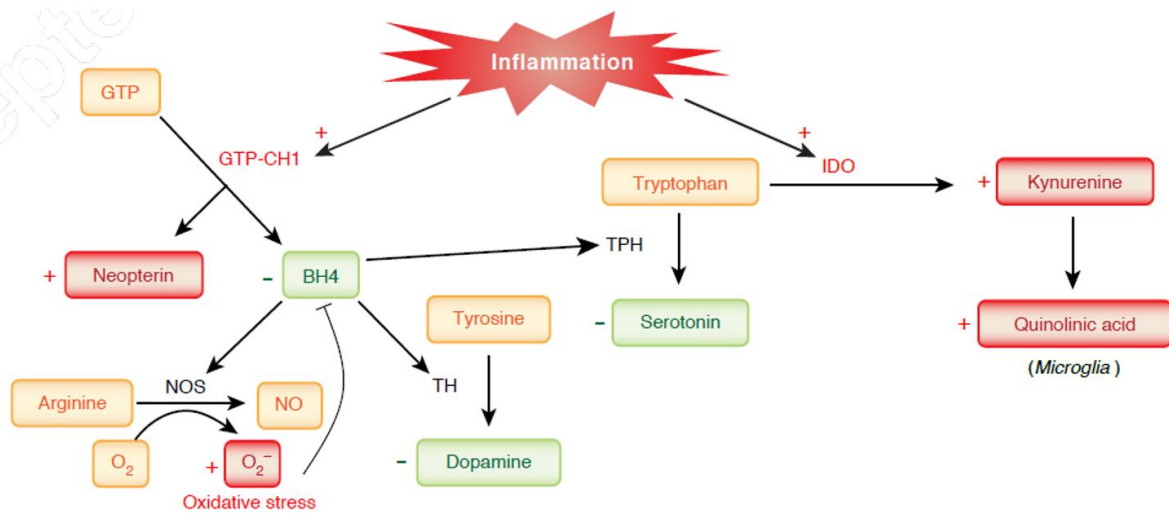
Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle clé des cytokines pro-inflammatoires dans le développement de symptômes neuropsychiatriques (Allison and Ditor, 2014; Capuron and Castanon, 2016; Crupi and Cuzzocrea, 2016; Dantzer, 2006; Dantzer et al., 2008; Dantzer et al., 2011; Fourier et al., 2015a; Fourier et al., 2015b; Furtado and Katzman, 2015a, b; Hodes et al., 2015; Schedlowski et al., 2014). Dans le cerveau, les cytokines sont capables de moduler différents systèmes impliqués dans la régulation du comportement, dont le métabolisme et le fonctionnement des systèmes de neurotransmission, les systèmes neuroendocriniens ou la plasticité neuronale. Lors d'une infection, la production de cytokines dans le cerveau coordonne le comportement de maladie, permettant à l'organisme de lutter contre l'agent infectieux. Le comportement de maladie disparaît en quelques jours, une fois que la source de l'infection a été éliminée et que le système de l'immunité inné n'est plus activé. Cependant, il existe des situations dans lesquelles une synthèse prolongée de cytokines périphériques et centrales est observée. Cette activation chronique du système immunitaire peut conduire à l'apparition de symptômes neuropsychiatriques, en particulier lorsque des structures régulant les émotions et la cognition,

telles que l'hippocampe, sont affectées (Castanon et al., 2015). En effet, des taux importants de cytokines sont corrélés à une perturbation de la cognition. L'administration de cytokines, ou l'induction de leur synthèse, induit des altérations mnésiques. En effet, l'injection de LPS chez l'Homme induit des troubles de l'humeur indépendamment du comportement de maladie. Bien que la production périphérique de cytokines induite par le LPS soit plus élevée chez les femmes que chez les hommes, les symptômes neuropsychiatriques associés sont similaires entre les deux sexes (Engler et al., 2016). L'élévation du taux plasmatique d'IL-6 a été corrélée aux altérations cognitives dans plusieurs études réalisées chez des sujets âgés (Rafnsson et al., 2007; Weaver et al., 2002). Le rôle de l'IL-6 dans le déclin des fonctions cognitives a également été mis en évidence par l'utilisation de souris transgéniques, d'une part déficientes pour le gène de l'IL-6, d'autre part surexprimant l'IL-6. Les souris IL-6 KO sont ainsi protégées de la diminution liée à l'âge des performances d'apprentissage spatial et de mémoire (Braida et al., 2004), tandis qu'une surexpression chronique de l'IL-6 dans le cerveau des souris induit des déficits d'apprentissage pendant le vieillissement. Ces déficits sont corrélés à des marqueurs de neurodégénérescence dans le cortex frontal et l'hippocampe (Heyser et al., 1997). Des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire dépendants de l'hippocampe (notamment les apprentissages spatiaux) ont également été mises en évidence suite à l'injection d'IL-1 $\beta$  ou de LPS (Goshen et al., 2007; Rosi et al., 2006). De plus, l'administration d'IL-1 $\beta$  ou une surexpression d'IL-6 altèrent aussi la PLT hippocampique (Di Filippo et al., 2013; Nelson et al., 2012) et une diminution de l'activité neuronale apparaît dans l'hippocampe 6h après injection de LPS (Frenois et al., 2007). Des études cliniques ont permis de montrer que 21 à 58 % des patients recevant un traitement à base de cytokines, en particulier d'IFN- $\alpha$ , dans le cadre d'un cancer ou d'une hépatite C, développent des symptômes dépressifs (Raison et al., 2005). Chez l'animal, l'induction d'un stimulus immunitaire induit des comportements de types dépressif et anxieux, dépendants de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  (Goshen et al., 2008; Lacosta et al., 1999b; Merali et al., 2003; O'Connor et al., 2009c). Ces comportements peuvent perdurer plus de 24h après l'administration de LPS, alors même que les altérations locomotrices qui sont caractéristiques du comportement de maladie sont dissipées (Frenois et al., 2007; O'Connor et al., 2009c). Cette dissociation temporelle entre induction du comportement de maladie d'une part et de comportements de type dépressif et anxieux d'autre part suggérerait donc l'implication de mécanismes physiopathologiques distincts.



Au niveau des monocytes, macrophages et cellules microgliales activées, les cytokines inflammatoires sont capables d'induire la synthèse de différentes enzymes telles que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la GTP-cyclohydrolase 1 (GTP-CH1), qui vont alors altérer la biosynthèse de monoamines (sérotonine, dopamine...) connues pour jouer un rôle majeur dans la régulation de l'humeur (Fig. 17). L'activation de l'IDO par les cytokines fait partie de la réponse inflammatoire à une infection (Andre et al., 2008; Moreau et al., 2008). L'IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel précurseur de la sérotonine (Reus et al., 2015). Ainsi, l'activation de l'IDO, qui dégrade alors le tryptophane en kynurenine, peut entraîner une réduction de la production de sérotonine. Cette activation due à une inflammation aiguë est généralement bénéfique. Cependant, une activation prolongée de l'IDO cérébrale peut être délétère puisqu'elle a un impact négatif sur la neurotransmission monoaminergique, mais également sur la survie neuronale. De façon intéressante, le développement de symptômes neuropsychiatriques chez des patients souffrant de pathologies à composantes inflammatoires comme la maladie d'Alzheimer est associé à des niveaux élevés de kynurenine circulante (Gulaj et al., 2010). De plus, l'injection chronique par voie intraveineuse d'IL-2 ou d'IFN- $\alpha$  provoque chez l'homme une chute des taux circulants de tryptophane, corrélée positivement à l'intensité des symptômes anxieux (Capuron and Dantzer, 2003). Au laboratoire, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'IDO dans le développement de comportements de type dépressif associés à une inflammation aiguë tels qu'une injection de LPS ou du bacille de Calmette-Guérin (Moreau et al., 2008; O'Connor et al., 2009a; O'Connor et al., 2009b; O'Connor et al., 2009c). Des contextes d'inflammation chronique comme l'obésité sont également associés à des dysfonctionnements du métabolisme de l'IDO associées à des altérations cognitives (Andre et al., 2014; Diné et al., 2011, 2014). Chez un modèle de rat diabétique, les comportements de type anxieux observés dans le test de nage forcée sont améliorés suite à l'administration de 1-méthyl-tryptophan, un inhibiteur de l'IDO (da Silva Dias et al., 2015). Les comportements de type dépressif induits par un stress chronique chez le rat peuvent également être améliorés par l'administration d'un anti-TNF- $\alpha$  *via* une diminution de l'activation d'IDO (Fu et al., 2016). De façon concomitante, les cytokines réduisent la disponibilité synaptique de la dopamine en agissant sur les enzymes responsables de la synthèse de ce neurotransmetteur. Les cytokines inflammatoires activent en effet l'enzyme GTP-CH1, enzyme limitante de la synthèse de néoptérine. Cette activation induit ainsi la production de néoptérine au détriment de la tétrahydrobioptérine (BH4). La BH4 est un cofacteur de la tyrosine hydroxylase, enzyme

limitante de la synthèse des catécholamines, dont la dopamine. La réduction de la disponibilité de la BH4 entraîne ainsi la diminution de la synthèse de dopamine. L'activation de GTP-CH1 par les cytokines, indirectement mesurée par l'augmentation de la production de néoptérine, est ainsi capable d'altérer la production de dopamine, qui est impliquée dans la régulation de l'humeur (Murr et al., 2002). En accord avec ces données, des niveaux réduits de BH4 et une augmentation de la concentration de néoptérine dans le sang ont été mesurés chez des patients souffrant de troubles neuropsychiatriques. Il est important de noter que, chez la personne âgée, l'inflammation chronique à bas bruit s'accompagne de l'activation d'IDO et de GTP-CH1, qui est corrélée aux altérations neuropsychiatriques fréquemment observées dans cette population.



**Figure 17 : Modulation de l'activité de l'IDO et de la GTP-CH1 par les cytokines (Capuron et al., 2016)**

Dans des contextes de maladies à composante inflammatoire associées à des altérations neuropsychiatriques, des études manipulant l'inflammation de façon directe ou indirecte suggèrent que des traitements anti-inflammatoires pourraient avoir un effet bénéfique dans la prise en charge de ces altérations comportementales. Par exemple, des études menées chez l'Homme et chez le rongeur montrent qu'une restriction calorique, connue pour avoir des propriétés anti-inflammatoires à la périphérie et dans le cerveau (Higami et al., 2006; Kim et al., 2006; Radler et al., 2015), améliore à la fois les réponses émotionnelles et la cognition (Kim et al., 2016; Redman and Ravussin, 2011). De plus, l'administration de molécules anti-inflammatoires, comme l'ibuprofène ou l'aspirine,

améliore les symptômes neuropsychiatriques dans des modèles animaux de maladies inflammatoires comme le cancer (Llorens-Martin et al., 2014; Norden et al., 2015), la maladie d'Alzheimer (Llorens-Martin et al., 2014) ou la maladie de Parkinson (Zaminelli et al., 2014). De même, l'inhibition ciblée de certaines cytokines améliore également les troubles de l'humeur et de la cognition, à la fois chez l'Homme et chez l'animal. Par exemple, des patients atteints de psoriasis ou de polyarthrite rhumatoïde traités avec un inhibiteur du TNF- $\alpha$  rapportent une amélioration significative de leurs symptômes dépressifs associés à la maladie et de leur bien-être général suite à la prise du traitement (Fleming et al., 2015; Kekow et al., 2011). De même, l'inhibition du TNF- $\alpha$  chez la souris diminue les comportements de types anxieux et dépressif (Bayramgurler et al., 2013; Haji et al., 2012).

Comme décrit précédemment, l'obésité est une condition d'inflammation chronique à bas bruit. L'ensemble des données reliant inflammation et troubles neuropsychiatriques a donc conduit à poser l'hypothèse que l'inflammation présente chez les individus obèses pourrait contribuer au développement de ces altérations comportementales. La prévalence des troubles dépressifs et anxieux est associée aux mesures d'adiposité viscérale (Everson-Rose et al., 2009), et la production excessive de facteurs inflammatoires par les adipocytes pourrait participer au développement de ces troubles (Salim et al., 2012; Valkanova et al., 2013; Vidrih et al., 2012). L'hippocampe est une structure cérébrale particulièrement sensible à l'inflammation associée à l'obésité. L'expression de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des voies de signalisation qui leurs sont associées sont augmentées dans cette région après 20 semaines de régime hyperlipidique (Jeon et al., 2012; Lu et al., 2011). Cette inflammation hippocampique est associée à des altérations de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris. Dans ces deux études, une diminution de l'inflammation est associée à une amélioration des performances cognitives. Chez la souris *db/db*, les altérations émotionnelles et cognitives observées sont associées à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe (Dinel et al., 2011). En revanche, chez des souris devenues obèses suite à la consommation d'un régime hypercalorique, l'expression des ARNm des cytokines inflammatoires dans l'hippocampe n'est pas modifiée en conditions basales mais est exacerbée en réponse à une injection de LPS (Andre et al., 2014). De plus, l'équipe de Stranahan a récemment mis en évidence chez les souris *db/db* le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans les altérations de la PLT et de la mémoire dépendante de l'hippocampe qui y sont associées (Erion et al., 2014). De plus, des patients souffrant d'obésité sévère associée à une forte prévalence de symptômes neuropsychiatriques ont

également une activation élevée de l'IDO, ainsi qu'une atrophie hippocampique, en comparaison à des sujets non obèses (Brandacher et al., 2006, 2007). Chez l'animal, l'activation d'IDO chez des souris obèses induit une forte augmentation des concentrations cérébrales de kynurenine et l'exacerbation des comportements de type dépressif (André et al., 2014). De plus, l'administration de kynurenine à des souris normo-pondérales induit des comportements de type anxieux et de type dépressif ainsi que des altérations cognitives (Agudelo et al., 2014; Alexander et al., 2012; Chess et al., 2009; Salazar et al., 2012). Ces données suggèrent donc que de la même manière, l'activation de l'IDO pourrait jouer un rôle dans le développement de symptômes neuropsychiatriques induits par l'inflammation associée à l'obésité (Castanon et al., 2015). Chez les souris *db/db*, une étude réalisée au laboratoire a montré que l'activation de l'IDO en réponse à une injection de LPS est plus faible chez les souris *db/db* que chez les souris *db/+* (Dinel et al., 2014). Ce résultat est associé à une absence des comportements de type dépressif observés en réponse au LPS chez les souris contrôles. Des taux de néoptérine élevés ont été mesurés chez le sujet et le rongeur obèse (Finkelstein et al., 1982; Ledochowski et al., 1999; Oxenkrug et al., 2011), ce qui suggère que l'activation de GTP-CH1 par les cytokines dans un contexte d'obésité, et les altérations de la neurotransmission dopaminergique qui en résultent pourraient également contribuer au développement des symptômes neuropsychiatriques associés à l'obésité. Ainsi, il serait possible d'envisager que l'état d'inflammation chronique à bas bruit observé dans l'obésité puisse avoir des conséquences sur le cerveau et plus particulièrement sur la mise en place de troubles neuropsychiatriques (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2014; Castanon et al., 2015; Lasselin and Capuron, 2014; Miller and Spencer, 2014).

Si les cytokines inflammatoires peuvent moduler des systèmes de neurotransmission en activant des enzymes comme l'IDO ou la GTP-CH1, de plus en plus d'études suggèrent que la résistance à l'insuline pourrait être un intermédiaire supplémentaire de l'effet des cytokines sur la cognition et/ou l'humeur. En effet, des études ont montré que les cytokines inflammatoires, en particulier l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , pouvaient altérer la voie de signalisation intracellulaire associée au IR, à la périphérie et dans le cerveau (De Souza et al., 2005; Hotamisligil, 2006; Lann and LeRoith, 2007; Xu et al., 2003). De façon intéressante, la localisation des IR dans des structures telles que l'hippocampe et la capacité de l'hormone à moduler certaines fonctions neuronales et l'humeur ont permis d'envisager un rôle de la résistance à l'insuline dans la mise en place des troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité (Blazquez et al., 2014; Ghasemi et al., 2013b). En effet, des données révèlent des

altérations de la voie de signalisation de l'insuline dans différentes pathologies neurologiques et neuropsychiatriques comme la maladie d'Alzheimer (Blazquez et al., 2014; Ghasemi et al., 2013a; Yates et al., 2012). De plus, chez les souris obèses *db/db*, la résistance à l'insuline mesurée dans des structures associées à la régulation des émotions et de la cognition, comme l'hippocampe et le cortex, est associée à des altérations cognitives (Dey et al., 2014; Kim et al., 2011). A l'inverse, des composés capables d'améliorer la signalisation de l'insuline améliorent également les symptômes dépressifs ou les comportements de type dépressif (Cline et al., 2015; Cline et al., 2012; Gupta et al., 2014; Pomytkin et al., 2015). De plus, l'administration d'exendine-4, un médicament antidiabétique, à des souris hyperglycémiques améliore les altérations cognitives de ces souris en réduisant l'inflammation hippocampique (Huang et al., 2012). Ainsi, l'altération de la voie de signalisation de l'insuline pourrait contribuer au développement de troubles de l'humeur et de la cognition dans un contexte d'obésité, en interagissant avec les cytokines cérébrales.

Les altérations neuropsychiatriques associées à l'obésité et décrites ci-dessus ont un impact considérable sur la qualité de vie et la prise en charge médicale du patient, ainsi que sur le risque de complications de l'obésité. Comme nous l'avons vu, l'implication d'altérations neurobiologiques telles que des dérégulations de l'axe corticotrope et une inflammation chronique à bas bruit ont été mises en évidence dans des contextes de troubles neuropsychiatriques comme le stress chronique, la maladie d'Alzheimer et la polyarthrite rhumatoïde. Les relations fortes entre ces systèmes biologiques et la régulation de l'humeur et de la cognition suggèrent donc qu'ils puissent être impliqués dans les altérations comportementales associées à l'obésité. La compréhension de ces mécanismes dans le contexte de l'obésité pourrait donc permettre d'identifier des cibles potentielles pour le développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques visant à améliorer la prise en charge de ces troubles comportementaux.

### **III- La nutrition : une stratégie thérapeutique non pharmacologique**

Dans le but d'améliorer les troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité, la mise en place de stratégies thérapeutiques non pharmacologiques telles qu'une perte de poids induite par une chirurgie bariatrique ou par un régime faible en calories, ou des approches nutritionnelles revêt un intérêt particulier. En effet, des modifications du mode de vie, notamment des habitudes alimentaires, ont un effet bénéfique sur la santé, en particulier

chez des sujets obèses (Blackburn, 1995; Goldstein, 1992). De plus, le coût économique de ce type d'interventions est moindre en comparaison à des traitements pharmacologiques, qui sont également associés à un risque plus élevé d'effets secondaires (Gillies et al., 2007). Enfin, l'apport de certains nutriments dans l'alimentation pourrait représenter une stratégie intéressante puisqu'ils peuvent agir de manière non spécifique sur les différentes altérations associées à l'obésité. En effet, comme nous allons le détailler dans ce chapitre, des nutriments comme les **acides gras polyinsaturés (AGPI)** de type n-3, les **antioxydants** ou ceux présents dans les **prébiotiques** peuvent avoir un impact à la fois sur le métabolisme, l'inflammation, l'axe corticotrope et les troubles neuropsychiatriques.

### A. Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

#### 1. Généralités

Un acide gras est constitué d'une chaîne aliphatique hydrophobe terminée par un groupement carboxylique (fonction acide). Ces acides gras sont classés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée et du nombre d'insaturations (ou double liaison) : les acides gras saturés (AGS) dont tous les atomes de carbones sont saturés en hydrogène et qui ne présentent aucune insaturation ; les acides gras monoinsaturés (AGMI) qui se caractérisent par une insaturation carbone-carbone et les AGPI qui 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'insaturations 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 ou 18:3 ω3. On distingue ainsi deux familles d'AGPI : les **AGPI ω3 ou n-3**, dont la première double liaison est située sur le 3<sup>e</sup> atome de carbone à partir de l'extrémité méthylrique, et les AGPI ω6 ou n-6 dont la première double liaison se situe sur le 6<sup>e</sup> atome de carbone à partir de l'extrémité méthylrique.

L'acide linoléique (18:2n-6, LA) et l'ALA (18:3n-3) sont des acides gras dits indispensables car les mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires à leur synthèse *de novo*, alors qu'ils sont nécessaires au fonctionnement de leur organisme (Holman, 1998; Spector, 1999). Ces acides gras sont les précurseurs des AGPI à longue chaîne des séries n-6 dont fait partie l'acide arachidonique (20:4n-6, AA) et n-3 comprenant l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (22:6n-3, DHA). Les AGPI à longue chaîne n-3 et n-6 sont dits essentiels car ils sont impliqués dans le fonctionnement de

l'organisme. Ils entrent en effet dans la composition des membranes cellulaires où ils sont incorporés sous forme de phospholipides. Ils sont aussi les précurseurs des médiateurs lipidiques eicosanoïdes et docosanoïdes et possèdent des effets anti-inflammatoires (Calder, 2006; Kliewer et al., 1997).

Parce que les deux séries d'AGPI sont en compétition pour l'utilisation des enzymes nécessaires à leur biosynthèse (Fig. 18) et qu'ils possèdent des propriétés physiologiques distinctes, le ratio n-6/n-3 selon lequel ils sont apportés par l'alimentation est donc important. A l'origine, les Hommes consommaient un régime riche en AGPI n-3 et appauvri en AGPI n-6 et acides gras saturés, car les animaux sauvages qu'ils consommaient avaient des teneurs en AGPI n-3 bien plus importantes que les aliments commercialisés de nos jours (Simopoulos, 2002). Suite à la modification des habitudes alimentaires et de l'agriculture depuis la révolution industrielle, l'apport des AGPI dans l'alimentation est passé d'un ratio n-6/n-3 de 1 à près de 20 dans certains pays industrialisés comme les Etats-Unis, créant une carence importante en AGPI de la série n-3 (Raper et al., 1992; Simopoulos, 2002). En France, le ratio n-6/n-3 est compris entre 12 et 20, ce qui se caractérise par un apport important en LA (4,2 %) et un apport faible en ALA (seulement 0,37 %), EPA et DHA. De nombreuses huiles (pépins de raisin, tournesol, noix...) ont une teneur en LA élevée alors que l'ALA est présent dans certains légumes verts, le soja et les noix. L'EPA et le DHA quant à eux, se trouvent principalement dans le poisson gras (saumon, maquereau, thon) (James et al., 2000). Chez l'animal nourri avec un régime hypercalorique, une supplémentation en AGPI n-3 protège de la prise de poids, de l'intolérance au glucose et de l'inflammation du tissu induites par le régime (Belchior et al., 2015).

Après le tissu adipeux, le cerveau et la rétine sont les organes qui contiennent le plus d'acides gras (50 à 60 % du poids sec du cerveau est constitué de lipides), qui sont principalement des AGPI (35 % des lipides du cerveau) (Lauritzen et al., 2001; Sastry, 1985). L'AA et le DHA sont les AGPI majoritaires dans les membranes cellulaires du système nerveux où ils sont principalement incorporés dans les phospholipides des membranes neuronales (Sastry, 1985; Yehuda et al., 1999).

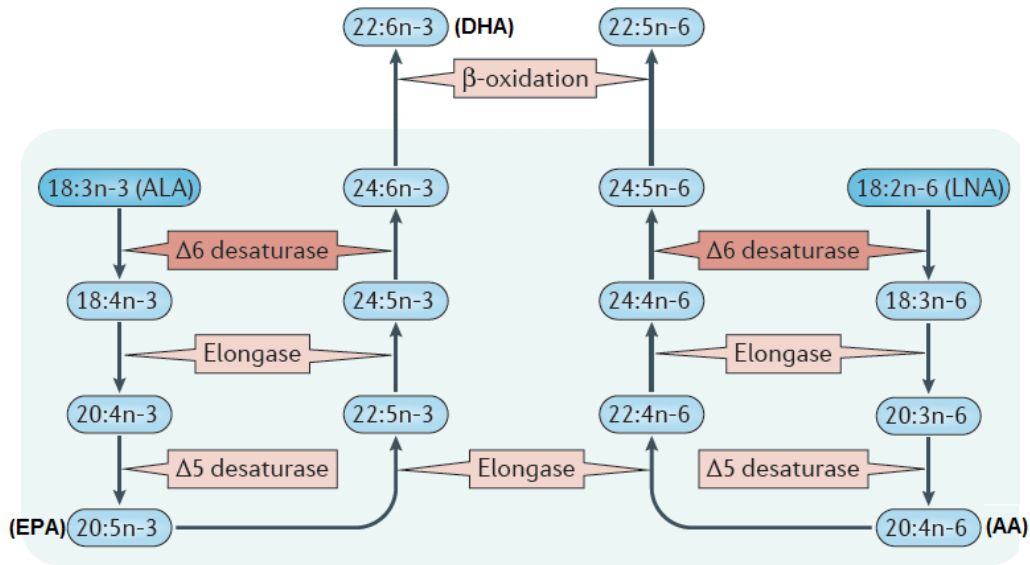


Figure 18 : Voies de synthèse des AGPI n-3 et n-6 (adapté de Bazinet and Layé 2014)

## 2. AGPI n-3 et troubles neuropsychiatriques

De nombreuses études montrent l'implication des AGPI n-3 issus de l'alimentation dans les fonctions cognitives (Bazinet and Laye, 2014; Joffre et al., 2014). Il a été montré qu'une déficience en AGPI n-3 avait des effets délétères sur le développement cognitif du cerveau. Des suppléments en AGPI n-3 peuvent quant à elles avoir des effets bénéfiques sur la cognition chez des sujets sains, à la fois chez l'enfant, l'adulte jeune et l'adulte d'âge moyen. Elles peuvent également diminuer la neurodégénération et le risque d'altérations cognitives chez l'individu âgé (Karr et al., 2011). Cependant, les études menées chez l'Homme sain ont rapporté des résultats mitigés, montrant soit un effet positif du DHA sur les performances cognitives (Fontani et al., 2005; Jackson et al., 2012; McNamara et al., 2010; Stonehouse et al., 2013), soit pas d'effet (Karr et al., 2012; Kennedy et al., 2009; Stough et al., 2012). Ces différences sont attribuées à la dose journalière utilisée, la durée de l'intervention, la source d'AGPI n-3 (principalement EPA ou principalement DHA), l'historique de l'alimentation en AGPI n-3 de la population étudiée et les fonctions cognitives testées. Chez l'enfant, de faibles taux d'AGPI n-3 ont été associés à de plus grands risques de développer des déficits cognitifs, des troubles de l'attention ou des troubles autistiques (Antalis et al., 2006; Vancassel et al., 2001). Certaines études *post-mortem* ont montré que les taux de DHA étaient diminués dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Chez l'animal, peu d'études montrent un réel effet bénéfique des AGPI n-3 sur la cognition, excepté dans des conditions de déficience en AGPI n-3. Une supplémentation nutritionnelle



de 2 mois en AGPI n-3 chez la souris âgée augmente la proportion de ces derniers dans le cerveau et restaure les déficits de mémoire spatiale en piscine de Morris. Ces résultats sont associés à une amélioration de la sur-activation de c-Fos, un marqueur d'activité neuronale, dans l'hippocampe (Labrousse et al., 2012). De façon intéressante, d'autres études également réalisées au laboratoire montrent que les effets bénéfiques des AGPI n-3 impliquent une modulation de la réponse inflammatoire (De Smedt-Peyrusse et al., 2008; Madore et al., 2014; Vauzour et al., 2015). Le LPS altère différemment le phénotype microglial et l'expression hippocampique des cytokines pro-inflammatoires chez des souris Fat-1, capables de convertir les AGPI n-6 en AGPI n-3, que chez des souris témoins. Ceci est associé à des performances mnésiques normales après injection de LPS, alors que celui-ci altère la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez les souris témoins (Delpech et al., 2015a). De plus, une autre étude montre que le LPS diminue la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe et altère la dépression à long terme (DLT), mais pas la PLT, seulement chez les souris déficientes en AGPI n-3. De plus, le LPS induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires seulement dans l'hippocampe des souris sous régime équilibré (Delpech et al., 2015b).

Les AGPI n-3 ont aussi été décrits comme étant capables de moduler les réponses émotionnelles (Bazinet and Laye, 2014). Par exemple, des sujets souffrant de symptômes dépressifs ou de troubles anxieux ont des taux plasmatiques d'AGPI n-3 diminués et/ou des taux d'AGPI n-6 augmentés en comparaison à des sujets sains (Lin et al., 2010). De plus, des études *post-mortem* montrent que des patients dépressifs qui se sont suicidés ont des niveaux de DHA cérébral plus faibles que des individus témoins du même âge (McNamara et al., 2007). Chez des patients atteints d'une hépatite C et traités avec de l'IFN, de faibles taux sanguins de DHA sont associés à un risque plus élevé de développer une dépression en réponse au traitement (Su et al., 2010). En accord avec ces données, des études épidémiologiques ont montré qu'un faible apport nutritionnel en AGPI n-3 était associé à un risque plus élevé de développer des troubles de l'humeur (Appleton et al., 2010). A l'inverse, une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 améliore les symptômes dépressifs, en particulier lorsque ceux-ci sont sévères (Appleton et al., 2010; Bozzatello et al., 2016; Grosso et al., 2016; Lin et al., 2010; Moranis et al., 2012). Une étude réalisée chez des étudiants sains en période de stress (quelques jours avant un examen) montre qu'une supplémentation en AGPI n-3 peut diminuer les symptômes d'anxiété, même si ceux-ci ne sont pas associés à un diagnostic de troubles anxieux (Kiecolt-Glaser et al., 2011). L'effet des AGPI n-3 dans les troubles de l'humeur a aussi été évalué chez l'animal. Ainsi, une déficience en AGPI n-3 sur

le long terme induit des comportements de type anxieux chez le rongeur (Lafourcade et al., 2011). Cette déficience est également associée à une augmentation de la réponse de l'axe corticotrope à un stress en comparaison à des animaux nourris avec un régime témoin (Levant et al., 2008). Chez la souris, une supplémentation en AGPI n-3 empêche les comportements de type anxieux et l'augmentation des niveaux de corticostérone plasmatique induits par un stress de défaite sociale (Larrieu et al., 2014). Bien que l'effet des AGPI n-3 sur les troubles de l'humeur associés à l'obésité n'ait été encore que peu exploré, une étude récente réalisée chez des sujets en obésité morbide montre que des symptômes dépressifs sont négativement liés à la quantité d'ALA dans le plasma (Chalut-Carpentier et al., 2015). D'après les données décrites ci-dessus, il serait donc possible que les AGPI n-3 protègent des altérations émotionnelles et cognitives associées à l'obésité grâce à des mécanismes incluant une modulation de l'activité de l'axe corticotrope ou de la neuroinflammation, deux systèmes biologiques altérés chez les sujets obèses.

### **B. Les antioxydants**

Parmi les altérations biologiques participant au développement et à la progression de l'obésité et des troubles qui lui sont associées, le rôle du stress oxydant a été mis en évidence (Maritim et al., 2003). Le stress oxydant est défini comme une dérégulation de la balance entre la production de radicaux libres (ou espèces réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote) et les capacités antioxydantes de l'organisme (Betteridge, 2000). Dans un organisme sain, la production de radicaux libres est normale et ne constitue pas une situation de stress oxydant puisqu'il existe des systèmes permettant de les supprimer. Par exemple, des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase participent aux défenses antioxydantes de l'organisme. Cependant, certaines pathologies comme l'obésité sont caractérisées par un stress oxydant élevé, mesuré par une augmentation de la production de radicaux libres ou par une diminution de l'activité de ces enzymes (Salmon, 2016). Le stress oxydant induit des dommages cellulaires, notamment au niveau de l'ADN, des protéines ou des lipides. Les AGPI sont notamment une cible des radicaux libres et leur oxydation peut induire des dommages tissulaires (Vigor et al., 2014). Le stress oxydant peut également induire la mort cellulaire par apoptose. Ces dommages peuvent contribuer au développement de maladies telles que les cancers, des maladies cardiovasculaires ou certaines maladies neurodégénératives.

### 1. Généralités sur les antioxydants

L'apport d'antioxydants exogènes, apportés notamment par l'alimentation, suscite un grand intérêt dans le domaine de la santé. Par définition, un composé antioxydant doit être capable de retarder et/ou d'inhiber significativement l'oxydation du substrat (par exemple des lipides) par les radicaux libres, et cela à de faibles concentrations (Halliwell and Gutteridge, 1990). Lorsque le stress induit par les espèces radicales de l'oxygène est supérieur aux capacités antioxydantes de la cellule, celle-ci peut initier son processus d'apoptose, évitant ainsi une toxicité générale au niveau du tissu ou de l'organisme. L'apport d'antioxydants dans notre alimentation est susceptible d'améliorer le niveau des défenses antioxydantes et par conséquent de prévenir l'apparition des pathologies associées au stress oxydant. Les composés antioxydants naturels peuvent être issus de sources animales ou végétales. Chez les végétaux, il y a de nombreux composés ayant une activité antioxydante, et les sources sont très nombreuses et variées : plantes, fruits, légumes, céréales, graines... Les composés principaux provenant des végétaux sont les tocophérols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les composés phénoliques.

De façon intéressante, les composés antioxydants possèdent, au-delà de leur activité antioxydante, de puissantes propriétés anti-inflammatoires. Par exemple, la consommation de polyphénols est inversement associée à la concentration plasmatique de CRP dans la population générale adulte (Chun et al., 2008). En accord avec cette observation, de nombreuses interventions nutritionnelles montrent que les antioxydants fournis par l'alimentation sont capables de moduler la production de cytokines. En effet, la consommation de polyphénols extraits de myrtille pendant 3 semaines diminue la concentration plasmatique de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-13, IL-8 et IFN- $\alpha$ ) chez des individus sains adultes (Karlsen et al., 2007). On observe également que chez des patients en phase précoce de la maladie d'Alzheimer, la consommation d'un régime riche en polyphénols extraits de thé vert et de pomme pendant 8 mois diminue les niveaux sériques d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , qui sont plus élevés que chez les témoins (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2013). Chez des sujets obèses ou diabétiques de type 2, la consommation de curcumine ou de vitamines C et E (acide ascorbique et  $\alpha$ -tocophérol, respectivement) pendant 4 semaines diminue la concentration de cytokines inflammatoires circulantes comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Ganjali et al., 2014; Jamalan et al., 2015). Dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hypercalorique consommé pendant 15 semaines, l'ajout de cassis, riche en composés phénoliques, dans l'alimentation empêche le développement de

l'inflammation induite par l'obésité dans le tissu adipeux (Benn et al., 2014). Chez le rat âgé, la consommation d'un régime enrichi en vitamine E pendant 9 semaines permet également d'empêcher l'augmentation du stress oxydatif et de l'activité de l'axe corticotrope (Kobayashi et al., 2009). Enfin, dans un modèle murin de sclérose en plaques, une pathologie également caractérisée par une neuroinflammation, la consommation de coenzyme Q10 (CoQ10) pendant 3 semaines diminue l'inflammation, en réduisant notamment l'expression de TNF- $\alpha$  dans le cerveau (Soleimani et al., 2014). De façon intéressante, des études ont mis en évidence un lien entre la consommation d'antioxydants et l'amélioration des altérations métaboliques dans des modèles d'obésité. Ce lien semble impliquer une amélioration des altérations de la composition du microbiote intestinal dans ces modèles (Anhe et al., 2016; Anhe et al., 2015b). Par exemple, la consommation de régimes riches en polyphénols (contenant par exemple de la canneberge) augmente la proportion de la bactérie *Akkermansia* dans les intestins des souris obèses nourries avec un régime riche en lipides et sucres. Cette augmentation est associée à une amélioration des altérations métaboliques, de l'inflammation intestinale et du stress oxydatif associées à l'obésité (Anhe et al., 2015a).

### 2. Antioxydants et troubles neuropsychiatriques

Des études récentes suggèrent une association entre la consommation de fruits et légumes, riches en antioxydants, et l'amélioration des fonctions cognitives, ainsi que la diminution du risque de développer des maladies neurodégénératives liées à l'âge (Panickar and Jang, 2013; Rendeiro et al., 2015; Spagnuolo et al., 2016; Vauzour et al., 2015). En particulier, une consommation augmentée de polyphénols est positivement associée aux performances de mémoire épisodique chez l'adulte (Kesse-Guyot et al., 2012) et à une diminution du déclin cognitif chez le sujet âgé de 70 ans et plus (Devore et al., 2013). Au laboratoire, une étude réalisée sur des souris montre qu'une supplémentation en polyphénols extraits de raisin et de myrtille empêche les altérations de mémoire liées à l'âge dans le test de la piscine de Morris. De façon intéressante, cet effet protecteur est associé à la modulation de l'expression hippocampique de gènes impliqués dans la plasticité neuronale (Bensalem et al., 2016). Dans une autre étude réalisée sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, la consommation d'épigallocatechin-3-gallate, un puissant composé antioxydant, améliore l'apprentissage et la mémoire spatiale en réduisant la résistance à l'insuline dans l'hippocampe (Jia et al., 2013). Dans un modèle de dépression induite par le TNF- $\alpha$ , la vitamine E diminue les comportements de type dépressif (Manosso et al., 2013).

L'obésité étant associée à des altérations métaboliques, une augmentation de l'inflammation centrale et périphérique, un stress oxydant élevé et des altérations neuropsychiatriques, l'utilisation d'antioxydants semble donc être une stratégie thérapeutique non pharmacologique particulièrement prometteuse. En accord avec cette notion, une étude réalisée sur 30 sujets obèses décrit une amélioration des symptômes anxieux, mais pas des symptômes dépressifs, après la consommation de curcumine pendant 30 jours (Esmaily et al., 2015). Une étude préclinique sur des souris nourries avec un régime hyperlipidique montre qu'une supplémentation de 16 semaines avec de la lutéoline, un polyphénol de la famille des flavonoïdes, améliore la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe, diminue la neuroinflammation et le stress oxydant et rétablit l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe et le cortex de ces souris. Ces résultats sont associés à une amélioration des altérations métaboliques, dont la résistance à l'insuline, et de l'inflammation périphérique (Liu et al., 2014). Ainsi, les antioxydants pourraient, comme les AGPI n-3, améliorer les troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité en agissant sur des systèmes biologiques altérés chez les individus obèses, comme l'axe corticotrope et la neuroinflammation.

### C. Les prébiotiques

#### 1. Généralités sur les prébiotiques

Comme décrit précédemment, les changements de la composition du microbiote intestinal associés à l'obésité jouent un rôle majeur dans l'induction de l'inflammation périphérique et centrale à bas bruit. Les interventions nutritionnelles permettent de moduler la composition du microbiote intestinal. Ce type de stratégie semble améliorer les altérations métaboliques observées dans le syndrome métabolique, ainsi que certaines comorbidités associées (Erejuwa et al., 2014; Petra et al., 2015). Ces améliorations ont notamment été décrites dans des études utilisant des probiotiques (Delzenne et al., 2011). Les probiotiques sont définis par l'OMS comme des "micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte". Les prébiotiques, quant à eux, sont des carbohydrates non-digestibles qui stimulent la croissance et le métabolisme de micro-organismes entériques associés à des effets bénéfiques pour la santé. De façon similaire aux probiotiques, l'utilisation de prébiotiques stimule la croissance de bactéries commensales spécifiques. L'oligofructose (OFS), les galacto-oligosaccharides et le lactulose sont trois prébiotiques qui ont la capacité de modifier la composition du microbiote

intestinal, en augmentant les proportions de *Bifidobacteria* et de *Lactobacillus*, deux familles de bactéries ayant des effets bénéfiques sur la santé (Macfarlane et al., 2006). En particulier, l'OFS diminue le poids corporel, améliore l'homéostasie du glucose, le profil lipidique plasmatique et l'inflammation périphérique (Cani et al., 2007; Cani and Delzenne, 2007, 2009; Mallappa et al., 2012). Des données suggèrent que ces effets bénéfiques soient dus à la capacité des *Bifidobacteria* à réduire l'inflammation induite par endotoxémie (Kootte et al., 2012). Ces composés pourraient donc être particulièrement intéressants pour prévenir et/ou diminuer les altérations comportementales associées à l'obésité.

### 2. Prébiotiques et troubles neuropsychiatriques

L'impact de ces prébiotiques sur l'inflammation centrale associée à l'obésité ou à d'autres pathologies à composante inflammatoire est moins bien décrit. De manière générale, on sait que le microbiote intestinal est capable de moduler les fonctions cérébrales (Gareau, 2016; Moloney et al., 2014; Neufeld et al., 2011). Des interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau ont été décrites récemment mais les voies de communications (neurales, hormonales ou immunes) qui relient ces deux systèmes sont encore mal caractérisées (Cryan and Dinan, 2012; Moloney et al., 2014). Il semble que des altérations de la communication intestin-cerveau en conditions de stress, telles qu'un stress précoce, soient associées à des altérations de l'humeur et de la cognition (Cryan and Dinan, 2012; Savignac et al., 2015). La forte comorbidité entre des symptômes neuropsychiatriques induits par un stress, comme l'anxiété, et les troubles gastro-intestinaux, renforce l'existence de ce lien. Des approches expérimentales ont également montré que des souris dépourvues de microbiote développent des altérations de la réponse au stress et un comportement de type anxieux, qui peuvent être restaurés après recolonisation de l'intestin avec un microbiote normal (Collins et al., 2012). L'administration de prébiotiques ou de probiotiques permet de diminuer les comportements de type anxieux (Tarr et al., 2015), l'activité de l'axe corticotrope, ainsi que les altérations de plasticité synaptique et de neurogenèse induits par un stress (Ait-Belgnaoui et al., 2014). Bien que ces études mettent en évidence un rôle du microbiote dans la régulation du comportement, peu de données sont disponibles quant à son impact sur les altérations émotionnelles et cognitives associées à l'obésité. Il a récemment été décrit que la transplantation du microbiote intestinal provenant de souris obèse suite à la consommation d'un régime hypercalorique à une souris mince suffit pour induire une activation microgliale ainsi que des déficits cognitifs et des comportements de type anxieux, et ceci en l'absence d'obésité (Bruce-Keller et al., 2015). Ceci est en accord avec la notion selon laquelle les

altérations du microbiote dans l'obésité peuvent moduler les voies de communication de l'axe intestin-cerveau et conduire au développement de comorbidités neuropsychiatriques, associées à une neuroinflammation. Ainsi, l'utilisation de composés capables de moduler la composition du microbiote pourrait être un moyen d'améliorer les comorbidités neuropsychiatriques chez les patients obèses (Dinan and Cryan, 2012).

---

Comme nous l'avons décrit dans cette introduction, l'obésité est devenue une véritable pandémie au niveau mondial. Cette pathologie complexe aux causes multifactorielles est associée non seulement à un grand nombre de comorbidités (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires...), mais également à une prévalence élevée de troubles neuropsychiatriques dont la dépression, des troubles anxieux et des altérations cognitives. Ces altérations comportementales augmentent le risque de développer des comorbidités telles que des troubles cardiovasculaires et altèrent la qualité de vie, ainsi que la prise en charge des patients. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des altérations neuropsychiatriques chez les sujets obèses est un enjeu majeur de santé publique. Des données épidémiologiques, cliniques et expérimentales suggèrent que l'impact sur le cerveau, en particulier sur l'hippocampe, de l'inflammation à bas bruit qui accompagne l'obésité pourrait être impliqué dans le développement de ces troubles. Cependant, bien que de nombreuses associations entre neuroinflammation et altérations neuropsychiatriques aient été décrites, un lien causal reste à mettre en évidence dans le contexte de l'obésité. L'identification des mécanismes impliqués dans ces troubles est en effet cruciale puisque ces mécanismes pourraient être la cible de potentielles approches préventives et/ou thérapeutiques, notamment nutritionnelles.

## **OBJECTIFS**





La prévalence de l'obésité augmente de manière drastique dans le monde. Or, l'obésité est associée à un risque élevé de développer des altérations émotionnelles (dépression, troubles anxieux) et cognitives (dont des troubles mnésiques). La prise en charge de ces troubles comportementaux chez le sujet obèse est capitale puisque la mauvaise estime de soi et l'auto-négligence qu'ils entraînent sont associées à un mauvais suivi des traitements et à une diminution de la qualité de vie. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'association entre obésité et altérations comportementales est donc nécessaire afin d'améliorer la qualité de vie du patient et sa prise en charge.

Notre laboratoire a été un des premiers à mettre en évidence un lien entre ces troubles émotionnels et cognitifs associés à l'obésité et l'inflammation (Castanon et al 2014, 2015, Capuron et al 2016). En effet, l'obésité est associée à un état d'inflammation chronique dit à bas bruit caractérisé par une augmentation de la concentration de cytokines inflammatoires circulantes. Deux des facteurs majeurs dans le développement de cet état d'inflammation à bas bruit sont (1) l'augmentation de la proportion de tissu adipeux blanc et (2) des altérations du microbiote intestinal associées à une augmentation de la perméabilité intestinale permettant le passage d'endotoxines bactériennes dans la circulation (Cani et al., 2012). Dans un contexte plus général, il est clairement établi qu'une inflammation systémique provoque la mise en place d'une inflammation cérébrale, caractérisée par la production locale de cytokines inflammatoires (Dantzer 2001). Dans le cerveau, les cytokines sont capables de moduler des mécanismes neurobiologiques impliqués dans la régulation de l'humeur, dont le métabolisme et la fonction des neurotransmetteurs (les monoamines), l'activité neuroendocrinienne (dont celle de l'axe corticotrope), la plasticité neuronale et/ou les connections neuronales entre différentes structures cérébrales. Il est intéressant de noter que l'inflammation cérébrale associée à l'obésité est particulièrement marquée dans l'hypothalamus, siège du contrôle de l'homéostasie énergétique (Kalin et al., 2015), mais également dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur et de la cognition, telles que l'hippocampe (Dinel et al., 2011, 2014 ; Andre et al., 2014). Par exemple, des modèles animaux d'obésité tels que les souris *db/db* (déficiences pour le gène du récepteur de la leptine) présentent des altérations métaboliques associées à une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires dans l'hippocampe (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Cependant, bien que de nombreuses associations aient été décrites entre l'inflammation et les altérations neuropsychiatriques associées à l'obésité, les mécanismes sous-tendant cette association restent à déterminer.

L'objectif général des études réalisées dans ce travail de thèse a donc été de déterminer quels sont les mécanismes sous-tendant les troubles émotionnels et cognitifs associés à l'obésité, afin d'identifier de potentielles cibles permettant de développer de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques. Pour cela, nous avons dans un premier temps évalué si l'inflammation, en particulier au niveau de l'hippocampe, avait un lien causal dans la mise en place des altérations émotionnelles associées à l'obésité dans le modèle murin d'obésité *db/db* et quels étaient les intermédiaires impliqués dans cette relation. Les résultats ayant suggéré un rôle du TNF- $\alpha$  dans la mise en place de ces troubles comportementaux, nous avons ensuite testé directement son implication et évalué les mécanismes potentiellement impliqués (**objectif 1**). Dans un second temps, nous avons utilisé des approches nutritionnelles permettant de cibler de manière non spécifique différentes fonctions altérées chez ces souris et connues pour être potentiellement impliqués dans le développement des troubles de l'humeur et de la cognition (**objectif 2**). Ce deuxième objectif nous a permis non seulement d'évaluer l'effet de ce type d'approches sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité, mais d'étudier également les mécanismes potentiellement impliqués.

- **Objectif 1 :**

Etude du rôle de l'inflammation dans le développement de comportements de type anxieux associés à l'obésité chez la souris *db/db* et des mécanismes potentiellement impliqués dans cette relation.

- ✓ Objectif 1a : Etude du rôle causal de l'inflammation dans le développement des comportements de type anxieux associés à l'obésité.
- ✓ Objectif 1b : Etude du rôle du TNF- $\alpha$  dans le développement des comportements de type anxieux associés à l'obésité.

- **Objectif 2 :**

Etude des conséquences de la consommation de nutriments d'intérêt sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité chez la souris *db/db* et identification des mécanismes potentiellement impliqués.

- ✓ Objectif 2a : Etudes des conséquences d'un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité et sur leurs corrélats neurobiologiques.
- ✓ Objectif 2b : Etudes des conséquences d'une manipulation du microbiote intestinal par l'administration d'un prébiotique sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité et sur leurs corrélats neurobiologiques.



## **OBJECTIVES**



Nowadays, the prevalence of obesity is rapidly increasing worldwide. Importantly, obesity is associated with a high risk of developing mood disorders (depression and anxiety) and cognitive alterations (including memory deficits). The management of these behavioral alterations in obese patients is critical since poor self-esteem and self-neglect associated to these disorders are associated with poor treatment monitoring and decreased quality of life. Identifying the mechanisms underlying the relationship between obesity and neuropsychiatric disorders is therefore urgently needed.

Our laboratory is one of the first to highlight a relationship between obesity-associated neuropsychiatric alterations and inflammation (Castanon et al 2014, 2015, Capuron et al 2016). Indeed, obesity is associated with chronic low-grade inflammation characterized by increased levels of circulating inflammatory cytokines. Two major mechanisms involved in the development of this low-grade inflammation are (1) an increased white adipose tissue mass and (2) gut microbiota dysregulations associated to an increased gut permeability which facilitates the translocation of gut bacterial endotoxins in the blood (Cani et al., 2012). In a more general context, it has been described that systemic inflammation induces neuroinflammation, which is characterized by central production of inflammatory cytokines (Dantzer 2001). Within the brain, cytokines can influence neurobiological systems involved in the regulation of mood, including neurotransmitters (monoamines) metabolism and function, neuroendocrine activity (e.g. HPA axis), neuronal plasticity and/or connectivity between brain areas. Interestingly, the neuroinflammation associated with obesity has been particularly reported in the hypothalamus, a key structure in the regulation of energetic homeostasis (Kalin et al., 2015), but also in brain areas involved in the regulation of mood and cognition such as the hippocampus (Dinel et al., 2011, 2014 ; Andre et al., 2014). For instance, rodent models of obesity such as the *db/db* mice (in which leptin receptor is inactivated) display metabolic alterations associated with increased expression of pro-inflammatory cytokines within the hippocampus (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ). However, although several studies report an association between inflammation and obesity-related neuropsychiatric alterations, the biological mechanisms underlying this association still need to be clearly identified.

The aim of this thesis was hence to determine what are the mechanisms underlying the emotional and cognitive alterations associated with obesity, in order to identify potential targets allowing the development of new preventive and/or therapeutic strategies. To answer this question, we have first assessed the potential role of inflammation, especially in the



hippocampus, in the development of emotional alterations associated with obesity in the *db/db* mice and what were the potential mediators underlying these relationships. Since the first results obtained suggested a role for TNF- $\alpha$  in inducing these emotional alterations, we have then tested this hypothesis and tried to identify the mechanisms potentially involved (**objective 1**). Secondly, we have used dietary interventions to non-specifically target different mechanisms known to be altered in *db/db* mice and potentially involved in the development of their neuropsychiatric alterations (**objective 2**). In this second part of the project, we not only measured the impact of such strategies on metabolic and behavioral alterations associated with obesity, but we also evaluated what were the mechanisms potentially involved.

▪ **Objective 1:**

Assessing the role of inflammation in the development of anxiety-like behaviors associated with obesity in the *db/db* mice and identifying the mechanisms potentially involved,

- ✓ Objective 1a: measuring if inflammation plays a causal role in anxiety-like behaviors associated with obesity
- ✓ Objective 1b: Assessing the role of hippocampal TNF- $\alpha$  in anxiety-like behavior associated with obesity

▪ **Objective 2:**

Assessing the impact of nutrient supplementation on metabolic and behavioral alterations associated with obesity in *db/db* mice and identifying the potential underlying mechanisms

- ✓ Objective 2a: Assessing the impact of a n-3 PUFAs/antioxidants enriched diet on metabolic and behavioral alterations associated with obesity and on their neurobiological correlates.
- ✓ Objective 2b: Assessing the impact of gut microbiota manipulation through prebiotic administration on metabolic and behavioral alterations associated with obesity and on their neurobiological correlates.

# **DEMARCHE EXPERIMENTALE**



## **I- Choix du modèle utilisé**

Afin de répondre aux différents objectifs décrits précédemment, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin d'obésité *db/db*. Ce paragraphe vise à expliquer le choix de ce modèle animal, en le comparant à d'autres modèles d'obésité, en particulier à des modèles d'obésité induite par le régime.

### **A. Modèles d'obésité induite par le régime**

Chez l'Homme, l'obésité est majoritairement la conséquence d'une dérégulation de la balance énergétique, induite notamment par la surconsommation d'aliments hypercaloriques. Ainsi, les modèles animaux d'obésité induite par un régime hypercalorique sont largement utilisés afin de se placer dans une situation comparable à celle observée chez l'Homme. En 1949, le premier modèle d'obésité induite par le régime a été développé chez le rat grâce à un régime palatable semi-liquide *ad libitum*. Puis, en 1953, Fenton et Dowling ont utilisé un régime dans lequel les lipides constituaient 50% de l'apport énergétique afin d'induire une obésité chez la souris. Aujourd'hui, de nombreux modèles d'obésité induite par le régime existent. S'ils reposent tous sur un excès de calories apportées par l'alimentation, ils varient en revanche quant à la quantité et la provenance de ces calories. D'une manière générale, les modèles animaux d'obésité induite par un régime hypercalorique développent une résistance à la leptine (Morrison, 2008). Cette leptino-résistance observée dans les modèles animaux d'obésité induite par un régime hypercalorique et/ou hyperlipidique peut être comparée à celle observée chez le sujet obèse, rendant ces modèles proches de la plupart des situations d'obésité rencontrées chez l'Homme.

Les modèles d'obésité induite par le régime possèdent néanmoins de nombreuses limitations. En effet, la variabilité du contenu des régimes (ex : source et teneur en lipides) peut être à l'origine de nombreuses différences entre les phénotypes observés. De plus, le choix des lignées animales utilisées explique également la variabilité des résultats rapportés dans ces études. En effet, alors que certaines lignées, comme les souris C57BL/6J sont susceptibles à une prise de poids induite par la consommation d'un régime hypercalorique et/ou hyperlipidique, d'autres lignées comme les souris A/J y sont résistantes (Nilsson et al 2012). Une autre limitation de ce type de régime concerne l'étiologie de l'obésité chez l'Homme. La vulnérabilité à devenir obèse ne dépend pas de la capacité à prendre du poids en consommant un régime hypercalorique de façon forcée, mais varie en fonction des différences

interindividuelles quant à la propension à choisir une alimentation hypercalorique ou un régime équilibré (Speakman 2007).

### **B. Modèles monogéniques d'obésité**

Parmi les différents modèles génétiques d'obésité tels que la souris mutée sur le gène MC4R (codant pour un récepteur de la mélanocortine), les modèles affectant la leptine sont ceux dont l'utilisation est la plus courante. En effet, les animaux dont la voie de signalisation de la leptine est altérée, en particulier dans l'hypothalamus, développent un phénotype d'obésité sévère. Ces modèles incluent les animaux chez qui la leptine n'est pas produite ou ne peut plus agir sur son récepteur. Les mutations observées dans ces modèles peuvent être dues à des modifications génétiques, notamment au niveau des protéines impliquées dans la signalisation en aval du récepteur de la leptine ou être spontanées (cas des modèles *ob/ob* et *db/db* décrits ci-dessous).

#### **1. Mutation spontanée *ob/ob***

Le phénotype *ob/ob* a été découvert par hasard en 1949 dans les laboratoires Jackson, chez des souris ayant un fond génétique C57BL/6J. Ce phénotype est dû à une mutation spontanée du gène « *obese* » (*ob*). A la naissance, les souris mutées *ob/ob* ont un phénotype similaire à celui des souris non mutées, mais elles prennent ensuite du poids rapidement et leur poids à l'âge adulte peut atteindre jusqu'à trois fois celui des souris contrôles. Le gène muté n'a pas été identifié pendant environ 50 ans, jusqu'en 1994, lorsque les travaux de Zhang ont identifié le gène de la leptine comme étant responsable de ce phénotype. Les souris *ob/ob* présentent donc un déficit de production de leptine, qui comme nous l'avons vu, joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, ces souris qui sont caractérisées par une prise alimentaire non régulée et donc particulièrement augmentée, développent une obésité associée à une insulino-résistance et à une hyperinsulinémie. Le traitement de ces souris avec de la leptine permet de normaliser leur phénotype (Lindstrom, 2010). Cependant, la majorité des cas d'obésité chez l'Homme se traduit plutôt par une hyper-sécrétion de leptine et/ou une résistance à la leptine, et non par une absence de leptine.

#### **2. Mutation spontanée *db/db***

Le phénotype obèse *db/db* a été identifié chez la souris en 1966 au sein des laboratoires Jackson. Ce phénotype est dû à une mutation du gène codant pour le récepteur de la leptine, qui induit un défaut de signalisation de cette protéine. Ce défaut de signalisation de la leptine, notamment dans l'hypothalamus, entraîne une hyperphagie permanente et ainsi une

obésité sévère associée à une hyperleptinémie, une hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une résistance à l'insuline. De par la mutation de leurs récepteurs à la leptine, ces souris sont résistantes aux traitements par la leptine, et sont donc un modèle plus proche de l'obésité et du DT2 chez l'Homme.

Le modèle *db/db* est un modèle approprié pour étudier l'étiologie des troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité. En effet, les troubles métaboliques qui caractérisent ces souris sont accompagnés de comportements de type anxieux (Dinel et al. 2011) et d'altérations de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe dans les tests du labyrinthe en Y et de la piscine de Morris (Stranahan et al., 2008 ; Dinel et al. 2011 ; Erion et al., 2014). Ces altérations comportementales s'accompagnent d'une inflammation chronique à bas bruit, à la fois périphérique et centrale (Dinel et al., 2011, 2014), caractérisée par des concentrations élevées de cytokines inflammatoires dans le plasma et par l'expression exacerbée de ces cytokines dans l'hippocampe, structure clé dans la régulation du comportement, en comparaison à leurs contrôles, les souris *db/+*. Cette inflammation est associée à une augmentation de la corticostérone plasmatique, suggérant des dysfonctionnements de l'axe corticotrope dans ce modèle (Dinel et al., 2011). De plus, les déficits mnésiques de ces souris sont diminués lorsque les taux plasmatiques de corticostérone sont maintenus à un niveau physiologique. Les altérations comportementales observées chez les souris *db/db* sont également associées à des altérations de la plasticité neuronale. La production de protéines impliquées dans la plasticité (BNDF, psd95, synaptophysin et synpatophilin) est en effet diminuée dans l'hippocampe des souris *db/db* en comparaison à des souris *db/+* ou à des souris C57BL/6J. Enfin, des processus impliqués dans la plasticité neuronale comme la neurogenèse et la PLT sont altérés chez les souris *db/db* (Stranahan et al., 2008; Erion et al, 2014).

Ainsi, les souris *db/db* sont un modèle particulièrement utile pour étudier les mécanismes impliqués dans la mise en place des troubles de l'humeur et de la cognition associés à l'obésité.

## II- Choix des tests comportementaux

### A. Evaluation de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe

#### 1. Labyrinthe aquatique de Morris (ou de la Piscine de Morris)

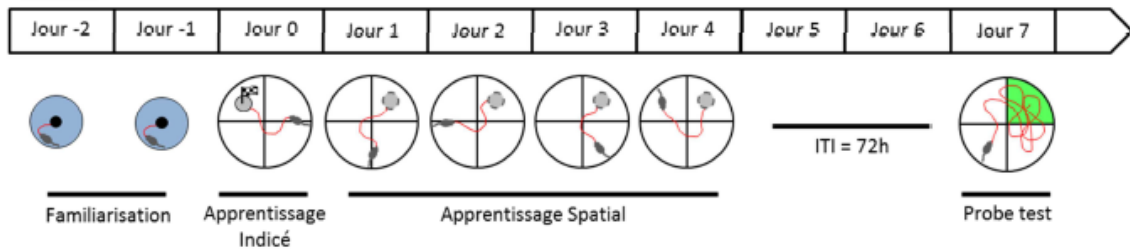
L'épreuve du labyrinthe aquatique mise au point par Morris (Morris, 1984), permet de mesurer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez l'animal. L'implication de l'hippocampe dans ce test de mémoire spatiale a été montrée par des études lésionnelles (de Hoz et al., 2005), des études pharmacologiques (Micheau et al., 2004), de transgénèse (Cho et al., 1998), d'électrophysiologie (Moser et al., 1998) ou bien encore à l'aide de marqueurs d'activité cellulaire (Teixeira et al., 2006). Un des avantages de ce test est qu'il permet d'évaluer à la fois l'apprentissage et la mémoire, deux processus cognitifs faisant appel à des mécanismes distincts. De plus, ce test permet d'évaluer la mémoire à long terme (72 h après la fin de l'apprentissage) et complète ainsi d'autres tests comme celui du labyrinthe en Y qui permettent de mesurer la mémoire à court terme. Dans notre protocole expérimental, cette épreuve mettait plus particulièrement en jeu la mémoire spatiale de référence dépendante de la formation hippocampique. En effet, la tâche comportementale consistait pour l'animal à localiser un "but" spatial fixe, représenté ici par une plateforme immergée dont la localisation reste constante, en utilisant des indices spatiaux distaux. Le protocole choisi se déroule en 4 étapes (Fig. 19):

**1-la familiarisation** : qui permet aux souris de se familiariser à la nage et au fait de monter sur une plateforme.

**2-l'apprentissage indicé** : permet d'évaluer la présence de déficits moteurs ou visuels et accentue la familiarisation. Les animaux doivent trouver une plateforme immergée indiquée par un indice.

**3-l'apprentissage spatial** de référence : les animaux doivent trouver une plateforme immergée et non visible en utilisant les indices visuels distaux.

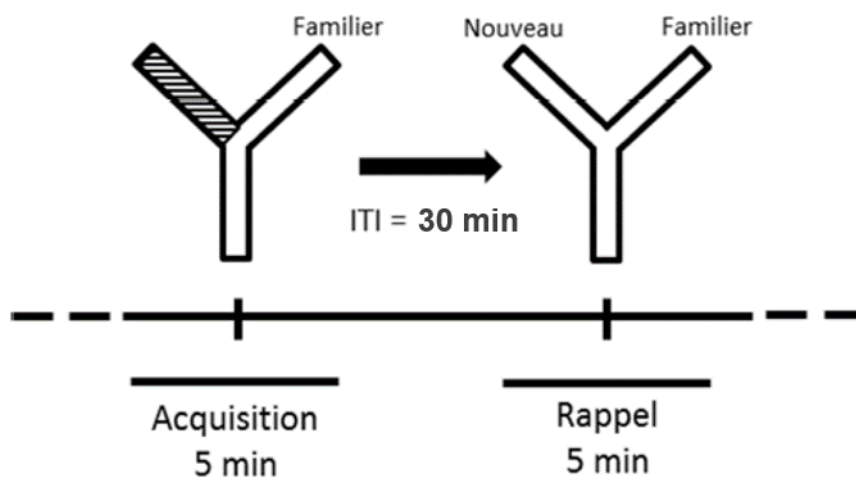
**4-le probe test** : permet d'évaluer la mémoire spatiale. Les souris cherchent pendant 1 min dans la piscine sans plateforme.



**Figure 19 : Etapes du protocole utilisé dans le test de la piscine de Morris (Bensalem et al., 2016)**

## 2. Labyrinthe en Y

Le test du labyrinthe en Y permet de tester la mémoire à court terme dépendante de l'hippocampe. Le principe de ce test est basé sur la curiosité des rongeurs pour l'exploration et sur leur capacité à discerner un environnement qu'ils ont déjà exploré (familier), d'un environnement qu'ils n'ont encore jamais découvert (nouveau). Ce test présente divers avantages dont celui de pas nécessiter d'apprentissage de la part des animaux, et celui de ne pas exposer les souris à des conditions trop stressantes. Il s'agit dans ce test de laisser les animaux explorer librement un environnement restreint (2 bras sur 3 possibles = phase d'acquisition) dans un labyrinthe en forme de Y, puis, après un certain délai, de les replacer dans ce même environnement avec cette fois-ci la possibilité d'explorer la totalité du dispositif (3 bras sur 3 possibles = phase de rappel) (Fig. 20). Il a été montré que lorsque le délai entre les 2 expositions est suffisamment important, la capacité de l'animal à dissocier le bras familier du bras nouveau s'apparente à de la mémoire spatiale de travail (Conrad et al., 1996 ; Paul et al., 2009).



**Figure 20 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y**



## **B. Evaluation des comportements de type anxieux**

Etant donné l'hétérogénéité et la complexité des symptômes de l'anxiété chez l'Homme, les tests utilisés chez les rongeurs ne permettent pas de modéliser la pathologie dans son ensemble mais plutôt des symptômes de façon individuelle. L'état d'anxiété étant une réponse normale et adaptative face aux dangers, les tests développés chez l'animal sont basés sur l'hypothèse que l'anxiété normale et l'anxiété pathologique impliquent les mêmes systèmes neurobiologiques. Les tests comportementaux sont ainsi basés sur les comportements naturels des rongeurs et sont donc pertinents d'un point de vue éthologique (Cryan and Holmes, 2005). Les tests les plus couramment utilisés sont ceux basés sur le conflit entre la tendance à approcher un environnement nouveau et celle à éviter une zone potentiellement dangereuse. L'ensemble des tests utilisés au cours de cette thèse ont une valeur prédictive, c'est-à-dire que les comportements d'évitement dans ces tests sont réduits par l'administration d'anxiolytiques efficaces chez l'Homme.

### **1. Test de champ ouvert (ou Open Field)**

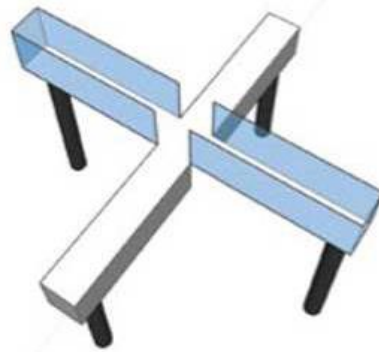
Le test de champ ouvert ou test de l'Open Field est un test très couramment utilisé pour mesurer les comportements de type anxieux chez l'animal (Prut and Belzung 2003). L'avantage de ce test est qu'il permet d'évaluer simultanément l'habituation à un environnement nouveau, l'activité locomotrice des rongeurs et les comportements de type anxieux (Bailey and Crawley, 2009). Dans ce test, la souris est placée dans une arène carrée, fortement éclairée au centre, dont elle ne peut s'échapper grâce à la présence de parois autour de l'arène (Fig. 21). Les rongeurs préfèrent spontanément la périphérie (comportement de thigmotaxie) à la partie centrale de l'open field qui est considérée comme anxiogène. On considère qu'une diminution du temps passé au centre de l'arène reflète un comportement de type anxieux. Ce test est couramment utilisé pour tester les effets anxiolytiques de composés pharmaceutiques, mais également pour tester leur effet stimulant puisqu'il permet aussi d'évaluer la locomotion des souris.



**Figure 21 : Test de champ ouvert (ou Open Field) (source : ncn.go.jp)**

2. Test du labyrinthe en croix surélevé (ou Elevated Plus Maze)

Les comportements de type anxieux des animaux ont également été évalués dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Ce test est basé sur le conflit approche/évitement puisque les souris cherchent naturellement à explorer les environnements nouveaux mais ont tendance à éviter les espaces ouverts et lumineux (Bailey and Crawley, 2009). Le labyrinthe est composé de 4 bras surélevés : 2 bras opposés sont fermés par des parois et sombres, les 2 autres sont ouverts et éclairés. En comparaison au test de champ ouvert, ce test induit un stress pour l'animal puisque les bras du labyrinthe sont situés à 120 cm du sol. Il peut donc permettre de mettre en évidence des comportements de type anxieux qui n'auraient pas été détectables dans le test de champ ouvert. Des animaux présentant des comportements de type anxieux évitent spontanément les bras ouverts, naturellement anxiogènes, et préfèrent les bras fermés (Fig. 22). En effet, il a été montré que des traitements pharmacologiques par des anxiolytiques étaient efficaces pour contrecarrer l'aversion naturelle engendrée par les bras ouverts.



**Figure 22 : Schéma du labyrinthe en croix surélevé (source : biotechniques.com)**

3. Test de la boîte claire/obscur (ou Light/Dark Box)

Le test de la boîte claire/obscur ou test de la Light/Dark Box est le troisième test que nous avons utilisé pour évaluer les comportements de type anxieux. Comme le test du labyrinthe en croix surélevée, ce test est basé sur le conflit entre l'aversion innée des rongeurs pour les espaces fortement éclairés et l'exploration spontanée des environnements nouveaux. Le dispositif est constitué d'un compartiment sécurisant, petit (environ 1/3 de l'ensemble) et sombre, et d'un compartiment fortement éclairé, grand et ouvert, considéré comme anxiogène (Fig. 23). Ce test peut être utilisé pour évaluer les effets anxiolytiques ou anxiogènes de composés pharmacologiques. Une diminution du temps passé dans le compartiment clair ou du nombre de transitions entre les deux compartiments est utilisé comme index d'anxiété.

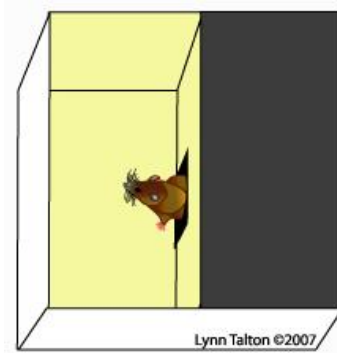


Figure 23 : Schéma de la boîte claire/obscur (source : btc.psych.ucla.edu)

### **III- Choix des stratégies anti-inflammatoires**

Afin de répondre à l'objectif 1 qui vise à étudier le rôle de l'inflammation dans le développement de comportements de type anxieux associés à l'obésité chez la souris *db/db*, nous avons utilisé plusieurs approches permettant de diminuer l'inflammation chez ces souris.

#### **A. Restriction alimentaire**

Des études ont décrit que des expériences de restriction alimentaire permettaient de diminuer le poids corporel et les altérations métaboliques associées (Kim et al., 2016 ; Wong et al., 2012 ; Martínez-Ramírez et al., 2016) mais également de réduire l'inflammation, à la périphérie et dans le cerveau. En effet, une étude a montré que des souris nourries pendant 9 mois avec 90 % de la quantité de nourriture consommée par les souris témoins présentaient des modifications de l'expression de certains gènes. En effet, l'expression de 56 gènes associés à l'inflammation était diminuée dans le tissu adipeux épidydimal de ces souris (Higami et al., 2006). Une réduction de l'apport alimentaire de 40 % diminue également la production de molécules inflammatoires dans le rein (Kim et al., 2006). Une restriction alimentaire pendant 28 jours empêche l'activation des cellules microgliales qui est classiquement observée sur des coupes d'hypothalamus de souris suite à l'administration de LPS (Radler et al., 2015). De façon intéressante, ce type d'approche a également montré des effets bénéfiques sur l'humeur et la cognition (Kim et al., 2015, Redman et al., 2011). Dans notre première étude, nous avons donc utilisé cette approche afin de diminuer d'une part le poids et les altérations métaboliques associées mais également de réduire l'inflammation de manière non spécifique. Les souris *db/db* soumises à la restriction alimentaire ont été nourries chaque jour avec la quantité moyenne de nourriture consommée par les souris *db/+*, soit une

restriction alimentaire d'environ 30 %. Le même taux de restriction a été appliqué pour les souris *db/+*.

### **B. Administration d'ibuprofène**

Afin de cibler plus spécifiquement l'inflammation, nous avons également utilisé une approche basée sur l'administration d'un anti-inflammatoire, l'ibuprofène. Des effets bénéfiques de l'administration d'agents anti-inflammatoires comme l'aspirine et l'ibuprofène sur les symptômes neuropsychiatriques ont déjà été décrits dans des contextes de pathologies inflammatoires comme certains cancers (Norden et al, 2015), la maladie d'Alzheimer (Llorens-Martin et al, 2014) et la maladie de Parkinson (Zaminelli et al., 2014). Nous avons donc choisi d'utiliser cette approche car elle permet de cibler spécifiquement l'inflammation et donc de s'affranchir d'un potentiel effet de la perte de poids sur les altérations comportementales comme cela peut être le cas avec l'approche de restriction alimentaire. Comme décrit précédemment (Ghosal et al 2010; Lim et al 2001; Llorens-Martin et al 2015), l'ibuprofène a été intégré dans les croquettes (régime standard) à une concentration finale de 375 ppm. Les souris ont été nourries avec ce régime pendant 7 semaines alors que les souris contrôles étaient nourries avec un régime standard isocalorique.

### **C. Inhibition du TNF- $\alpha$ cérébral par l'Etanercept**

Afin d'inhiber spécifiquement le TNF- $\alpha$  dans le cerveau, nous avons utilisé une approche permettant d'inhiber l'activité de cette cytokine par l'administration d'etanercept (récepteur leurre du TNF- $\alpha$ ). En effet, l'inhibition du TNF- $\alpha$  par l'etanercept a déjà montré des effets positifs sur les troubles de l'humeur dans des pathologies à composante inflammatoire comme le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde (Kekow 2011, Fleming 2015, Tying 2006). L'etanercept ne passant pas la BHE (McGeer et al., 2009), son administration périphérique n'aurait pas permis de cibler la neuroinflammation chez les souris *db/db*. Nous avons donc choisi d'injecter celui-ci par voie icv. L'administration chronique de l'etanercept a été réalisée par diffusion continue pendant 28 jours grâce à une mini-pompe osmotique implantée sous la peau des souris au niveau du dos. Le mode d'administration et la dose (0,11  $\mu$ l/h) ont été choisis sur la base d'une étude précédente (Guggilam et al., 2011).

## **IV- Choix des régimes**

Afin de répondre à l'objectif 2 qui vise à étudier les conséquences de la consommation de nutriments d'intérêt sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité et à identifier les mécanismes potentiellement impliqués, nous avons choisi dans un premier temps de nourrir les souris avec un régime contenant des AGPI n-3 et des antioxydants. Dans un second temps, nous avons utilisé des prébiotiques afin de modifier la composition du microbiote intestinal et d'étudier l'impact de cette modification sur les altérations métaboliques et comportementales des souris *db/db*.

### **A. AGPI n-3 et antioxydants**

Comme décrit dans l'introduction, les AGPI n-3 et les antioxydants peuvent agir de manière non spécifique sur les altérations biologiques et comportementales associées à l'obésité. En particulier, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui pourraient contribuer à l'amélioration des troubles neuropsychiatriques observés dans ce contexte. En effet, des études montrent que ces nutriments peuvent améliorer les émotions et/ou la cognition dans des contextes à composante inflammatoire comme le vieillissement (Labrousse et al., 2012 ; Bensalem et al., 2016), le stress chronique (Larrieu et al., 2014), la maladie d'Alzheimer (Jia et al., 2013) et la dépression (Manosso et al., 2013). De plus, les niveaux plasmatiques d'AGPI n-3 sont corrélés aux symptômes dépressifs chez les sujets obèses (Chalut-Carpentier et al., 2015). Une co-supplémentation d'AGPI n-3 sous forme d'ALA et d' $\alpha$ -tocophérol possède des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose ainsi que sur les concentrations de cholestérol et de triglycérides dans le plasma (Taghizadeh et al., 2016). Nous avons donc choisi d'administrer un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants pendant 13 semaines aux souris *db/+* et *db/db*. Les AGPI n-3 ont été apportés dans l'alimentation sous forme du précurseur ALA, qui possède des effets bénéfiques sur les altérations métaboliques (Oliveira et al., 2015) et inflammatoires (Egert et al., 2014) associées à l'obésité et sur les émotions et la cognition (Bourourou et al., 2016 ; Pan et al., 2015 ; Blondeau et al., 2015). Il est intéressant de noter que ces effets de l'ALA peuvent être sous-tendus par l'augmentation des taux d'EPA et de DHA en périphérie et dans le cerveau, mais qu'ils peuvent aussi en être en partie indépendants (Poudyal et al., 2013). Les antioxydants apportés dans le régime ( $\alpha$ -tocophérol, CoQ10 et canolol) ont été choisis sur la base de leurs effets bénéfiques sur le métabolisme (Geddawy et al., 2016 ; Khatami et al., 2016 ; Sohet et al., 2009 ; Kruse et al., 2015 ; Lin et al., 2013) et sur l'inflammation (Khatami et al., 2016 ; Chung et al., 2010 ;

Kruse et al., 2015) chez des modèles animaux d'obésité et chez des patients obèses. De plus, le CoQ10 et l' $\alpha$ -tocophérol améliorent la mémoire chez des animaux âgées lorsqu'ils sont administrés ensemble (McDonald et al., 2005) ou individuellement (Shetty et al., 2013, Ramis et al., 2016). Les souris contrôles étaient nourries avec un régime isocalorique dépourvu de ce cocktail d'antioxydants et contenant une proportion d'AGPI n-3 moindre en comparaison au régime enrichi.

### **B. Oligofructose**

Des études récentes suggèrent que des modulations de la composition du microbiote intestinal induites par des approches nutritionnelles pourrait avoir un effet thérapeutique sur les altérations métaboliques et/ou comportementales associées à l'obésité ((Erejuwa et al., 2014; Petra et al., 2015 ; Cani and Knauf, 2016; Cryan & Dinan, 2012; Moloney et al., 2013). En particulier, des prébiotiques tels que l'OFS pourrait améliorer l'homéostasie du glucose, le profil lipidique plasmatique (Mallappa et al., 2012) mais également l'inflammation périphérique (Cani et al., 2007; Cani et al., 2016). Dans notre troisième étude, nous avons donc choisi d'administrer de façon chronique de l'OFS dans l'eau de boisson des souris, à la concentration de 0.6 g/jour/souris sur la base d'une étude précédente qui montre que l'OFS améliore les altérations glycémiques des souris *db/db* (Everard et al., 2011). Les souris *db/+* et *db/db* contrôles consommaient quant à elles de l'eau du robinet.



## **RESULTATS**





**Chapitre 1**

**BRAIN TNF- $\alpha$  MEDIATES ANXIETY-LIKE BEHAVIOR IN A MOUSE  
MODEL OF OBESITY**

Célia Fourrier, Clémentine Bosch-Bouju, Raphaël Boursereau, Julie Sauvant, Agnès Aubert,  
Lucile Capuron, Guillaume Ferreira, Sophie Layé and Nathalie Castanon

*En préparation*



**Objectif :**

L'objectif de cette étude était d'établir le rôle de l'inflammation dans la mise en place des troubles de l'humeur associés à l'obésité chez la souris *db/db* et d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués. Dans ce but, des souris *db/+* et *db/db* ont tout d'abord été soumises à une restriction alimentaire, une approche connue pour ses effets anti-inflammatoires, en plus de ses effets bénéfiques sur la gestion du poids et des troubles métaboliques. De façon intéressante, la restriction alimentaire diminue les comportements de type anxieux, ainsi que les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'IL-6 et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  hippocampique. Ces différents facteurs représentaient donc autant de candidats potentiels reliant inflammation et anxiété. Afin d'évaluer si l'axe HPA était effectivement impliqué dans cette relation, nous avons ensuite mesuré les conséquences de l'inhibition des GR. L'administration chronique de mifepristone n'a pas amélioré les comportements de type anxieux chez les souris *db/db*, ce qui plaide contre un rôle majeur de l'axe HPA dans l'amélioration des comportements de type anxieux induite par la restriction alimentaire. Dans le but de cibler plus spécifiquement l'inflammation, de l'ibuprofène a ensuite été administré dans l'alimentation de façon chronique. L'ibuprofène diminuait les comportements de type anxieux des souris *db/db*, ainsi que l'expression génique du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe, suggérant que le TNF- $\alpha$  cérébral pourrait être impliqué dans la mise en place des comportements de type anxieux chez ces souris. Afin de tester cette hypothèse, de l'etanercept (récepteur leurre du TNF- $\alpha$ ) a été administré aux souris par voie icv de façon chronique. L'inhibition cérébrale du TNF- $\alpha$  a en effet permis de diminuer les comportements de type anxieux des souris *db/db*. Afin de comprendre les mécanismes potentiellement impliqués dans ces effets du TNF- $\alpha$ , la transmission synaptique glutamatergique a été évaluée sur des tranches d'hippocampe ventral incubées en présence d'etanercept. Ce traitement diminuait la fréquence, l'amplitude et le « *decay time* » des mEPSCs dans l'hippocampe ventral des souris *db/db*. Ces résultats mettent en évidence un rôle du TNF- $\alpha$  hippocampique dans la mise en place des comportements de type anxieux associés à l'obésité chez la souris *db/db*. Ce rôle du TNF- $\alpha$  semble impliquer une modulation de la transmission synaptique glutamatergique dans l'hippocampe ventral de ces souris. Cette étude suggère ainsi que le TNF- $\alpha$  pourrait être une cible de choix dans le développement de stratégies visant à diminuer les troubles de l'humeur chez les patients obèses.

**Objective:**

This study aimed to assess the role of inflammation in the development of mood alterations associated with obesity in *db/db* mice and to identify the potential underlying mechanisms. For this purpose, *db/+* and *db/db* mice have been submitted to a chronic food restriction procedure, as it is well-known not only to improve body weight and metabolic alterations, but also inflammation. Chronic food restriction decreased anxiety-like behaviors in *db/db* mice, along with plasma corticosterone and IL-6 levels and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the hippocampus of *db/db* mice. Each of these factors may therefore potentially contribute to the behavioral improvement induced by food restriction. To first assess the role of HPA axis, we inhibited GR activity through chronic mifepristone administration. This treatment did not improve anxiety-like behavior in *db/db* mice, suggesting that decreased corticosterone levels unlikely mediated behavioral improvement induced by food restriction. To target more specifically inflammation, we then chronically administrated ibuprofen into the food. Interestingly, this treatment decreased anxiety-like behavior in *db/db* mice, as well as hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression, suggesting that brain TNF- $\alpha$  could participate to the development of anxiety-like behaviors in *db/db* mice. To test this hypothesis, etanercept (TNF- $\alpha$  decoy receptor) was chronically icv administrated. TNF- $\alpha$  inhibition indeed decreased anxiety-like behavior in *db/db* mice. To start identifying the potential mechanisms underlying behavioral effect of TNF- $\alpha$ , the impact of its inhibition on glutamatergic synaptic transmission was measured in ventral hippocampus slices incubated with etanercept. Etanercept decreased mEPSCs frequency, amplitude and decay time in the ventral hippocampus of *db/db* mice. Altogether, these results highlight a role of TNF- $\alpha$  in the development of anxiety-like behavior associated with obesity in *db/db* mice and suggest that this may involve modulation of glutamatergic synaptic transmission in the ventral hippocampus. Hence, this study p TNF- $\alpha$  as a potential target in the development of strategies aiming at improving mood disorders in obese subjects.

**Brain TNF- $\alpha$  mediates anxiety-like behavior in a mouse model of obesity**

Célia Fourier<sup>1,2</sup>, Clémentine Bosch-Bouju<sup>1,2</sup>, Raphaël Boursereau<sup>1,2</sup>, , Julie Sauvant<sup>1,2</sup>, Agnès Aubert<sup>1,2</sup>, Lucile Capuron<sup>1,2</sup>, Guillaume Ferreira<sup>1,2</sup>, Sophie Layé<sup>1,2</sup>, Nathalie Castanon<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France

<sup>2</sup>Université de Bordeaux, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France

**Corresponding author:**

\* Nathalie Castanon

Nutrition et Neurobiologie Intégrée, INRA UMR 1286

Bâtiment UFR Pharmacie, 2<sup>o</sup> tranche, 2<sup>o</sup> étage, Case courrier 34,

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

E-mail : [nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr](mailto:nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr)

Phone: 33 557 574 505

Fax: 33 557 571 227

**Abstract**

The prevalence of mood disorders is continuously increasing worldwide, especially in medical conditions such as obesity and metabolic syndrome, which are associated with a high risk of developing neuropsychiatric symptoms. These symptoms aggravate obesity and promote the development of serious comorbidities such as cardiovascular diseases and type 2 diabetes. It is therefore crucial to identify the pathophysiological mechanisms underlying the development of mood disorders in the context of obesity, in order to reduce the risk of developing multiple disorders in chain. Based on converging evidence reporting chronic low-grade inflammation in both obesity and mood disorders, we hypothesized that inflammation may play a central role in the etiology of obesity-related mood alterations.

We tested this hypothesis in a genetic model of obesity, the *db/db* mice, which display increased anxiety-like behavior, along with increased peripheral and central inflammation, compared to their lean *db/+* littermates. We measured the behavioral (anxiety-like behavior) and neurobiological (brain cytokine expression) impact of complementary anti-inflammatory interventions, namely chronic food restriction and ibuprofen administration. Both interventions improved anxiety-like behavior in *db/db* mice, as assessed in the open-field and the elevated-plus maze, and concomitantly reduced hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression. In order to test if TNF- $\alpha$  may be a potential player in the development of obesity-related anxiety-like behavior, we then measured the consequences of chronically inhibiting brain TNF- $\alpha$  with the TNF- $\alpha$  decoy receptor etanercept. This inhibition indeed decreased anxiety-like behavior in *db/db* mice. Lastly, by directly assessing the consequences of TNF- $\alpha$  blockade on the hippocampal synaptic processes underlying this behavior, we showed that TNF- $\alpha$  inhibition improved glutamatergic synaptic transmission in the ventral hippocampus, an important area for mood regulation. These findings point to TNF- $\alpha$  as an important player in the onset of obesity-related anxiety, and may prove valuable for introducing novel approaches to treat neuropsychiatric complications associated with chronic inflammatory medical conditions.

**Keywords:** obesity; metabolic syndrome; *db/db* mice; hippocampus; ventral hippocampus; inflammation; TNF- $\alpha$ ; anxiety; synaptic transmission

## 1. INTRODUCTION

Mood disorders currently represent a major public health concern, as their prevalence is continuously growing worldwide and they relate to a substantial increased risk of morbidity and death (Ferrari, et al., 2013). The situation is further compounded by the concurrently increasing prevalence of other chronic medical conditions, such as obesity and metabolic syndrome, which are associated with a high risk of neuropsychiatric comorbidities, particularly depressive and anxiety disorders (Francis and Stevenson, 2013; Luppino, et al., 2010). Interestingly, mounting evidence actually suggests intricate bidirectional relationships between obesity and mood disorders, obesity being associated with a higher vulnerability for mood disorders, while the latter reciprocally relate to an increased risk of weight gain and obesity (Brunault, et al., 2012; Dawes, et al., 2016; Dixon, et al., 2003; Luppino, et al., 2010; Mazzeschi, et al., 2012). Importantly, both conditions not only mutually facilitate their co-

occurrence, but they also promote the development of additional complications, such as cardiovascular diseases and type 2 diabetes (Capuron, et al., 2016; Haslam and James, 2005). These coexisting complications suggest common pathophysiological mechanisms for obesity and mood disorders whose identification may help to reduce the risk of developing multiple disorders in chain.

Among the mechanisms likely to be involved, inflammation has recently drawn much attention, as it stands at the interface between metabolic, vascular and central nervous system (CNS) pathways, and plays a pivotal role in the etiology of disorders affecting these systems (Capuron, et al., 2016; Castanon, et al., 2014; Castanon, et al., 2015; Lasselin, et al., 2014). Indeed, systemic chronic low-grade inflammation originating from the adipose tissue and the gut microbiota increasingly appears as a key component of obesity (Canello and Clement, 2006; Cani, et al., 2009; Gregor and Hotamisligil, 2011; Lasselin, et al., 2014). Experimental research also reports inflammation within the brain, particularly in areas controlling behavior and mood such as the hippocampus (Boitard, et al., 2014; Diné, et al., 2011; Diné, et al., 2014; Erion, et al., 2014) and the cortex (Pistell, et al., 2010). Interestingly, a key role for dysregulated inflammatory processes and related alterations of brain functions in the induction of anxiety- and depression-related symptoms has been abundantly documented in different chronic inflammatory conditions (Capuron and Castanon, 2016; Capuron and Miller, 2011; Dantzer, et al., 2008). Treatment with anti-inflammatory drugs reduces emotional alterations in animal models of inflammatory diseases such as Alzheimer's disease (Llorens-Martin, et al., 2014), Parkinson's disease (Zaminelli, et al., 2014) or cancer (Norden, et al., 2015). Of note, mounting clinical and experimental findings point to tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  as an important cytokine in that context (Dean, et al., 2010; Himmerich, et al., 2008). Depressed patients indeed display increased circulating TNF- $\alpha$  levels (Dowlati, et al., 2010), whose reduction correlates with therapeutic improvement (Lanquillon, et al., 2000). TNF- $\alpha$  antagonism is effective in reducing depressive symptoms in antidepressant-resistant patients, particularly those with higher basal inflammation (Raison, et al., 2013). Inhibition of TNF- $\alpha$  also improves mood alterations in patients suffering from psoriasis or rheumatoid arthritis (Fleming, et al., 2015; Kekow, et al., 2011; Tying, et al., 2006). In rodents, induction of TNF- $\alpha$  production (Grippe, et al., 2005; O'Connor, et al., 2009) or direct systemic or intra-hippocampal TNF- $\alpha$  administration (Kaster, et al., 2012; Klaus, et al., 2016), promote the development of depression-like and anxiety-like behaviors, whereas blocking TNF- $\alpha$  with a



selective inhibitor such as etanercept counteracts this effect (Bayramgurler, et al., 2013; Haji, et al., 2012; O'Connor, et al., 2009).

Converging evidence suggests that obesity-related inflammation may similarly be relevant to the onset of neuropsychiatric comorbidities (for review see (Capuron, et al., 2016; Castanon, et al., 2014; Castanon, et al., 2015), although the underlying mechanisms still need to be clearly identified. Clinical findings show positive associations between peripheral inflammatory status and mood symptoms in subjects suffering from obesity or metabolic syndrome (Capuron, et al., 2008; Chirinos, et al., 2013; Dixon, et al., 2008; Ladwig, et al., 2003), inflammation even appearing as a major determinant of depressive symptoms in some studies (Capuron, et al., 2008; Daly, 2013). Conversely, reduction in inflammatory markers following surgery-induced weight loss (Cancello and Clement, 2006) correlates with significant improvement in the emotional status and depression scores of these patients (Capuron, et al., 2011; Emery, et al., 2007). Akin with clinical findings, caloric restriction in rodents also reduces inflammation (Higami, et al., 2006; Kim, et al., 2006) and related behavioral changes (MacDonald, et al., 2014), as well as hippocampal-dependent cognitive deficits reported in rodent models of obesity (Kim, et al., 2016). Interestingly, the occurrence of cognitive and emotional alterations in these models is associated with higher hippocampal expression of inflammatory cytokines (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Erion, et al., 2014; Kanoski and Davidson, 2011). Importantly, inhibiting hippocampal interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the *db/db* mice, a classical model of severe obesity, reduces their cognitive deficits by normalizing local synaptic dysfunction (Erion, et al., 2014). Of note, similar improvement is obtained after normalization of circulating corticosterone levels, which are particularly elevated in obesity (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Stranahan, et al., 2008), and tightly associated with hippocampal microglial activation (Dey, et al., 2014; Hryhorczuk, et al., 2013). These findings provide therefore valuable information on the mechanisms promoting obesity-related cognitive deficits which, together with mood alterations, contribute to compromise well-being and health in obese individuals. Despite their huge prevalence and impact, similar knowledge is however still missing regarding the mechanisms underlying obesity-related mood alterations. In particular, the relevance of some inflammatory markers shown to be important in other conditions, such as TNF- $\alpha$  (Dean, et al., 2010; Himmerich, et al., 2008), has not been investigated.

In the present study, we addressed these issues by measuring the consequences of different complementary anti-inflammatory strategies on the emotional alterations displayed by the *db/db* mice, which suffer from severe obesity and associated systemic metabolic and inflammatory alterations as a consequence of an inactivating mutation in the leptin receptor. These mice are particularly suitable for this study as they exhibit increased anxiety-like behavior, together with a marked inflammation in the hippocampus (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). Results presented here confirm the causal link between inflammation and increased anxiety. Importantly, they point to brain TNF- $\alpha$  as a crucial neurobiological substrate for the development of anxiety-like behavior in obesity. Finally, by directly assessing the consequences of TNF- $\alpha$  blockade on the hippocampal synaptic processes underlying this behavior, we provide new and valuable cues to further decipher the complex interactions between mood disorders and inflammation.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Animals**

Experiments were conducted in accordance with the European Community Council Directive (2010/63) and approved by local ethical committee (approval ID: 5012047-A). Five-week old male *db/db* (C57BLKS/J-*lepr<sup>db</sup>/lepr<sup>db</sup>*) and *db/+* (C57BLKS/J-*lepr<sup>db/+</sup>*) mice (Charles River Laboratories, France) were housed individually under a normal 12-h light:dark cycle with free access to food and water unless otherwise specified. Body weight, food intake and water consumption were measured once a week. Mice were individually handled once daily for 1 week before starting behavioral measurement to minimize stress reactions to manipulation.

### **2.2. Treatments and experimental procedures**

Independent groups of naïve mice (n=10/group) were treated with one of the different drugs listed below or exposed to chronic food restriction.

*Mifepristone*: Pellets (Innovative Research of America, FL, USA) designed to continuously release for 21 days the glucocorticoid receptor (GR) antagonist mifepristone (Sigma-Aldrich, MO, USA) or its inert carrier substance were implanted subcutaneously beneath the dorsal skin surface, as previously described (Larrieu, et al., 2016). Dose used (25

mg/kg/day) was chosen based on previous studies (Liu, et al., 2005; Wang, et al., 2011; Yang, et al., 2008).

*Ibuprofen*: As previously described (Ghosal, et al., 2010; Lim, et al., 2001; Llorens-Martin, et al., 2014), the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen (Sigma-Aldrich, MO, USA) was formulated into standard animal chow at a final concentration of 375 ppm (Research Diet D0933105, NJ, USA). Ibuprofen-supplemented *db/db* mice were fed *ad libitum* with this chow for 7 weeks, whereas control *db/db* and *db/+* mice were provided isocaloric standard chow (Research Diet D10001). Both *db/db* groups displayed similar body weight and food intake.

*Etanercept (ETN)*: This human recombinant TNF- $\alpha$  receptor fusion protein, which competitively binds TNF- $\alpha$  (Enbrel; Wyeth Pharmaceuticals, France) or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) were continuously infused into the cerebral ventricle (28 days, 0.11  $\mu$ l/h) as previously described (Guggilam, et al., 2011; Haji, et al., 2012). Briefly, an intracerebroventricular (icv) cannula was implanted into the right lateral cerebral ventricle (stereotaxic coordinates: 0.3mm posterior to bregma, 1.0mm lateral from midline, 2.8mm from the skull surface) under ketamine/xylazine anesthesia. The cannula was connected to an osmotic mini-pump (Alzet, model 1004D) implanted subcutaneously in the back of the mouse in order to deliver ETN (5  $\mu$ g/kg/h) or aCSF.

*Chronic food restriction*: On arrival, mice were first fed *ad libitum* for 4 days and 24h-food intake was monitored. Half of the mice of each genotype (n=10/group) was then randomly allocated to control (fed *ad libitum*) or food restricted group. As anticipated, food intake was higher in *db/db* mice than in *db/+* mice, but both control and restricted groups of each genotype displayed similar food intake and body weight when restriction begun. As previously described (Bates, et al., 2005), restricted *db/db* mice were provided each day for 7 weeks the average amount of food consumed by control *db/+* mice, leading to a food restriction of about 30% compared to unrestricted *db/db* mice. Similar restriction rate was applied to restricted *db/+* mice.

### **2.3. Behavioral measurements**

Behavioral testing was always performed in the morning, under conditions of dim light and low noise and started either after 2 weeks of recovery post-surgery (for mifepristone and etanercept experiments) or after 4 weeks of exposure to ibuprofen-supplemented diet or food restriction procedure (i.e. in 8-12 wk-old mice). Anxiety-like behavior was assessed in

the open-field (OF) and elevated plus-maze (EPM) and automatically recorded and scored using the Smart Videotrack System (Bioseb, France) as previously described (Andre, et al., 2014; Dinel, et al., 2011). All equipments were thoroughly cleaned between each session. Mice were randomly placed in alternate corners of the OF apparatus, which was made of an unknown inescapable square area (40x40x16cm) without bedding litter, and allowed freely exploring for 10 min. The OF was virtually divided in two zones (a central more anxiogenic zone and its periphery) in which total distance covered, number of entries and percent of time spent were analyzed as anxiety-like indexes. Seven days later, mice were exposed to the EPM apparatus made of 4 arms (30x8cm), 2 of them closed with walls providing shelter as compared to open-arms which are more anxiogenic since the EPM was placed 120cm above the floor. Mice were placed in the center facing an open-arm and the number of arm entries (scored as such when all four limbs were placed into an arm), as well as percent of time spent in open-arms, was recorded for 5min. Reduced frequency of risk assessment behaviors such as stretch-attend posture (when mouse stretched forward in an open-arm with forelegs only and then retracted back to its original position) and unprotected head-dips (defined as peering over the edge of an open-arm with head, neck and shoulders) were used as additional anxiety-like indexes (Wall, et al., 2003).

#### **2.4. Biochemical measurements**

After behavioral testing, mice were euthanized with terminal isoflurane anesthesia. Blood samples were immediately collected via cardiac puncture and mice were perfused with chilled PBS via the ascending aorta to remove all traces of blood from tissues. Brains were rapidly dissected and the hippocampus and prefrontal cortex were immediately collected, dried frozen and stored until assaying.

*Hormones and cytokines assay:* As previously described (Andre, et al., 2014; Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014), plasma leptin, insulin, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were measured with the mouse adipokine and cytokine Milliplex kits (Merk-Millipore, France). Total plasma corticosterone was measured with an in-house radioimmunoassay (RIA) (Richard, et al., 2010). All samples were run in duplicate.

*Quantitative qRT-PCR:* Total RNA was extracted from hippocampus and/or prefrontal cortex using TRIzol (Invitrogen) and reverse-transcribed as previously described (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). Real-time RT-PCR for IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  was performed using Taqman gene expression assays for sequence-specific primers purchased from Applied

Biosystems (Foster City, CA) (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). Relative expression levels were calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method and plotted as fold change relative to the appropriate control condition.

*Western Blot analysis:* After RNA extraction using Trizol and DNA removal, proteins were purified in denaturing conditions. Protein concentration was then assessed by bicinchoninic acid assay (Interchim, Montluçon, France). 25µg of proteins were loaded and blotted as described previously (Delpech, et al., 2015). Primary antibodies were diluted as follows: anti-GR 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-GR 1:5000 (Cell Signaling), anti-GAPDH 1:5000 (Cell Signaling). The blots were developed and quantified as described (Brossaud 2013). Between each revelation, membranes were incubated for 15 min in Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) in order to erase the previous antibody.

## **2.5. Electrophysiology**

Horizontal hippocampal slices (350µm) were prepared using a vibrating blade microtome (VT1000S, Leica Microsystems) as previously described (Thomazeau, et al., 2016). Slices recording started after at least 1 h of rest at room temperature. The aCSF solution for storage contained (in mM): 23 NaHCO<sub>3</sub>, 130 NaCl, 11 glucose, 2.4 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 KCl, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, and 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The aCSF solution for recordings contained (in mM): 23 NaHCO<sub>3</sub>, 130 NaCl, 11 glucose, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, and 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. To assess the electrophysiological consequences of inhibiting TNF-α, etanercept was added to this solution for at least 3h at a final concentration of 10 µg/mL. Recordings were performed at room temperature, and slices were continuously superfused with recording aCSF. Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in voltage-clamp by whole-cell patch-clamp in the CA1 stratum radiatum of the ventral hippocampus (vHPC) (Maggio and Segal 2007; Thomazeau et al. 2016). mEPSCs were recorded at the holding potential of -60mV with borosilicate glass pipettes filled with balanced intracellular solutions (in mM): 128 cesium methane-sulfonate, 20 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 0.3 CaCl<sub>2</sub>, 2 Na<sup>2+</sup>-ATP, 0.3 Na<sup>+</sup>-GTP, 10 glucose buffered with 10 HEPES, pH 7.3, osmolarity 290mOsm. Whole-cell access resistances measured in voltage clamp were in the range of 5-20 mΩ. For mEPSCs analysis, amplitude, rise time, decay time and inter-event interval time were analyzed with Axograph X (Haji, et al., 2012; Thomazeau, et al., 2016). One or two cells per animal and per condition (aCSF ± etanercept) were recorded and at least 4 distinct animals from each

experimental group were employed. In the text, “n” in electrophysiological results refers to the number of cells.

## **2.6. Statistical analysis**

Data are presented as mean±SEM and were analyzed using student’s t tests (for the ibuprofen experiment) or two-way ANOVA (genotype x treatment) with repeated measurement on the time factor where appropriate for the other experiments. Between-group differences were determined using *post-hoc* Fisher’s LSD test when interactions were significant. Pearson’s correlation coefficients were calculated to determine potential relationships between behavioral and biochemical changes induced by the different treatments. For electrophysiological recordings, fEPSPs were normalized to 10min baseline prior to plasticity induction and EPSPs amplitude changes after HFS were calculated with respect to baseline. All values reported refer to 40min after HFS. To compare mEPSCs between control aCSF and etanercept-treated slices in *db/+* and *db/db* mice, unpaired t tests were used.

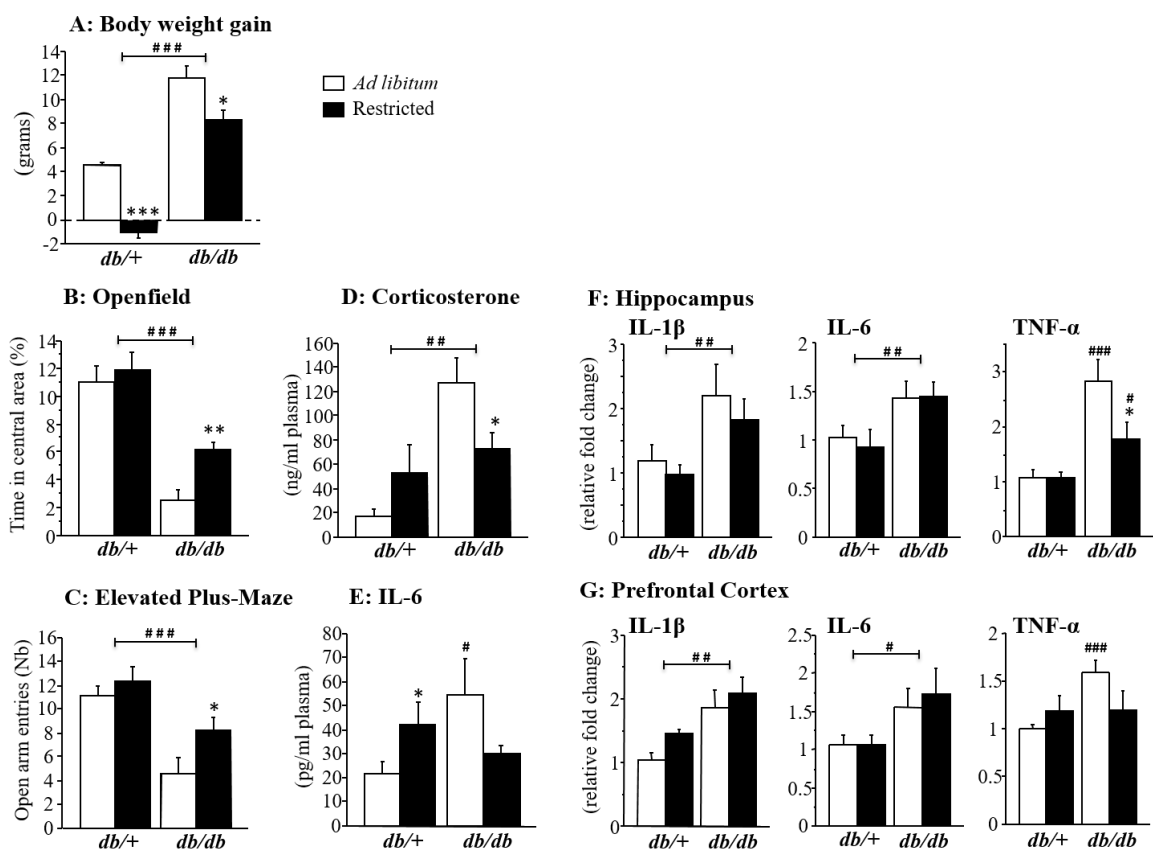
## **3. RESULTS**

### **3.1. Chronic food restriction (CFR) reduced anxiety-like behavior, plasma corticosterone levels and cytokine production in db/db mice**

CFR significantly blunted body weight gain in both genotypes compared to their respective controls (CFR:  $F_{(1,32)}=30.6$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 1A), although *db/db* mice remained heavier than *db/+* mice by the end of the CFR period (genotype:  $F_{(1,32)}=129.2$ ,  $P<0.001$ ). CFR did not significantly improve high plasma leptin levels displayed by *db/db* mice, and only increased plasma insulin in restricted *db/+* mice (genotype x CFR:  $F_{(1,35)}=31.1$ ,  $P<0.001$ ; data not shown).

Since weight loss has been shown to improve obesity-associated neuropsychiatric symptoms (Brinkworth, et al., 2009; Capuron, et al., 2011), we assessed whether CFR may improve increased anxiety-like behavior in *db/db* mice (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). Percent of time spent exploring the anxiogenic central area of the OF was smaller in *db/db* mice than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,32)}=45.2$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 1B), but this difference was attenuated by CFR ( $F_{(1,32)}=4.5$ ,  $P<0.05$ ) that increased this time, particularly in *db/db* mice. Similarly, CFR drastically reduced the latency of the first entry into the central area in

restricted *db/db* mice compared to their non-restricted counterparts ( $49.9 \pm 14.3$  vs.  $126.6 \pm 23.7$  sec; genotype x CFR:  $F_{(1,32)}=7.4$ ,  $P<0.01$ ), whereas both *db/+* groups displayed the same latency ( $34.8 \pm 6.9$  and  $35.2 \pm 5.9$  sec). Further analysis of the time-course of central entries confirmed that CFR effect was significant in *db/db* but not in *db/+* mice (CFR:  $F_{(1,60)}=11.7$ ,  $P<0.01$ ; CFR x time:  $F_{(4,60)}=7.0$ ,  $P<0.001$ ; data not shown). Similarly, *db/db* mice displayed less entries into the anxiogenic open-arms of the EPM than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,33)}=23.1$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 1C) and tended to spend less time in this area (genotype:  $F_{(1,31)}=3.7$ ,  $P=0.06$ ; data not shown). CFR significantly increased both the number of visits ( $F_{(1,33)}=4.6$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 1C) and time spent ( $F_{(1,31)}=5.3$ ,  $P<0.05$ ) in the open-arms, this increase being particularly notable in restricted *db/db* mice. Of note, improvement of anxiety-like behavior was not due to locomotor changes since total distance travelled in the OF or EPM was unaltered by CFR (data not shown). A question arose then of what biological correlates might underlie these behavioral improvements.



**Figure 1.** CFR reduced anxiety-like behavior, plasma corticosterone levels and cytokine production in *db/db* mice. A). Body weight gain. B). Time in the central area of the OF. C). Number of entries in the open arms of the EPM. D). Plasma corticosterone levels. E). Plasma IL-6 levels. F). IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the hippocampus and G). in the prefrontal cortex. (n=10/group. #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 for genotype effect; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 for treatment effect)

Among the main biological factors altered in *db/db* mice and able to modulate behavior by acting within the brain, corticosterone and cytokines are likely candidates (Anisman, et al., 2008; Marques, et al., 2009; McEwen and Stellar, 1993). We therefore determined whether CFR may normalize hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and/or inflammatory disturbances reported in *db/db* mice (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Stranahan, et al., 2008). Plasma corticosterone levels were higher in *db/db* mice than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,35)}=15.2$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 1D), but selectively reduced by CFR in *db/db* mice (genotype x CFR:  $F_{(1,35)}=7.5$ ,  $P<0.01$ ; controls *vs.* restricted-*db/db* mice:  $P<0.05$ ). Similarly, CFR abolished the increase in IL-6 levels displayed by *db/db* mice fed *ad libitum* compared to their *db/+* counterparts ( $P<0.05$ ) by differentially altering IL-6 levels according to the genotype (genotype x CFR:  $F_{(1,30)}=7.3$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 1E). On the contrary, *db/+* and *db/db* mice displayed similar plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , regardless feeding conditions (data not shown). Regarding brain inflammation, increased hippocampus mRNA expression of IL-1 $\beta$  (genotype:  $F_{(1,32)}=8.2$ ,  $P<0.01$ ), IL-6 ( $F_{(1,33)}=7.9$ ,  $P<0.01$ ), and TNF- $\alpha$  ( $F_{(1,32)}=24.3$ ,  $P<0.001$ ) was confirmed in *db/db* mice compared to *db/+* mice (Fig. 1F). Interestingly, CFR selectively reduced the hippocampus expression of TNF- $\alpha$  in *db/db* mice (CFR:  $F_{(1,32)}=4.6$ ,  $P<0.05$ ; genotype x CFR:  $F_{(1,32)}=4.0$ ,  $P=0.05$ ; *ad libitum- vs.* restricted-*db/db* mice:  $P<0.05$ ), whereas the expression of the other cytokines was unchanged. As shown in the hippocampus, *db/db* mice displayed higher prefrontal cortex mRNA expression of IL-1 $\beta$  (genotype:  $F_{(1,33)}=11.7$ ,  $P<0.01$ ), IL-6 ( $F_{(1,34)}=5.8$ ,  $P<0.05$ ), and TNF- $\alpha$  ( $F_{(1,32)}=4.5$ ,  $P<0.05$ ) than *db/+* mice (Fig. 1G). Again, CFR did not alter IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression regardless the genotype, but it tended to reduce TNF- $\alpha$  mRNA expression in restricted-*db/db* mice (genotype x CFR:  $F_{(1,32)}=4.1$ ,  $P=0.05$ ). Of note, significant correlations were found between hippocampal, but not cortical, TNF- $\alpha$  mRNA expression and open-arms entries in the EPM ( $r=-0.41$ ;  $P<0.05$ ), first entry latency ( $r=0.75$ ;  $P<0.001$ ) and percent of time spent in the center of the OF ( $r=-0.53$ ;  $P<0.01$ ), which also slightly correlated with plasma corticosterone levels ( $r=-0.38$ ;  $P=0.05$ ). The next step was then to identify the respective role potentially played by HPA axis over-activation and/or inflammation in mediating increased anxiety-like behavior.

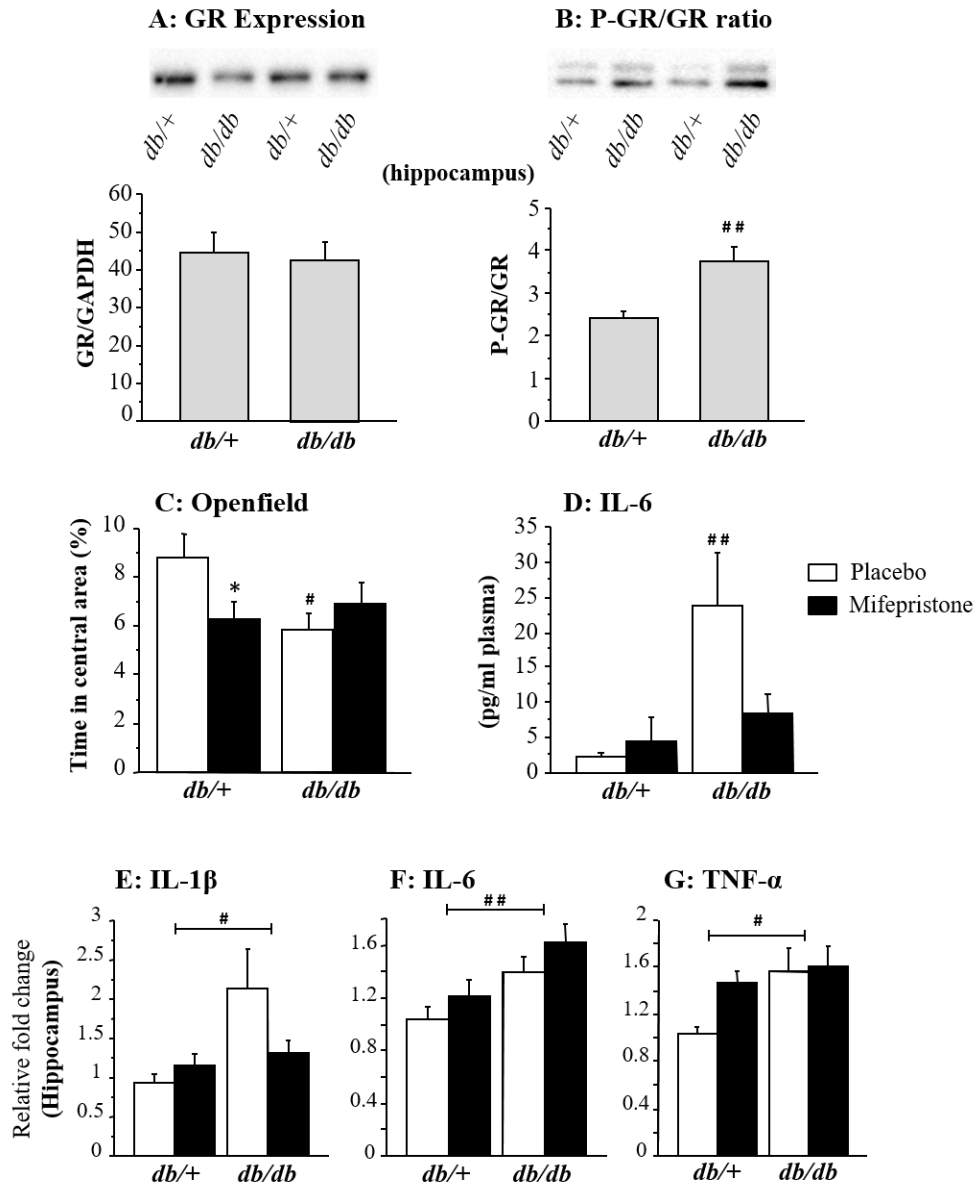


**3.2. Chronic glucocorticoid receptor (GR) antagonism did not improve anxiety-like behavior in db/db mice**

GR activation, particularly in the hippocampus, represents an important modulator of both HPA axis activity and anxiety-like behavior (Oitzl, et al., 1998; Tronche, et al., 1999). Here, *db/db* mice displayed similar hippocampal GR protein expression than *db/+* mice (Fig 2A), but higher GR protein phosphorylation (P-GR/GR ratio:  $t=3.03$ ;  $P<0.01$ ; Fig 2B), suggesting higher GR activation. In order to determine its potential contribution to the enhanced anxiety-like behavior, behavioral consequences of chronic GR antagonism with mifepristone were measured. Regardless the genotype, neither total distance travelled in the OF nor body weight differed between treated or untreated mice (data not shown), supporting the lack of unspecific effects of the treatment. Anxiety-like behavior was higher in *db/db* mice than *db/+* mice, as revealed by reduced total number (genotype:  $F_{(1,34)}=5.5$ ,  $P<0.05$ ) or time-course of entries in the center of the OF (genotype x time:  $F_{(4,144)}=3.0$ ,  $P<0.05$ ; data not shown). Importantly, this was true whatever the treatment, suggesting that it did not improve anxiety-like behavior in *db/db* mice. Of note, the percent of time spent in the center of the OF was reduced by mifepristone in *db/+* but not *db/db* mice (genotype x mifepristone:  $F_{(1,36)}=4.3$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 2C) compared to placebo-treated *db/+* mice (mifepristone:  $F_{(1,18)}=4.4$ ,  $P<0.05$ ). On the contrary, this parameter was similar in all *db/db* mice, and significantly low compared to control *db/+* mice ( $P<0.05$ ).

As both the HPA axis and the inflammatory system are tightly interrelated (Raison and Miller, 2003), we measured whether chronic GR antagonism altered plasma levels and/or hippocampal expression of cytokines. Placebo-treated *db/db* mice displayed similar plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  than *db/+* mice (data not shown) but higher levels of IL-6 (genotype:  $F_{(1,33)}=10.2$ ,  $P<0.01$ ; Fig. 2D). Chronic mifepristone treatment has no impact on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels whatever the genotype (data not shown), but it tended to selectively blunt plasma IL-6 levels in *db/db* mice (genotype x mifepristone:  $F_{(1,33)}=4.9$ ,  $P<0.05$ ; *db/db* placebo vs. mifepristone:  $P=0.06$ ; Fig. 2D). On the contrary, hippocampal mRNA expression of IL-6 remained higher in *db/db* mice than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,36)}=10.2$ ,  $P<0.01$ , Fig. 2F) independently of treatment, whereas it tended to normalize IL-1 $\beta$  mRNA in *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,32)}=5.7$ ,  $P<0.05$ ; genotype x mifepristone:  $F_{(1,32)}=3.4$ ,  $P=0.07$ ; Fig. 2E). Lastly, hippocampal TNF- $\alpha$  mRNAs expression was higher in *db/db* than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,34)}=6.4$ ,  $P<0.05$ , Fig. 2G) regardless their treatment (mifepristone:

$F_{(1,34)}=3.2$ ,  $P=0.08$ ), although mifepristone-treated *db/+* mice clearly displayed higher TNF- $\alpha$  mRNAs expression than their placebo-treated counterparts (placebo vs. mifepristone,  $P<0.01$ ). Taken together, these results argued against a main contribution of HPA axis activation in increased anxiety-like behavior and hippocampal inflammatory alterations displayed by *db/db* mice.

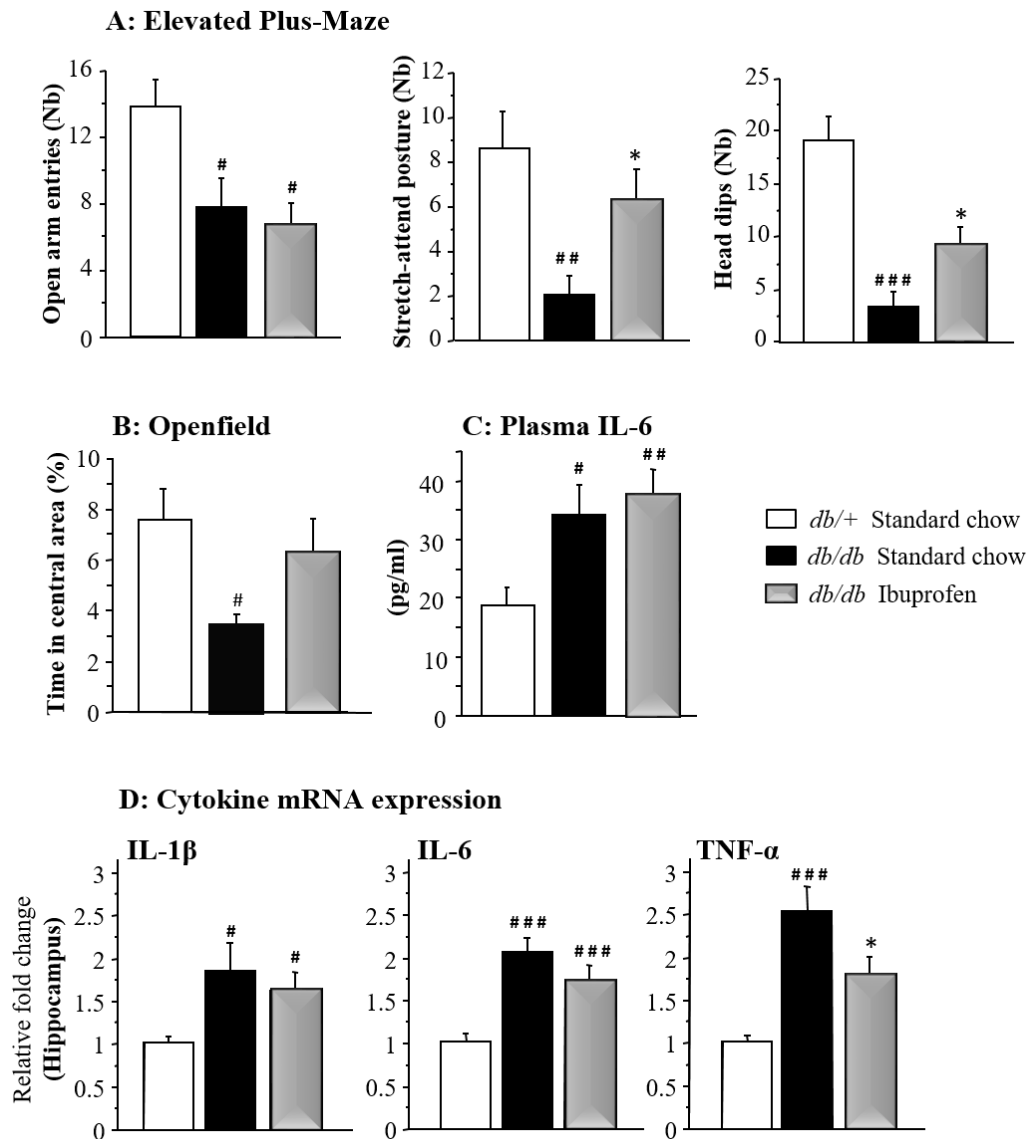


**Figure 2.** Chronic GR antagonism did not improve anxiety-like behavior in *db/db* mice. A). Representative picture of GR expression. B). Phosphorylated levels of GR protein. C). Time in the central area of the OF. D). Plasma IL-6 levels. E-G). Hippocampal expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA. (n=10/group. #p<0.05; ##p<0.01 for genotype effect; \*p<0.05 for treatment effect)

**3.3. Chronic anti-inflammatory treatment reduced anxiety-like behavior and hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression in db/db mice**

We then tested whether directly targeting inflammation in *db/db* mice by administrating ibuprofen may improve anxiety-like behavior. In the EPM (Fig. 3A), *db/db* mice displayed less entries (genotype:  $F_{(1,15)}=6.4$ ,  $P<0.05$ ) and reduced percent of time in the open-arms than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,12)}=5.8$ ,  $P<0.05$ ; data not shown) whatever their treatment. Ibuprofen treatment increased however in *db/db* mice the number of stretch-attend postures ( $F_{(1,16)}=6.4$ ,  $P<0.05$ ) and head dips ( $F_{(1,13)}=6.6$ ,  $P<0.05$ ), two risk assessment behaviors rarely displayed by untreated *db/db* mice compared to *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,15)}=11.2$ ,  $P<0.01$  and  $F_{(1,12)}=32.9$ ,  $P<0.001$  respectively). Akin with this, control *db/db* mice spent significantly less time in the center of the OF than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,15)}=8.3$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 3B), but not anymore after ibuprofen treatment (*db/+* vs. ibuprofen-treated *db/db* mice:  $P>0.1$ ). Importantly, both *db/db* groups displayed the same total distance travelled in the OF (data not shown), which supports an anxiolytic effect of chronic anti-inflammatory treatment, independent from unspecific changes in locomotion. The next question was then to know what neurobiological mechanisms may potentially underlie this effect.

Akin with the above mentioned data discarding a main contribution of HPA axis activation in the behavioral profile of *db/db* mice, ibuprofen treatment improved anxiety-like behavior without changing plasma corticosterone levels, which remained elevated in all *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,15)}=6.6$ ,  $P<0.05$ ; data not shown). Whatever their treatment, *db/db* mice also displayed similar plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  than *db/+* mice (data not shown), as well as higher body weight ( $F_{(1,132)}=33.8$ ,  $P<0.001$ ; data not shown), plasma IL-6 levels ( $F_{(1,13)}=7.2$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 3C), and hippocampal mRNA expression of IL-1 $\beta$  (genotype:  $F_{(1,13)}=7.3$ ,  $P<0.05$ ) and IL-6 ( $F_{(1,14)}=32.9$ ,  $P<0.001$ ) (Fig. 3D). Ibuprofen treatment selectively reduced however the increased hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression displayed by untreated-*db/db* mice compared to *db/+* mice (treatment:  $F_{(1,14)}=4.7$ ,  $P<0.05$ ; genotype:  $F_{(1,13)}=31.0$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 3D). Data obtained after CFR or ibuprofen treatment converged therefore to suggest that increased brain TNF- $\alpha$  expression may contribute to increase anxiety-like behavior in *db/db* mice.

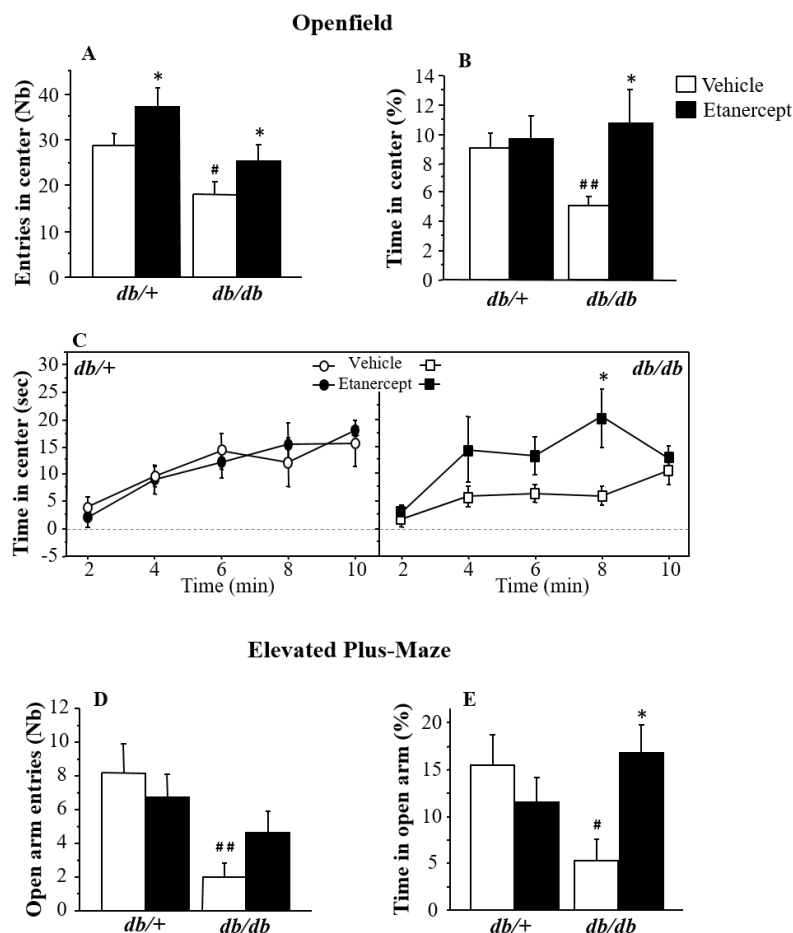


**Figure 3.** Chronic anti-inflammatory treatment reduced anxiety-like behavior and hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression in *db/db* mice. A). Number of entries in the open arms and number of stretch-attend postures in the EPM. B). Time in the central area of the OF. C). Plasma IL-6 levels. D). Hippocampal expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA. (n=10/group. #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 for comparison with *db/+* Standard chow; \*p<0.05 for comparison with *db/db* Standard chow)

### 3.4. Chronic blockade of brain TNF- $\alpha$ improved anxiety-like behavior in *db/db* mice

To directly assess the role of brain TNF- $\alpha$  in anxiety-like behavior, *db/db* mice were chronically icv infused with ETN, a TNF- $\alpha$  inhibitor. Behavioral tests were performed once mice have totally recovered from surgery, as confirmed by similar body weight than in the previous experiments by the time of behavioral assessment (genotype:  $F_{(1,27)}=115.9$ ,  $P<0.001$ ;

data not shown), regardless treatment condition. Control aCSF-infused *db/db* mice displayed increased anxiety-like behavior compared to *db/+* controls, as reflected by significantly lower number of visits ( $F_{(1,23)}=9.4$ ,  $P<0.01$ ; Fig. 4A) and distance travelled in the center of the OF ( $F_{(1,23)}=8.6$ ,  $P<0.01$ ; data not shown). Both measures were increased by chronic ETN infusion (respectively  $F_{(1,23)}=4.4$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 4A, and  $F_{(1,23)}=4.0$ ,  $P<0.05$ ; data not shown). Similarly, total percent of time spent in this area, which was smaller in control *db/db* than *db/+* mice ( $P<0.01$ ; Fig. 4B), was significantly increased by ETN in *db/db* mice (aCSF vs. ETN:  $P<0.05$ ). Interestingly, detailed time-course analysis of the time spent in this area confirmed the effect of ETN in *db/db* mice (treatment:  $F_{(1,52)}=4.7$ ,  $P<0.05$ ; Fig. 4C), whereas it has no effect in *db/+* mice. Consistent with these findings, control *db/db* mice visited less often (genotype:  $F_{(1,22)}=8.7$ ,  $P<0.01$ ; Fig 4D) and spent proportionally less time (genotype x ETN:  $F_{(1,22)}=5.7$ ,  $P<0.05$ ; Fig 4E) in the anxiogenic open arms of the EPM than *db/+* mice.

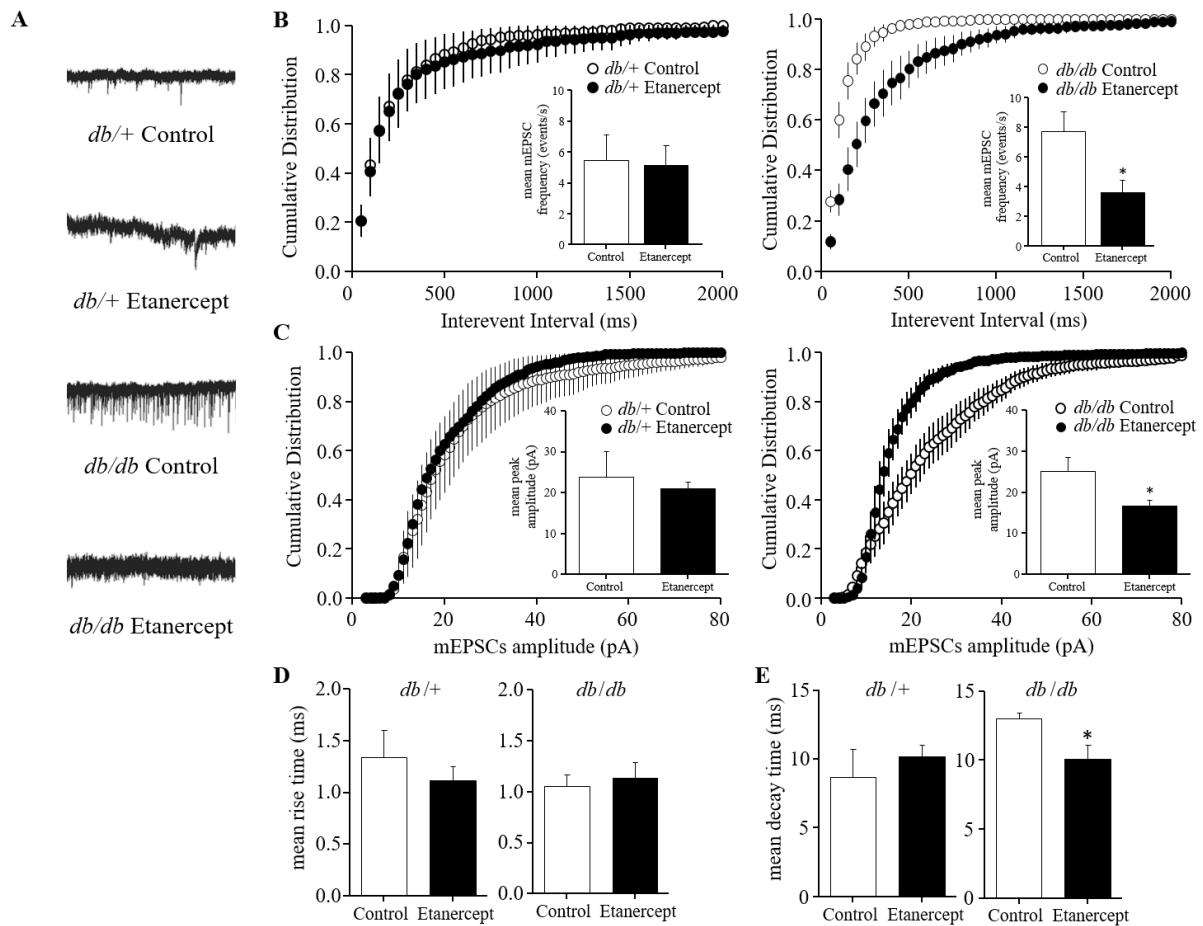


**Figure 4.** Chronic blockade of brain TNF- $\alpha$  improved anxiety-like behavior in *db/db* mice. A-B). Number of entries and time spent in the center of the open-field. C). Time course of the time spent in the center of the open-field. D-E). Number of entries and time spent in the open arms of the EPM. (n=10/group. # $p<0.05$ ; ## $p<0.01$  for genotype effect; \* $p<0.05$  for treatment effect)

However, this last difference was abolished after ETN infusion, which increased the percent of time spent by *db/db* mice in the open-arms (aCSF vs. ETN for *db/db* mice:  $P < 0.05$ ), whereas this parameter was unchanged in *db/+* mice. Of note, ETN did not change total distance travelled in the OF or EPM, nor the total number of arm entries in the EPM (data not shown). This behavioral improvement was also likely independent from any changes of peripheral inflammatory and/or metabolic alterations as brain ETN infusion has no significant impact on plasma cytokine or corticosterone levels whatever the genotype (data not shown). Taken together, the results obtained after chronic icv infusion of ETN uphold the role of brain TNF- $\alpha$  as an important player in exacerbating anxiety-like behavior in *db/db* mice.

### **3.5. Ex-vivo blockade of TNF- $\alpha$ modulated synaptic transmission in the ventral hippocampus (vHPC) of *db/db* mice**

To decipher the neurobiological mechanisms linking increased hippocampal TNF- $\alpha$  and anxiety-like behavior, we then measured the impact of TNF- $\alpha$  blockade on local excitatory synaptic transmission, whose alterations have been related to anxiety in other inflammatory conditions (Centonze, et al., 2009; Christoffel, et al., 2011). TNF- $\alpha$  is indeed known to directly alter glutamatergic synaptic transmission and neuronal excitability (Beattie, et al., 2002; Furukawa and Mattson, 1998; Pickering, et al., 2005). Moreover, it has been shown to induce anxiety-like behavior in a model of multiple sclerosis by increasing decay time and half width of mEPSCs (Haji, et al., 2012). Conversely, ETN may act on anxiety in *db/db* mice by reducing those parameters, particularly in the vHPC which has been specifically related to mood regulation (Bannerman, et al., 2002; Bannerman, et al., 2003; Zhang, et al., 2014). To test this hypothesis, whole-cell patch-clamp recordings was used to examine glutamatergic mEPSCs in CA1 pyramidal neurons (Fig. 5A). Although basal glutamatergic transmission was similar in *db/+* and *db/db* mice, ETN differentially affected the mEPSCs according to the genotype. Whereas no detectable effect was found in *db/+* mice, ETN reduced in *db/db* mice both the mEPSCs frequency ( $t_{(8)}=2.636$ ,  $p < 0.05$ ) and amplitude ( $t_{(8)}=2.407$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5B-C). Moreover, mEPSC rise time was not impaired by ETN (Fig. 5D), whereas it decreased decay time in *db/db* mice ( $t_{(7)}=2.480$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5E). Collectively, these results suggest that TNF- $\alpha$  signaling inhibition improved glutamatergic synaptic transmission in the vHPC of *db/db* mice.



**Figure 5.** *Ex-vivo* blockade of TNF- $\alpha$  modulated synaptic transmission in the ventral hippocampus (vHPC) of *db/db* mice. A) Examples of mEPSCs traces. B-E). mEPSCs frequency, amplitude, rise time and decay time. (n=4-6/group. \*p<0.05 for comparison with *db/db* Control)

#### 4. DISCUSSION

Although dysregulated inflammatory processes and related alterations of brain functions are well-known to directly contribute to the onset of mood disorders in different chronic inflammatory conditions (Capuron and Castanon, 2016; Capuron and Miller, 2011; Dantzer, et al., 2008), their relevance in the context of obesity was still elusive. By using complementary approaches ultimately reducing inflammation, we report here a causal link between obesity-related inflammation and increased anxiety in a murine model of severe obesity. More importantly, this study points for the first time to hippocampal TNF- $\alpha$  as an important contributor of increased anxiety-like behavior, which is improved by antagonizing brain TNF- $\alpha$ . Moreover, we provide evidence that changes in vHPC glutamatergic synaptic transmission may contribute to this improvement.

In the present study, we first used a CFR approach since it has been shown to impact metabolic and inflammatory functions in obese or aged animals (Chung, et al., 2001; Fenton, et al., 2009; Higami, et al., 2006; K.E. Kim, et al., 2016; Martin, et al., 2010), and to improve depressive symptoms in animal models of depression (Lutter, et al., 2008) and mood in non-depressed obese humans (Redman and Ravussin, 2011). In obese *db/db* mice, CFR improved anxiety, without affecting locomotion, but by concomitantly decreasing body weight, IL-6 and corticosterone plasma levels, and hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression. Although each of these parameters may potentially contribute to the reported behavioral improvement, their respective involvement has been clarified by the other data reported here. Decreased body weight is unlikely involved by itself since it is unchanged by ibuprofen and ETN interventions, which however improved anxiety. This is consistent with findings showing that altered metabolism unlikely mediates the development of behavioral alterations in obese rodents. Indeed, anxiety-like behavior can be improved in *db/db* mice by a formula containing ten medicinal herbs, independently of any metabolic improvement (Zhao, et al., 2012). Moreover, although leptin and insulin, which are related to body weight and can modulate behavior by acting within the brain (Akanmu, et al., 2009; Finger, et al., 2010), are increased in the plasma of *db/db* mice, they don't play a main role in inducing their behavioral alterations. CFR and running indeed enhance exploratory behavior in *db/db* mice without decreasing leptin levels (Stranahan, et al., 2009). Moreover, normalizing corticosterone levels can improve memory in *db/db* mice independently of leptin signaling pathway restoration (Stranahan, et al., 2008; Stranahan, et al., 2009). Similarly, normalizing hyperglycemia in *db/db* mice does not reduce anxiety-like behavior in the open-field (Stranahan, et al., 2009). Although elevated systemic IL-6 has been related to increased depressive symptoms in obese patients (Capuron, et al., 2008), a main role for CFR-induced normalization of IL-6 levels in the behavioral improvement reported here can likely be discarded, since restricted-*db/+* mice displayed similar IL-6 plasma levels than non-restricted *db/db* mice, but still less anxiety. Conversely, ibuprofen did not normalized IL-6 plasma levels, but did improve anxiety in *db/db* mice, whereas the opposite was found following mifepristone treatment. Moreover, increased anxiety has already been associated with normal circulating IL-6 and corticosterone concentrations in high-fat diet fed mice (Andre, et al., 2014). In addition, increased plasma corticosterone levels in rats fed with a high-fat diet is not associated with increased anxiety-like behavior (Boitard, et al., 2015). These findings, together with the lack of behavioral improvement despite GR blockade in *db/db* mice, argue against an important role for



enhanced HPA axis activation in increasing obesity-associated anxiety, in contrast with what has been shown regarding memory deficits (Stranahan, et al., 2008; Wosiski-Kuhn, et al., 2014). The fact that ibuprofen improved anxiety-like behavior in *db/db* mice without normalizing plasma corticosterone levels also strengthens the assumption of a mechanistic dissociation between obesity-related cognitive and emotional alterations. Supporting this, several studies show that cognitive alterations displayed by obese mice fed with a high-fat diet are not associated with increased anxiety-like behavior (Boitard, et al., 2012; Boitard, et al., 2015; Wang, et al., 2016). Moreover, we recently reported a time-delay between the onset of memory deficits and anxiety-like behavior in a diet-induced obesity model (Andre, et al., 2014).

Converging studies previously reported a role for TNF- $\alpha$  in inducing mood alterations in different chronic inflammatory conditions (Fleming, et al., 2015; Himmerich, et al., 2008; Kekow, et al., 2011; Tyring, et al., 2006). Both chronic peripheral TNF- $\alpha$  administration (through intraperitoneal injections or osmotic micropumps) and AAV-mediated brain TNF- $\alpha$  expression induce sickness behavior, and depressive- and anxiety-like symptoms in mice (Klaus, et al., 2016). Interestingly, these behavioral effects of TNF- $\alpha$  are higher when injected within the hippocampus than icv or within the amygdala (Klaus, et al., 2016). The present study extends these findings by highlighting a role of TNF- $\alpha$  role in the development of obesity-related anxiety. Indeed, all experimental conditions improving anxiety in *db/db* mice (CFR, ibuprofen or ETN treatment) also reduced hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression. Reciprocally, mifepristone-treated *db/+* mice displayed both increased hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA expression and anxiety-like behavior compared to their controls. Further supporting a specific involvement of hippocampal TNF- $\alpha$  in increasing anxiety, we recently showed that reducing hippocampal mRNA expression of IL-6, but not TNF- $\alpha$ , failed to improve anxiety in *db/db* mice (Fernandez de Cossio, et al., 2016). It could still be argued that changes in mRNA expression are not necessarily associated with changes of functional protein levels, which then directly contribute to downstream neurobiological and behavioral responses. This is however unlikely since correlations between cytokine mRNA expression and corresponding protein levels have been already reported, in particular for TNF- $\alpha$  (Shebl, et al., 2012), including in *db/db* mice (Kumari, et al., 2011). Moreover, blocking brain TNF- $\alpha$  at the protein level with ETN did reduce anxiety-like behavior in *db/db* mice, and related synaptic activity, further suggesting that increased TNF- $\alpha$  mRNA expression indeed translates to increased protein levels and downstream actions on related targets.

Anxiolytic effects of several anti-TNF- $\alpha$  interventions, including with ETN, have been already shown in several chronic inflammatory conditions, such as patients suffering from rheumatoid arthritis (Uguz, et al., 2009) or murine models of multiple sclerosis (Bayramgurler, et al., 2013; Camara, et al., 2015; Haji, et al., 2012). Interestingly, these last experimental studies report a link between ETN-induced decreased anxiety and modulation of glutamatergic transmission (Haji, et al., 2012). Similarly, we found that *ex-vivo* ETN administration was able to improve glutamatergic synaptic transmission in the vHPC of *db/db* mice, in which TNF- $\alpha$  is in excess (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014), since its inhibition locally decreased mEPSCs decay time. Moreover, it also decreased mEPSC frequency and amplitude, suggesting that changes can have occurred at the pre-synaptic levels (Wierenga, et al., 2006). Indeed, an enhancement of mEPSC amplitude and frequency (Bacci, et al., 2001; Burrone, et al., 2002; Thiagarajan, et al., 2002) has been previously associated with increased presynaptic terminal size and probability of neurotransmitter release (Murthy, et al., 2001; Thiagarajan, et al., 2005). More investigations are now necessary to study these parameters in *db/db* mice. As mEPSCs were unchanged by ETN in *db/+* mice, it may be postulated that TNF- $\alpha$  only affects glutamatergic synaptic transmission when its concentrations largely exceed physiological levels, as it occurs in the vHPC of *db/db* mice. Improved anxiety was found in the *in-vivo* experiment after icv ETN administration, meaning that other brain areas may, in addition to vHPC, participate. Whatever the case, vHPC is likely a key area in mediating behavioral effect of TNF- $\alpha$  since it is well-known to regulate emotional behavior (Bannerman, et al., 2002; Bannerman, et al., 2003; Zhang, et al., 2014). Moreover, no correlation was found here between prefrontal cortex TNF- $\alpha$  expression and anxiety-like behavior. To our knowledge, this is the first report of a link between inflammation and synaptic transmission in the vHPC in a model of obesity. Altogether, the present results suggest that TNF- $\alpha$  may change anxiety-like behavior in *db/db* mice by modulating synaptic networks and synaptic transmission, particularly in the vHPC.

In conclusion, the present study points to brain TNF- $\alpha$  as an important mediator of obesity-related anxiety and provides important clues about how it may act to modulate brain function and ultimately alter mood and behavior. Although more studies are now needed to deeply understand the underlying mechanisms, we provide here information which should be useful to identify potential new therapeutic strategies aiming to improve mood disorders associated with many inflammatory conditions.

**5. REFERENCES**

- Akanmu, M.A., Nwabudike, N.L., Ilesanmi, O.R. 2009. Analgesic, learning and memory and anxiolytic effects of insulin in mice. *Behav Brain Res* 196(2), 237-41. doi:S0166-4328(08)00506-8 [pii] 10.1016/j.bbr.2008.09.008.
- Andre, C., Dinel, A.L., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2014. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun*. doi:S0889-1591(14)00078-6 [pii] 10.1016/j.bbi.2014.03.012.
- Anisman, H., Gibb, J., Hayley, S. 2008. Influence of continuous infusion of interleukin-1beta on depression-related processes in mice: corticosterone, circulating cytokines, brain monoamines, and cytokine mRNA expression. *Psychopharmacology (Berl)* 199(2), 231-44. doi:10.1007/s00213-008-1166-z.
- Bacci, A., Coco, S., Pravettoni, E., Schenk, U., Armano, S., Frassoni, C., Verderio, C., De Camilli, P., Matteoli, M. 2001. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicle-associated membrane protein 2. *J Neurosci* 21(17), 6588-96. doi:21/17/6588 [pii].
- Bannerman, D.M., Deacon, R.M., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., Rawlins, J.N. 2002. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116(5), 884-901.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B.K., Feldon, J., Rawlins, J.N. 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139(1-2), 197-213. doi:S0166432802002681 [pii].
- Bates, S.H., Kulkarni, R.N., Seifert, M., Myers, M.G., Jr. 2005. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab* 1(3), 169-78. doi:S1550-4131(05)00054-9 [pii] 10.1016/j.cmet.2005.02.001.
- Bayramgurler, D., Karson, A., Ozer, C., Utkan, T. 2013. Effects of long-term etanercept treatment on anxiety- and depression-like neurobehaviors in rats. *Physiol Behav* 119, 145-8. doi:S0031-9384(13)00196-0 [pii] 10.1016/j.physbeh.2013.06.010.
- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C. 2002. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 295(5563), 2282-5. doi:10.1126/science.1067859 295/5563/2282 [pii].
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., Ferreira, G. 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated

with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun.* doi:S0889-1591(14)00071-3 [pii] 10.1016/j.bbi.2014.03.005.

Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Laye, S., Ferreira, G. 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22(11), 2095-100. doi:10.1002/hipo.22032.

Boitard, C., Maroun, M., Tantot, F., Cavaroc, A., Sauvant, J., Marchand, A., Laye, S., Capuron, L., Darnaudery, M., Castanon, N., Coutureau, E., Vouimba, R.M., Ferreira, G. 2015. Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. *J Neurosci* 35(9), 4092-103. doi:35/9/4092 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.3122-14.2015.

Brinkworth, G.D., Buckley, J.D., Noakes, M., Clifton, P.M., Wilson, C.J. 2009. Long-term effects of a very low-carbohydrate diet and a low-fat diet on mood and cognitive function. *Arch Intern Med* 169(20), 1873-80. doi:169/20/1873 [pii] 10.1001/archinternmed.2009.329.

Brunault, P., Jacobi, D., Miknius, V., Bourbao-Tournois, C., Hutten, N., Gaillard, P., Couet, C., Camus, V., Ballon, N. 2012. High preoperative depression, phobic anxiety, and binge eating scores and low medium-term weight loss in sleeve gastrectomy obese patients: a preliminary cohort study. *Psychosomatics* 53(4), 363-70. doi:S0033-3182(11)00388-4 [pii] 10.1016/j.psych.2011.12.008.

Burrone, J., O'Byrne, M., Murthy, V.N. 2002. Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* 420(6914), 414-8. doi:10.1038/nature01242 nature01242 [pii].

Camara, M.L., Corrigan, F., Jaehne, E.J., Jawahar, M.C., Ansbomb, H., Baune, B.T. 2015. Effects of centrally administered etanercept on behavior, microglia, and astrocytes in mice following a peripheral immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 40(2), 502-12. doi:npp2014199 [pii] 10.1038/npp.2014.199.

Canello, R., Clement, K. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113(10), 1141-7. doi:BJO1004 [pii] 10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x.

Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58(8), 1091-103. doi:gut.2008.165886 [pii] 10.1136/gut.2008.165886.

Capuron, L., Castanon, N. 2016. Role of Inflammation in the Development of Neuropsychiatric Symptom Domains: Evidence and Mechanisms. *Curr Top Behav Neurosci.* doi:10.1007/7854\_2016\_14.

- Capuron, L., Lasselin, J., Castanon, N. 2016. Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. *Neuropsychopharmacology*. doi:npp2016123 [pii] 10.1038/npp.2016.123.
- Capuron, L., Miller, A.H. 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 130(2), 226-38. doi:S0163-7258(11)00047-7 [pii] 10.1016/j.pharmthera.2011.01.014.
- Capuron, L., Poitou, C., Machaux-Tholliez, D., Frochot, V., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Laye, S., Clement, K. 2011. Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. *Psychol Med* 41(7), 1517-28. doi:S0033291710001984 [pii] 10.1017/S0033291710001984.
- Capuron, L., Su, S., Miller, A.H., Bremner, J.D., Goldberg, J., Vogt, G.J., Maisano, C., Jones, L., Murrah, N.V., Vaccarino, V. 2008. Depressive symptoms and metabolic syndrome: is inflammation the underlying link? *Biol Psychiatry* 64(10), 896-900. doi:S0006-3223(08)00666-5 [pii] 10.1016/j.biopsych.2008.05.019.
- Castanon, N., Lasselin, J., Capuron, L. 2014. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 74. doi:10.3389/fendo.2014.00074.
- Castanon, N., Luheshi, G., Laye, S. 2015. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci* 9, 229. doi:10.3389/fnins.2015.00229.
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Cavasinni, F., De Chiara, V., Bergami, A., Musella, A., D'Amelio, M., Cavallucci, V., Martorana, A., Bergamaschi, A., Cencioni, M.T., Diamantini, A., Butti, E., Comi, G., Bernardi, G., Cecconi, F., Battistini, L., Furlan, R., Martino, G. 2009. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 29(11), 3442-52. doi:29/11/3442 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.5804-08.2009.
- Chirinos, D.A., Goldberg, R., Gellman, M., Mendez, A.J., Gutt, M., McCalla, J.R., Llabre, M.M., Schneiderman, N. 2013. Leptin and its association with somatic depressive symptoms in patients with the metabolic syndrome. *Ann Behav Med* 46(1), 31-9. doi:10.1007/s12160-013-9479-5.
- Christoffel, D.J., Golden, S.A., Dumitriu, D., Robison, A.J., Janssen, W.G., Ahn, H.F., Krishnan, V., Reyes, C.M., Han, M.H., Ables, J.L., Eisch, A.J., Dietz, D.M., Ferguson, D., Neve, R.L., Greengard, P., Kim, Y., Morrison, J.H., Russo, S.J. 2011. I $\kappa$ B kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci* 31(1), 314-21. doi:31/1/314 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.4763-10.2011.
- Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W., Yu, B.P. 2001. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci* 928, 327-35.

- Daly, M. 2013. The relationship of C-reactive protein to obesity-related depressive symptoms: a longitudinal study. *Obesity (Silver Spring)* 21(2), 248-50. doi:10.1002/oby.20051.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1), 46-56. doi:nrn2297 [pii] 10.1038/nrn2297.
- Dawes, A.J., Maggard-Gibbons, M., Maher, A.R., Booth, M.J., Miake-Lye, I., Beroes, J.M., Shekelle, P.G. 2016. Mental Health Conditions Among Patients Seeking and Undergoing Bariatric Surgery: A Meta-analysis. *JAMA* 315(2), 150-63. doi:2481004 [pii] 10.1001/jama.2015.18118.
- Dean, B., Tawadros, N., Scarr, E., Gibbons, A.S. 2010. Regionally-specific changes in levels of tumour necrosis factor in the dorsolateral prefrontal cortex obtained postmortem from subjects with major depressive disorder. *J Affect Disord* 120(1-3), 245-8. doi:10.1016/j.jad.2009.04.027.
- Delpech, J.C., Thomazeau, A., Madore, C., Bosch-Bouju, C., Larrieu, T., Lacabanne, C., Remus-Borel, J., Aubert, A., Joffre, C., Nadjar, A., Laye, S. 2015. Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment. *Neuropsychopharmacology*. doi:npp2015127 [pii] 10.1038/npp.2015.127.
- Dey, A., Hao, S., Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., Stranahan, A.M. 2014. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. *J Neuroimmunol*. doi:S0165-5728(14)00030-7 [pii] 10.1016/j.jneuroim.2014.01.013.
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2011. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One* 6(9), e24325. doi:10.1371/journal.pone.0024325 PONE-D-11-08473 [pii].
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2014. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 40, 48-59. doi:S0306-4530(13)00397-1 [pii] 10.1016/j.psyneuen.2013.10.014.
- Dixon, J.B., Dixon, M.E., O'Brien, P.E. 2003. Depression in association with severe obesity: changes with weight loss. *Arch Intern Med* 163(17), 2058-65. doi:10.1001/archinte.163.17.2058 163/17/2058 [pii].
- Dixon, J.B., Hayden, M.J., Lambert, G.W., Dawood, T., Anderson, M.L., Dixon, M.E., O'Brien, P.E. 2008. Raised CRP levels in obese patients: symptoms of depression have an independent positive association. *Obesity (Silver Spring)* 16(9), 2010-5. doi:oby2008271 [pii] 10.1038/oby.2008.271.

- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctot, K.L. 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67(5), 446-57. doi:S0006-3223(09)01229-3 [pii] 10.1016/j.biopsych.2009.09.033.
- Emery, C.F., Fondow, M.D., Schneider, C.M., Christofi, F.L., Hunt, C., Busby, A.K., Needleman, B.J., Melvin, W.S., Elsayed-Awad, H.M. 2007. Gastric bypass surgery is associated with reduced inflammation and less depression: a preliminary investigation. *Obes Surg* 17(6), 759-63.
- Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., Dey, A., Hao, S., Davis, C.L., Pollock, N.K., Stranahan, A.M. 2014. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 34(7), 2618-31. doi:34/7/2618 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.4200-13.2014.
- Fenton, J.I., Nunez, N.P., Yakar, S., Perkins, S.N., Hord, N.G., Hursting, S.D. 2009. Diet-induced adiposity alters the serum profile of inflammation in C57BL/6N mice as measured by antibody array. *Diabetes Obes Metab* 11(4), 343-54. doi:DOM974 [pii] 10.1111/j.1463-1326.2008.00974.x.
- Fernandez de Cossio, L., Fourier, C., Sauvant, J., Everard, A., Capuron, L., Cani, P.D., Laye, S., Castanon, N. 2016. Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. Submitted to *Brain Behavior and Immunity*.
- Ferrari, A.J., Charlson, F.J., Norman, R.E., Patten, S.B., Freedman, G., Murray, C.J., Vos, T., Whiteford, H.A. 2013. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med* 10(11), e1001547. doi:10.1371/journal.pmed.1001547 PMEDICINE-D-13-01260 [pii].
- Finger, B.C., Dinan, T.G., Cryan, J.F. 2010. Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. *Psychopharmacology (Berl)* 210(4), 559-68. doi:10.1007/s00213-010-1858-z.
- Fleming, P., Roubille, C., Richer, V., Starnino, T., McCourt, C., McFarlane, A., Siu, S., Kraft, J., Lynde, C., Pope, J.E., Keeling, S., Dutz, J., Bessette, L., Bissonnette, R., Haraoui, B., Gulliver, W.P. 2015. Effect of biologics on depressive symptoms in patients with psoriasis: a systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29(6), 1063-70. doi:10.1111/jdv.12909.
- Francis, H., Stevenson, R. 2013. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* 63, 119-28. doi:S0195-6663(12)00514-4 [pii] 10.1016/j.appet.2012.12.018.
- Furukawa, K., Mattson, M.P. 1998. The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-alpha in hippocampal neurons. *J Neurochem* 70(5), 1876-86.

- Ghosal, K., Stathopoulos, A., Pimplikar, S.W. 2010. APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS One* 5(7), e11866. doi:10.1371/journal.pone.0011866.
- Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29, 415-45. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- Grippe, A.J., Francis, J., Beltz, T.G., Felder, R.B., Johnson, A.K. 2005. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav* 84(5), 697-706. doi:S0031-9384(05)00049-1 [pii] 10.1016/j.physbeh.2005.02.011.
- Guggilam, A., Cardinale, J.P., Mariappan, N., Sriramula, S., Haque, M., Francis, J. 2011. Central TNF inhibition results in attenuated neurohumoral excitation in heart failure: a role for superoxide and nitric oxide. *Basic Res Cardiol* 106(2), 273-86. doi:10.1007/s00395-010-0146-8.
- Haji, N., Mandolesi, G., Gentile, A., Sacchetti, L., Fresegna, D., Rossi, S., Musella, A., Sepman, H., Motta, C., Studer, V., De Chiara, V., Bernardi, G., Strata, P., Centonze, D. 2012. TNF-alpha-mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 237(2), 296-303. doi:S0014-4886(12)00287-7 [pii] 10.1016/j.expneurol.2012.07.010.
- Haslam, D.W., James, W.P. 2005. Obesity. *Lancet* 366(9492), 1197-209. doi:S0140-6736(05)67483-1 [pii] 10.1016/S0140-6736(05)67483-1.
- Higami, Y., Barger, J.L., Page, G.P., Allison, D.B., Smith, S.R., Prolla, T.A., Weindruch, R. 2006. Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J Nutr* 136(2), 343-52. doi:136/2/343 [pii].
- Himmerich, H., Fulda, S., Linseisen, J., Seiler, H., Wolfram, G., Himmerich, S., Gedrich, K., Kloiber, S., Lucae, S., Ising, M., Uhr, M., Holsboer, F., Pollmacher, T. 2008. Depression, comorbidities and the TNF-alpha system. *Eur Psychiatry* 23(6), 421-9. doi:S0924-9338(08)01527-7 [pii] 10.1016/j.eurpsy.2008.03.013.
- Hryhorczuk, C., Sharma, S., Fulton, S.E. 2013. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci* 7, 177. doi:10.3389/fnins.2013.00177.
- Kanoski, S.E., Davidson, T.L. 2011. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 103(1), 59-68. doi:S0031-9384(10)00450-6 [pii] 10.1016/j.physbeh.2010.12.003.
- Kaster, M.P., Gadotti, V.M., Calixto, J.B., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. 2012. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. *Neuropharmacology* 62(1), 419-26. doi:S0028-3908(11)00351-0 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2011.08.018.



- Kekow, J., Moots, R., Khandker, R., Melin, J., Freundlich, B., Singh, A. 2011. Improvements in patient-reported outcomes, symptoms of depression and anxiety, and their association with clinical remission among patients with moderate-to-severe active early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 50(2), 401-9. doi:keq327 [pii] 10.1093/rheumatology/keq327.
- Kim, H., Kang, H., Heo, R.W., Jeon, B.T., Yi, C.O., Shin, H.J., Kim, J., Jeong, S.Y., Kwak, W., Kim, W.H., Kang, S.S., Roh, G.S. 2016. Caloric restriction improves diabetes-induced cognitive deficits by attenuating neurogranin-associated calcium signaling in high-fat diet-fed mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 36(6), 1098-110. doi:0271678X15606724 [pii] 10.1177/0271678X15606724.
- Kim, K.E., Jung, Y., Min, S., Nam, M., Heo, R.W., Jeon, B.T., Song, D.H., Yi, C.O., Jeong, E.A., Kim, H., Kim, J., Jeong, S.Y., Kwak, W., Ryu do, H., Horvath, T.L., Roh, G.S., Hwang, G.S. 2016. Caloric restriction of db/db mice reverts hepatic steatosis and body weight with divergent hepatic metabolism. *Sci Rep* 6, 30111. doi:srep30111 [pii] 10.1038/srep30111.
- Kim, Y.J., Kim, H.J., No, J.K., Chung, H.Y., Fernandes, G. 2006. Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sci* 78(21), 2523-32. doi:S0024-3205(05)01163-X [pii] 10.1016/j.lfs.2005.10.034.
- Klaus, F., Paterna, J.C., Marzorati, E., Sigrist, H., Gotze, L., Schwendener, S., Bergamini, G., Jehli, E., Azzinnari, D., Fuertig, R., Fontana, A., Seifritz, E., Pryce, C.R. 2016. Differential effects of peripheral and brain tumor necrosis factor on inflammation, sickness, emotional behavior and memory in mice. *Brain Behav Immun*. doi:S0889-1591(16)30358-0 [pii] 10.1016/j.bbi.2016.08.001.
- Kumari, R., Willing, L.B., Patel, S.D., Baskerville, K.A., Simpson, I.A. 2011. Increased cerebral matrix metalloprotease-9 activity is associated with compromised recovery in the diabetic db/db mouse following a stroke. *J Neurochem* 119(5), 1029-40. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07487.x.
- Ladwig, K.H., Marten-Mittag, B., Lowel, H., Doring, A., Koenig, W. 2003. Influence of depressive mood on the association of CRP and obesity in 3205 middle aged healthy men. *Brain Behav Immun* 17(4), 268-75. doi:S0889159103000564 [pii].
- Lanquillon, S., Krieg, J.C., Bening-Abu-Shach, U., Vedder, H. 2000. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 22(4), 370-9. doi:S0893-133X(99)00134-7 [pii] 10.1016/S0893-133X(99)00134-7.
- Larrieu, T., Hilal, M.L., De Smedt-Peyrusse, V., Sans, N., Laye, S. 2016. Nutritional Omega-3 Deficiency Alters Glucocorticoid Receptor-Signaling Pathway and Neuronal Morphology in Regionally Distinct Brain Structures Associated with Emotional Deficits. *Neural Plast* 2016, 8574830. doi:10.1155/2016/8574830.

- Lasselain, J., Magne, E., Beau, C., Ledaguenel, P., Dexpert, S., Aubert, A., Laye, S., Capuron, L. 2014. Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 99(1), E53-61. doi:10.1210/jc.2013-2673 [pii] 10.1210/jc.2013-2673.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Gahtan, E., Ubeda, O., Beech, W., Overmier, J.B., Hsiao-Ashec, K., Frautschy, S.A., Cole, G.M. 2001. Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiol Aging* 22(6), 983-91. doi:S0197458001002998 [pii].
- Liu, Y., Nakagawa, Y., Wang, Y., Sakurai, R., Tripathi, P.V., Lutfy, K., Friedman, T.C. 2005. Increased glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes* 54(1), 32-40. doi:54/1/32 [pii].
- Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Fuster-Matanzo, A., Hernandez, F., Rabano, A., Avila, J. 2014. Peripherally triggered and GSK-3beta-driven brain inflammation differentially skew adult hippocampal neurogenesis, behavioral pattern separation and microglial activation in response to ibuprofen. *Transl Psychiatry* 4, e463. doi:tp201492 [pii] 10.1038/tp.2014.92.
- Luppino, F.S., de Wit, L.M., Bouvy, P.F., Stijnen, T., Cuijpers, P., Penninx, B.W., Zitman, F.G. 2010. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry* 67(3), 220-9. doi:67/3/220 [pii] 10.1001/archgenpsychiatry.2010.2.
- Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Anderson, J.G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., Zigman, J.M. 2008. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci* 11(7), 752-3. doi:nn.2139 [pii] 10.1038/nn.2139.
- MacDonald, L., Hazi, A., Paolini, A.G., Kent, S. 2014. Calorie restriction dose-dependently abates lipopolysaccharide-induced fever, sickness behavior, and circulating interleukin-6 while increasing corticosterone. *Brain Behav Immun* 40, 18-26. doi:S0889-1591(14)00006-3 [pii] 10.1016/j.bbi.2014.01.005.
- Marques, A.H., Silverman, M.N., Sternberg, E.M. 2009. Glucocorticoid dysregulations and their clinical correlates. From receptors to therapeutics. *Ann N Y Acad Sci* 1179, 1-18. doi:NYAS4987 [pii] 10.1111/j.1749-6632.2009.04987.x.
- Martin, B., Ji, S., Maudsley, S., Mattson, M.P. 2010. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14), 6127-33. doi:0912955107 [pii] 10.1073/pnas.0912955107.

- Mazzeschi, C., Pazzagli, C., Buratta, L., Reboldi, G.P., Battistini, D., Piana, N., Pippi, R., Fatone, C., De Feo, P. 2012. Mutual interactions between depression/quality of life and adherence to a multidisciplinary lifestyle intervention in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 97(12), E2261-5. doi:jc.2012-2364 [pii] 10.1210/jc.2012-2364.
- McEwen, B.S., Stellar, E. 1993. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153(18), 2093-101.
- Murthy, V.N., Schikorski, T., Stevens, C.F., Zhu, Y. 2001. Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32(4), 673-82. doi:S0896-6273(01)00500-1 [pii].
- Norden, D.M., McCarthy, D.O., Bicer, S., Devine, R.D., Reiser, P.J., Godbout, J.P., Wold, L.E. 2015. Ibuprofen ameliorates fatigue- and depressive-like behavior in tumor-bearing mice. *Life Sci* 143, 65-70. doi:S0024-3205(15)30046-1 [pii] 10.1016/j.lfs.2015.10.020.
- O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R. 2009. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14(5), 511-22. doi:4002148 [pii] 10.1038/sj.mp.4002148.
- Oitzl, M.S., Fluttert, M., Sutanto, W., de Kloet, E.R. 1998. Continuous blockade of brain glucocorticoid receptors facilitates spatial learning and memory in rats. *Eur J Neurosci* 10(12), 3759-66.
- Pickering, M., Cumiskey, D., O'Connor, J.J. 2005. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 90(5), 663-70. doi:expphysiol.2005.030734 [pii] 10.1113/expphysiol.2005.030734.
- Pistell, P.J., Morrison, C.D., Gupta, S., Knight, A.G., Keller, J.N., Ingram, D.K., Bruce-Keller, A.J. 2010. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 219(1-2), 25-32. doi:S0165-5728(09)00474-3 [pii] 10.1016/j.jneuroim.2009.11.010.
- Raison, C.L., Miller, A.H. 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 160(9), 1554-65. doi:10.1176/appi.ajp.160.9.1554.
- Raison, C.L., Rutherford, R.E., Woolwine, B.J., Shuo, C., Schettler, P., Drake, D.F., Haroon, E., Miller, A.H. 2013. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry* 70(1), 31-41. doi:1356541 [pii] 10.1001/2013.jamapsychiatry.4.

- Redman, L.M., Ravussin, E. 2011. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal* 14(2), 275-87. doi:10.1089/ars.2010.3253.
- Richard, E.M., Helbling, J.C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.P., Mormede, P., Moisan, M.P. 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151(2), 649-59. doi:en.2009-0862 [pii] 10.1210/en.2009-0862.
- Shebl, F.M., Yu, K., Landgren, O., Goedert, J.J., Rabkin, C.S. 2012. Increased levels of circulating cytokines with HIV-related immunosuppression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(8), 809-15. doi:10.1089/AID.2011.0144.
- Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Cutler, R.G., Lee, K., Egan, J.M., Mattson, M.P. 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 11(3), 309-17. doi:nn2055 [pii] 10.1038/nn2055.
- Stranahan, A.M., Lee, K., Martin, B., Maudsley, S., Golden, E., Cutler, R.G., Mattson, M.P. 2009. Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* 19(10), 951-61. doi:10.1002/hipo.20577.
- Thiagarajan, T.C., Lindskog, M., Tsien, R.W. 2005. Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron* 47(5), 725-37. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.037.
- Thiagarajan, T.C., Piedras-Renteria, E.S., Tsien, R.W. 2002. alpha- and betaCaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron* 36(6), 1103-14.
- Thomazeau, A., Bosch-Bouju, C., Manzoni, O., Laye, S. 2016. Nutritional n-3 PUFA Deficiency Abolishes Endocannabinoid Gating of Hippocampal Long-Term Potentiation. *Cereb Cortex*. doi:bhw052 [pii] 10.1093/cercor/bhw052.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., Schutz, G. 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23(1), 99-103. doi:10.1038/12703.
- Tyring, S., Gottlieb, A., Papp, K., Gordon, K., Leonardi, C., Wang, A., Lalla, D., Woolley, M., Jahreis, A., Zitnik, R., Cella, D., Krishnan, R. 2006. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet* 367(9504), 29-35. doi:S0140-6736(05)67763-X [pii] 10.1016/S0140-6736(05)67763-X.
- Uguz, F., Akman, C., Kucuksarac, S., Tufekci, O. 2009. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy is associated with less frequent mood and anxiety disorders in patients with rheumatoid arthritis. *Psychiatry Clin Neurosci* 63(1), 50-5. doi:PCN1905 [pii] 10.1111/j.1440-1819.2008.01905.x.

- Wall, P.M., Blanchard, R.J., Yang, M., Blanchard, D.C. 2003. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(3), 395-410. doi:S0278-5846(02)00356-1 [pii] 10.1016/S0278-5846(02)00356-1.
- Wang, D., Lin, W., Pan, Y., Kuang, X., Qi, X., Sun, H. 2011. Chronic blockade of glucocorticoid receptors by RU486 enhances lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour and cytokine production in rats. *Brain Behav Immun* 25(4), 706-14. doi:S0889-1591(11)00016-X [pii] 10.1016/j.bbi.2011.01.011.
- Wang, Z., Fan, J., Wang, J., Li, Y., Xiao, L., Duan, D., Wang, Q. 2016. Protective effect of lycopene on high-fat diet-induced cognitive impairment in rats. *Neurosci Lett* 627, 185-91. doi:S0304-3940(16)30313-5 [pii] 10.1016/j.neulet.2016.05.014.
- Wierenga, C.J., Walsh, M.F., Turrigiano, G.G. 2006. Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J Neurophysiol* 96(4), 2127-33. doi:00107.2006 [pii] 10.1152/jn.00107.2006.
- Wosiski-Kuhn, M., Erion, J.R., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E., Stranahan, A.M. 2014. Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice. *Psychoneuroendocrinology* 42, 165-77. doi:S0306-4530(14)00045-6 [pii] 10.1016/j.psyneuen.2014.01.020.
- Yang, B., Trump, R.P., Shen, Y., McNulty, J.A., Clifton, L.G., Stimpson, S.A., Lin, P., Pahel, G.L. 2008. RU486 did not exacerbate cytokine release in mice challenged with LPS nor in db/db mice. *BMC Pharmacol* 8, 7. doi:1471-2210-8-7 [pii] 10.1186/1471-2210-8-7.
- Zaminelli, T., Gradowski, R.W., Bassani, T.B., Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Maria-Ferreira, D., Baggio, C.H., Vital, M.A. 2014. Antidepressant and antioxidative effect of Ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 26(4), 351-62. doi:10.1007/s12640-014-9467-y.
- Zhang, W.N., Bast, T., Xu, Y., Feldon, J. 2014. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 262, 47-56. doi:S0166-4328(13)00669-4 [pii] 10.1016/j.bbr.2013.10.044.
- Zhao, Q., Niu, Y., Matsumoto, K., Tsuneyama, K., Tanaka, K., Miyata, T., Yokozawa, T. 2012. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complement Altern Med* 12, 188. doi:1472-6882-12-188 [pii] 10.1186/1472-6882-12-188.

## **Chapitre 2**

### **OMEGA-3/ANTIOXIDANTS SUPPLEMENTED DIET IMPROVES COGNITIVE ALTERATIONS ASSOCIATED WITH OBESITY**

Célia Fourrier, Clémentine Bosch-Bouju, Agnès Aubert, Laurence Fonséca, Sandrine Djoukitch, Carole Vaysse, Sophie Layé, Corinne Joffre and Nathalie Castanon

*En preparation*



**Objectif :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact d'un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité chez les souris *db/db*, et sur les mécanismes neurobiologiques potentiellement impliqués dans la mise en place de ces altérations. Pour cela, des souris *db/+* et *db/db* ont été nourries soit avec un régime contrôle, soit avec un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants ( $\alpha$ -tocophérol, CoQ10 et phénols) pendant 13 semaines. Bien que le régime enrichi n'ait pas amélioré le poids et la consommation d'eau et de nourriture, il diminuait sensiblement la glycémie post-prandiale et la sensibilité à l'insuline chez les souris *db/db*. Ces améliorations de la régulation du métabolisme du glucose étaient associées à une diminution de l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  dans le foie. De façon intéressante, le régime enrichi n'améliorait pas les comportements de type anxieux, mais il restaurait les performances de mémoire spatiale des souris *db/db* dans le test de la piscine de Morris. Ces améliorations de la cognition n'étaient pas associées à une diminution de l'inflammation périphérique et centrale, ni à une amélioration de la neurogenèse ou de la résistance à l'insuline dans l'hippocampe, des fonctions pourtant connues pour leur participation à la mise en place de troubles cognitifs dans d'autres conditions. En revanche, la composition des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA, qui joue un rôle important dans la mise en place des processus mnésiques, était modifiée par le régime, puisqu'il diminuait l'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B (NMDA) dans l'hippocampe des souris *db/+* et *db/db* et qu'il restaurait celle de la sous-unité GluR2 (AMPA) chez les souris *db/db*. Pour conclure, cette étude montre qu'un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants améliore sensiblement le métabolisme du glucose des souris *db/db*, en particulier au niveau hépatique. Ce régime restaure également la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe. Les résultats obtenus suggèrent que cette amélioration comportementale pourrait impliquer une amélioration de la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Ainsi, une approche nutritionnelle à base d'AGPI n-3 et d'antioxydants pourrait représenter une stratégie non pharmacologique particulièrement intéressante pour diminuer les altérations cognitives associées à l'obésité.



**Objective:**

This study aimed at assessing the impact of a n-3 PUFAs/antioxidants dietary supplementation, not only on metabolic and behavioral alterations associated with obesity in *db/db* mice, but also on the neurobiological mechanisms potentially involved in the development of these alterations. For this purpose, *db/+* and *db/db* mice have been fed either with a control diet, or a n-3 PUFAs/antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol, CoQ10 and phenols) supplemented diet for 13 weeks. Although enriched diet did not improve body weight and food and water consumption, it slightly decreased fed glycemia and insulin sensitivity in *db/db* mice. These metabolic improvements were associated to decreased PPAR $\gamma$  mRNA expression in the liver. On the other hand, enriched diet did not improve anxiety-like behavior but it restored spatial memory performances in *db/db* mice in the Morris water maze task. These behavioral alterations were not associated with decreased peripheral and brain inflammation, improved neurogenesis or hippocampal insulin resistance, which are all well-known to participate to the induction of memory impairments in other conditions. However, it induced modifications of AMPA and NMDA glutamatergic receptor composition, which plays a key role in memory formation, since it decreased GluN2A and GluN2B (NMDA) expression in the hippocampus of *db/+* and *db/db* mice and it restored GluR2 (AMPA) expression in *db/db* mice. To conclude, this study reports that n-3 PUFAs/antioxidants supplemented diet slightly improves glucose metabolism in *db/db* mice, especially in the liver. Moreover, it restores hippocampus-dependent spatial memory, likely by modulating hippocampal synaptic plasticity. Hence, a nutritional intervention with nutrients such as n-3 PUFAs and antioxidants could represent a non-pharmacological strategy to improve cognitive deficits associated with obesity.

**Omega-3 antioxidants supplemented diet improves cognitive alterations  
associated with metabolic syndrome**

Célia Fourier<sup>1,2</sup>, Clémentine Bosch-Bouju<sup>1,2</sup>, Agnès Aubert<sup>1,2</sup>, Camille Kropp<sup>1,2</sup>,  
Laurence Fonséca<sup>3</sup>, Sandrine Djoukitch<sup>3</sup>, Carole Vaysse<sup>3</sup>, Sophie Layé<sup>1,2</sup>, Corinne Joffre<sup>1,2</sup>  
and Nathalie Castanon<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France

<sup>2</sup>Université de Bordeaux, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076  
Bordeaux, France

<sup>3</sup> ITERG, Institut des corps gras, 33600 Pessac, France

**Corresponding author:**

\* Nathalie Castanon

Nutrition et Neurobiologie Intégrée, INRA UMR 1286

Bâtiment UFR Pharmacie, 2<sup>o</sup> tranche, 2<sup>o</sup> étage, Case courrier 34,

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

E-mail : [nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr](mailto:nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr)

Phone: 33 557 574 505

Fax: 33 557 571 227

**Abstract**

Metabolic syndrome is a metabolic and inflammatory disorder that represents a major risk factor for development of comorbidities such as cardiovascular diseases or diabetes. It is also associated with an increased prevalence of mood and cognitive dysfunctions that represent important risk factor for aggravation of obesity and related outcomes. Reducing the development of such disorders in the context of metabolic syndrome may therefore allow improving both health and quality of life of obese subjects. Experimental studies have

suggested that inflammatory processes and neuronal plasticity, which are known to be altered in animal models of metabolic syndrome, might contribute to the development of emotional and cognitive alterations, in particular when these alterations occur in brain areas associated with mood and cognition such as the hippocampus. Interestingly, nutriments such as n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) or antioxidants have been shown to protect against the development of both metabolic and behavioral alterations in different pathological conditions, in part by improving inflammation or neuronal plasticity. Although they may similarly be beneficial against obesity-related alterations, their effect in that context still remains to be studied. Thus, the aim of this study was to evaluate if a diet supplemented with n-3 PUFAs and antioxidants was able: 1) to improve metabolic and behavioral alterations displayed by a genetic mouse model of metabolic syndrome (the *db/db* mice), and 2) to affect the biological mechanisms potentially underlying these alterations. Chronic consumption of the supplemented diet for 13 weeks slightly improved peripheral sensitivity and hepatic mRNA expression of genes regulating glucose metabolism. Moreover, it did not improve anxiety-like behavior or peripheral and hippocampal inflammation, but it reversed hippocampus-dependent spatial memory deficits displayed by control diet-fed *db/db* mice in a water maze task. It also changed the subunit composition of glutamatergic AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, suggesting that improvement of local neuronal plasticity may underlie the improvement of cognitive performances displayed by *db/db* mice fed with the supplemented diet. These findings should provide valuable data for introducing new nutritional strategies for the treatment of behavioral complications associated with metabolic syndrome.

## **1. INTRODUCTION**

The metabolic syndrome (MetS) is a medical condition characterized by abdominal obesity, hypertension, hyperglycemia, hypertriglyceridemia and low LDL cholesterol. The prevalence of MetS and associated comorbidities, such as insulin resistance or cardiovascular diseases, is continuously increasing worldwide. Beyond metabolic alterations, numerous studies have highlighted a higher risk to develop mood symptoms and cognitive alterations in patients with MetS than in the control aged-matched population (Alosco and Gunstad, 2014; Lasselin and Capuron, 2014). Such neuropsychiatric symptoms not only impair the quality of life of affected patients, but also compromise the management of the disease (Brunault, et al.,

2012; Dixon, et al., 2003; Kinzl, et al., 2006). Moreover, they potentiate the risk of developing others comorbidities such as metabolic alterations and cardiovascular diseases, leading to the instauration of a vicious circle. Hence, although the management of neuropsychiatric symptoms in patients with MetS is often neglected, it is important to understand the mechanisms underlying these complications to improve treatment options.

Converging clinical and preclinical studies point to inflammation as a key player in the development of MetS-associated mood and cognitive alterations (Capuron, et al., 2016; Castanon, et al., 2014; Castanon, et al., 2015). MetS is indeed characterized by a low-grade inflammation originating from the adipose tissue (Canello and Clement, 2006; Park, et al., 2005) and the gut microbiota (Cani, et al., 2012; Cani, et al., 2009). In agreement with findings reporting immune-to-brain communication in other chronic inflammatory conditions (Capuron and Miller, 2011; Dantzer, et al., 2008), abundant evidence indicates that peripheral inflammation associated with MetS also induces production of brain inflammatory cytokines (e.g TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ), including in key areas for the regulation of mood and cognition, especially the hippocampus (Boitard, et al., 2014; Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). In particular, *db/db* mice, which display obesity and metabolic alterations characteristic of MetS, also exhibit increased hippocampal expression of inflammatory cytokines, as compared to their lean controls, the *db/+* mice (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014). Furthermore, increased hippocampal inflammation is associated with increased anxiety and memory deficits (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Erion, et al., 2014). Interestingly, a causal role for increased hippocampal IL-1 $\beta$  in inducing behavioral deficits was recently reported in *db/db* mice (Erion, et al., 2014). Along with increased hippocampal inflammation, MetS negatively affects several neurobiological systems known to be involved in the regulation of cognition and mood. MetS-induced behavioral alterations have been indeed associated with impaired synaptic plasticity (i.e decreased long-term potentiation (LTP) and reduced expression of pre- and post-synaptic protein density), decreased neurogenesis, altered insulin signaling pathway, and reduced hippocampal expression of neurotrophic factors (Erion, et al., 2014; Hao, et al., 2015; Stranahan, et al., 2008). Identifying therapeutic strategies able to reduce inflammation and/or normalize neuronal plasticity in the context of MetS could therefore be a promising way to improve associated cognitive and mood alterations.

There is a growing interest in developing non pharmacological interventions to reduce obesity/MetS and related comorbidities, such as weight loss programs or nutritional

approaches, since their economic cost and side effects are decreased, compared to pharmacological strategies. In that context, nutritional interventions with essential nutrients, which have been shown to impact both systemic (Lehtonen, et al., 2011; Lombardo, et al., 2007) and brain functions (Bazinet and Laye, 2014; Vauzour, et al., 2015), seem to present a promising therapeutic potential in the management of MetS and associated comorbidities. Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosapentaenoic acid (DHA, 22:6n-3), two n-3 PUFAs converted from their precursor  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) (Leonard, et al., 2002) are told as essential fatty acids because they cannot be synthesized *de novo* by mammals and need to be provided through the diet. Several studies already report that ALA and its derivatives EPA and DHA can improve metabolic and inflammatory alterations in patients with MetS and animal models of MetS. Among others, they can decrease body weight, improve glucose metabolism (Bhaswant, et al., 2015; Fedor and Kelley, 2009; Flachs, et al., 2014; Kasbi-Chadli, et al., 2014), and decrease systemic inflammation (Karlsen, et al., 2010; Kolehmainen, et al., 2012; Wang and Huang, 2015) in this context. Similarly, antioxidants, well known to their beneficial effect on oxidative stress (Halliwell and Gutteridge, 1990), can also improve metabolic alterations associated with MetS. Indeed, AO can decrease body weight and glycemic alterations in obese patients (Lehtonen, et al., 2011; Ruel, et al., 2013; Stull, et al., 2010; Wilson, et al., 2010; Wilson, et al., 2008). Moreover, dietary AO such as polyphenols display potent anti-inflammatory properties (Accomando, et al., 2010). Interestingly, abundant data also suggest that both n-3 PUFAs and antioxidants (AO) improve mood and/or cognitive alterations reported in other chronic inflammatory conditions (Bazinet and Laye, 2014; Vauzour, et al., 2015). Importantly, n-3 PUFAs are crucial to normal brain development and function (Hadley, et al., 2009; Innis, 2008). For instance, a dietary supplementation in EPA and DHA in aged mice restores spatial memory performances in the Morris water maze task (Labrousse, et al., 2012). This cognitive benefit is associated with an improvement of the over-activation of the neuronal activity marker *c-fos* in the hippocampus. In addition, EPA/DHA supplementation in students during a stress period of exams decreases their anxious symptomatology (Kiecolt-Glaser, et al., 2011). Dietary EPA/DHA supplementation also prevents anxiety-like behaviors induced by a chronic social defeat stress in mice (Larrieu, et al., 2014). AO may also be protective against behavioral alterations reported in inflammatory diseases. Interestingly, polyphenols from grape and blueberry prevent aged-associated spatial memory deficits in mice and increase hippocampal mRNA expression of genes involved in neuronal plasticity (Bensalem, et al., 2016). AO also

improved spatial learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease (Jia, et al., 2013). Interestingly, this was associated with decreased hippocampal insulin resistance (Jia, et al., 2013), which has been reported to be involved in cognitive deficits in Alzheimer's disease (Bedse, et al., 2015), but also in animal models of obesity (Biessels and Reagan, 2015). In addition, vitamin E decreased depressive-like behaviors in a mouse model of TNF- $\alpha$ -induced depression (Manosso, et al., 2013). Although the effect of these nutrients on mood and cognition remains understudied in the context of MetS, some recent data suggest they may constitute an efficient strategy. For instance, depressive symptoms in patients with MetS are negatively correlated to n-3 PUFAs plasma levels (Chalut-Carpentier, et al., 2015). Moreover, the consumption of the AO curcumin improves anxious symptoms in patients with MetS (Esmaily, et al., 2015). Finally, dietary supplementation with the polyphenol luteolin improves spatial memory, neuroinflammation and plasticity in obese mice fed with high-fat diet (Liu, et al., 2014). To our knowledge, the impact of a combination of n-3 PUFAs and AO on metabolic and behavioral alterations associated with obesity has never been assessed. Taken together, these findings suggest that both n-3 PUFAs and AO may have a positive impact on mood and cognition in MetS. However, this hypothesis remains to be tested and the underlying mechanisms identified.

In this study, we assessed the effect of a diet enriched in a combination of n-3 PUFAs and AO on metabolic and behavioral alterations displayed by a genetic mouse model of MetS, the *db/db* mouse. Moreover, we investigated the potential underlying neurobiological mechanisms by measuring the consequences of this intervention on brain systems known to be involved in the regulation of mood and cognition. The *db/db* mice, which display classical features of MetS (including obesity, insulin resistance and hyperglycemia) because of a spontaneous mutation inactivating the leptin receptor, are notably suitable in the context of this study. Indeed, their metabolic alterations have been associated with mood and cognitive alterations, along with increased inflammation (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Erion, et al., 2014) and decreased neuronal plasticity in the hippocampus (Erion, et al., 2014; Stranahan, et al., 2008). Hence, this model allows assessing the effect of dietary n-3 PUFAs/AO supplementation on MetS-related metabolic alterations, but also on associated behavioral alterations and their potential underlying neurobiological mechanisms, in particular hippocampal inflammation and neuronal plasticity. We showed here that dietary supplementation with n-3 PUFAs/AO slightly improved metabolism, but did not restore spatial memory performances in *db/db* mice. Moreover, we provided interesting evidence pointing to

the involvement of changes in neuronal plasticity-associated protein expression in the reported cognitive improvement.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Animals and Diets

All animals experiments were conducted according to the relevant French (Directive 87/148, Ministère de l’Agriculture et de la Pêche) and international (Directive 2010/63, European Community) legislation. They adhered to protocols approved by the Animal Care and Use Committee from Bordeaux University (approval ID: 5012047-A). Every effort was made to minimize suffering and the number of animal used. Five weeks old male *db/db* (C57BLKS/J-leprdb/leprdb; n=25) and *db/+* (C57BLKS/Jleprdb/+; n=24) mice (Charles River Laboratories, France) were housed individually in an air-conditioned ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) animal-keeping room under a normal 12-h light:dark cycle, with food and water available *ad libitum* (unless otherwise noted). On arrival, mice were randomly allocated to Control Diet group (CD) or Enriched Diet group (ED) (see table 1 for detailed composition). Body weight, food intake, and water intake were measured once a week over a 12-week period. Mice were handled for a few minutes daily for 3 days before the experiment onset to minimize stress reactions to manipulation. They were 10 to 15 week-old at the time of behavioral assessments. Sacrifice occurred after 13 weeks of diet exposure.

**Table 1.** Composition of Control Diet (CD) and Enriched Diet (ED)

	<b>CD</b>	<b>ED</b>
Protein content	20 %	20 %
Carbohydrate content	62 %	62 %
Mineral and vitamins	6 %	6 %
Lipid content	12 %	12 %
Linoleic acid (LA) 18:2 n-6	10 %	14 %
a-linolenic acid (ALA) 18:3 n-3	0.15 %	6 %
LA/ALA	68	2
Total tocopherols	/	1700 mg/kg oil
Coenzyme Q10	/	300 mg/kg oil
Canolol	/	600 mg/kg oil

## **2.2. Behavioral measures**

Experiments were performed in the morning under conditions of dim light and low noise, with a one-week interval between tests. All testing sessions were recorded with a Panlab SMART video tracking system. Testing equipments were thoroughly cleaned between each session.

### **2.2.1. Light/dark box (L/D box).**

The L/D box test was used to evaluate anxiety-like behaviors. This test is based on the innate aversion of rodents for illuminated areas and on their spontaneous exploratory behavior in response to mild stressors, that is, novel environment and light. The apparatus consisted of two plexiglass chambers: a first one small and dark (14 x 21 x 21 cm) and a second one large and light (30 x 21 x 21 cm). Both chambers were connected by a 7 x 5 cm opening. As previously described (Fernandez de Cossio, et al., 2016), each mouse was placed individually in the dark chamber and recordings were made over a 10-min period. A reduction of the time spent in the light chamber was considered as an anxiety-like index.

### **2.2.2. Elevated plus maze (EPM).**

The EPM test was used to assess anxiety-like behaviors. The apparatus consisted of a plus shaped acryl maze with two opposing open arms (30 x 8 x 15 cm) connected by a central platform (8 x 8 cm) and elevated 120 cm above the floor. Each mouse was placed individually in the center of the EPM over a 10-min period and the number of arm entries and the percent of time spent in open arms were recorded. A reduction of the percent of time spent in the open arms was considered as an anxiety-like index.

### **2.2.3. Open field (OF).**

Open field test was used to assess anxiety-like behavior. The apparatus consisted of a square area (40 x 40 cm) from which escape is prevented by surrounding walls (16 cm high). The square area was virtually divided into a central area and the periphery defined as the rest of the apparatus. Each mouse was placed randomly in one of the corner of the apparatus and allowed to freely explore the OF for 10 min. The number of entries and the percent of time spent in the central area were recorded. A reduction of the percent of time spent and number of entries in the central area was considered as an anxiety-like index.



#### 2.2.4. Morris water maze.

Spatial learning and memory were assessed in a Morris water maze as previously described (Bensalem, et al., 2016). Briefly, mice were first submitted to two familiarization days to familiarize with swimming and to avoid jumping during training. Then, they were tested in a cued task to evaluate potential visuo-motor deficits. Mice were then trained to locate the submerged platform by using distal extra-maze cues with six trials per day for 4 consecutive days. Latency and distance to find the platform were analyzed by Imetronics videotrack system (France). Spatial memory was evaluated 72 h after the last training session, after the platform was removed, by the percentage of time spent swimming in the quadrant where the platform was located during training (target quadrant) using the Panlab SMART system (Bioseb, France). Day 1 path lengths were not included in the analysis because too many mice did not reach the platform before the 90 s cut-off and this had an impact on path length since *db/db* mice travelled less distance during the 90 s.

#### 2.3. Glucose tolerance test

A glucose tolerance test was performed after 11 weeks of diet consumption in overnight food-deprived mice, as previously described (Fernandez de Cossio, et al., 2016). Fasting glycaemia was measured before an intraperitoneal (ip) injection of glucose (2 g/kg prepared in NaCl solution), and 15, 30 and 120 min after. A small drop of blood was collected through an incision to the tail and glucose level was immediately measured with a glucometer at each time point (Accu-Check, Roche Diagnostic). Food was returned just after the last blood glucose measurement.

#### 2.4. Insulin sensitivity test

The insulin sensitivity test was performed after 11 weeks of diet consumption, as previously described in *ad libitum* fed mice (Fernandez de Cossio, et al., 2016). Glucose was measured before an ip injection of insulin (0.75 UI/kg, Glargine, Lantus), and after 15, 30, 60 and 120 min, as described for the glucose tolerance test.

#### 2.5. Tissue sampling

After 13 weeks of diet consumption, mice were anesthetized by isoflurane inhalation. Blood samples were immediately collected through cardiac puncture into citrate-treated tubes. After centrifugation (10 min, 1000 g, 4 °C), aliquots of plasma were stored at -80 °C for further analysis. Mice were transcardially perfused with cold PBS (pH 7.4) to remove all

traces of blood from tissues. Livers were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for western blot and qPCR analysis. Brains were rapidly extracted from the skull and the two hemispheres were separated. The right hemisphere was immersed into a 4 % paraformaldehyde fixative solution (prepared in PBS, pH 7.4) for 3 weeks and in a sucrose solution for 1 week before being sliced in 50  $\mu\text{m}$  sections on a vibratome (Leica). Brain slices were then stored in a freezing solution at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further immunochemistry labelling. The left hemisphere was rapidly dissected and the hippocampus and the cerebral cortex were removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

## **2.6. Multiplex assays**

As previously described, plasma adiponectin, insulin, resistin, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 and IFN- $\gamma$  were measured with the Mouse Cytokine/Chemokine and the Mouse Metabolic Hormone magnetic bead panel multiplex assays (Millipore, France) following manufacturer's instructions (Dinel, et al., 2011).

## **2.7. Measurement of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)**

The measurement of TBARS is a well-established method to assess lipid peroxidation, an indicator of oxidative stress in tissues. It is based on the formation of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. The measurement of TBARS was done using a commercially available TBARS Assay Kit (10009055; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), according to the manufacturer's instructions.

## **2.8. Plasma fatty acid and AO content**

Total lipids were extracted from plasma and its fatty acid composition was determined as previously described (Letondor, et al., 2014). CoQ10 and  $\alpha$ -tocopherol levels were assessed by HPLC according to the method previously described (Kume, et al., 2016; Smith, et al., 2006).

## **2.9. Brain fatty acids content**

Analysis of fatty acid levels in brain lipids was carried out in the cortex in order to minimize the number of animals (the same mice were used for western blots, qPCR and immunostaining in the hippocampus). Previous studies have however shown that fatty acid content in the hippocampus and in the cortex changed in similar ways following dietary n-3 PUFAs deficiency or supplementation (Marteinsdottir, et al., 1998). Fatty acids composition

from the cortex was analyzed as previously described (Labrousse, et al., 2012), and was expressed as the percentage of total fatty acids.

### **2.10. Plasma triglyceride levels**

Plasma levels of triglycerides were determined using a colorimetric enzymatic assay following manufacturer's instructions (Triglyceride PAP 150™ kits, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The lower limit of detection was 0.17 g/L.

### **2.11. RNA and protein extraction**

Total RNA was extracted from hippocampi and livers using Trizol. The below phase contained DNA and proteins. After DNA removal, proteins were purified in denaturing conditions.

### **2.12. RT-qPCR**

RNA purity and concentration were determined using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies, Wilmington, DE) and reverse-transcribed as previously described (Fernandez de Cossio, et al., 2016). Real-time qPCR for cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10) and proteins involved in glucose metabolism (PEPPCK, G6P, GLUT2) was performed using Taqman gene expression assays for sequence-specific primers purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA) as previously described (Fernandez et al., 2016; Dinel et al., 2011; 2014). To measure expression of liver PPAR and GLUT4, quantitative PCR was performed using SYBR<sup>®</sup> Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) following the protocol previously described (Fernandez de Cossio, et al., 2016; Madore, et al., 2014). Primers sequences were designed using Primer Express<sup>®</sup> Software (GLUT4 5'-3'F: TCCCTTCAGTTTGGCTATAACATTG, 5'-3'R: CTACCCAGCCACGTTGCATT; PPAR $\gamma$  5'-3'F: CACAATGCCATCAGGTTTGG, 5'-3'R: GTCGGTCGATATCACTGGAGA;  $\beta$ 2m 5'-3'F: CTGATACATACGCCTGCAGAGTTAA, 5'-3'R: GATCACATGTCTCGATCCCAGTAG). Fluorescence was determined on an ABI PRISM 7500-sequence detection system (Applied Biosystems, Foster, CA). The calculation of relative expression levels was performed according to the methods of Schmittgen & Livak (2008) and plotted as fold change relative to the appropriate control condition.

### **2.13. Western Blot analysis**

Protein concentration was assessed by bicinchoninic acid assay (Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of protein

(25µg) were loaded and separated on SDS-polyacrylamide gels (8% or 10%) and transferred onto polyvinyl difluoride membranes (Millipore). Membranes were saturated with a blocking solution containing 5 % non fat dried milk and 0.05 % Tween-20, and incubated overnight in a solution containing 5% BSA with the primary antibodies listed in Table 2. After washing, membranes were incubated 1 h with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000, Jackson Immuno Research laboratories, Westgrove, PA, USA). The blots were developed using Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA). Chemiluminescence was captured by a ChemiDoc detection system and quantified by Image Lab software. Between each revelation, membranes were incubated for 15 min in Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) in order to erase the previous antibody.

**Table 2.** Antibodies used for western blots

Protein	Molecular weight (kDa)	Commercial designation	Dilution used
GAPDH	38	#5174 (cell signaling)	1/5000
p38	38	#9212 (cell signaling)	1/1000
Phospho-p38	38	#4511 (cell signaling)	1/500
p44/42	44/42	#9102 (cell signaling)	1/1000
Phospho-p44/42	44/42	#9101 (cell signaling)	1/500
STAT3	79/86	#4904 (cell signaling)	1/1000
Phospho-STAT3	79/86	# 9145 (cell signaling)	1/500
GluR1	106	sc-55509 (santa cruz)	1/1000
GluR2	100	sc-7611-R (santa cruz)	1/1000
GluN1	115	sc-9058 (santa cruz)	1/1000
GluN2A	177	sc-1468 (santa cruz)	1/1000
GluN2B	178	sc-1469 (santa cruz)	1/1000

#### **2.14. Immunohistochemistry**

Adult neurogenesis was examined by immunolabeling for doublecortin (Dcx), a marker of newborn immature neurons, using anti-DCX antibody (1:1000) (goat monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and a biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1:200) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA, USA), as previously described (Touyarot, et al., 2013).

#### **2.15. Data analysis**

Results are presented as mean ± SEM and were analyzed using a two-way ANOVA (genotype x diet) followed by a Bonferroni post-hoc test when appropriate. Probe test comparisons of each group with chance level have been performed with a one sample t-test.

Spatial learning analysis was analyzed using a 3-way ANOVA with repeated measures (genotype x diet x days) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test.

### 3. RESULTS

#### 3.1. ED slightly improved glycemc regulation in db/db mice

MetS-related metabolic alterations can be reduced by both n-3 PUFAs and AO (Anhe, et al., 2015). The effects of ED on metabolic parameters are presented in Table 3. In agreement with our previous findings (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Fernandez de Cossio, et al., 2016), *db/db* mice gained significantly more weight (genotype:  $F_{(1,44)}=17.62$ ;  $p<0.001$ ), ate (genotype:  $F_{(1,44)}=504.7$ ;  $p<0.001$ ) and drank (genotype:  $F_{(1,44)}=359.6$ ;  $p<0.001$ ) more than *db/+* mice during the entire experiment, whatever their diet.

Altered plasma levels of adiponectin (genotype:  $F_{(1,32)}=17.70$ ;  $p<0.001$ ), insulin (genotype:  $F_{(1,33)}=10.66$ ;  $p<0.01$ ), and triglycerides (genotype:  $F_{(1,42)}=11.74$ ;  $p<0.01$ , table 3) found in *db/db* mice compared to *db/+* mice were not normalized by ED. On the contrary, statistical analysis revealed a significant interaction between genotype and diet for plasma resistin levels (genotype x diet:  $F_{(1,34)}=4.618$ ;  $p<0.05$ ). Whereas plasma resistin levels were decreased in CD *db/db* mice in comparison to CD *db/+* mice, this was not anymore the case when mice were fed with the ED. Indeed, resistin levels were similar between CD *db/db* and ED *db/db* mice. Interestingly, ED improved decreased insulin levels in *db/db* mice since resistin levels were in between CD *db/+* mice and CD *db/db* mice. Systemic inflammation was not observed in *db/db* mice since IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 were undetectable in both genotype, whatever the diet (data not shown). Finally, increased oxidative stress displayed by *db/db* mice, and revealed by increased plasma levels of MDA (genotype:  $F_{(1,34)}=169.2$ ;  $p<0.001$ ) tended to be improved by ED (diet:  $F_{(1,34)}=3.655$ ;  $p=0.06$ ).

As *db/db* mice are known to display glycemc dysregulations, we also assessed the impact of ED on basal blood glucose levels in both fasted and fed conditions, and during glucose tolerance and insulin resistance tests. As previously described (Fernandez de Cossio, et al., 2016), *db/db* mice exhibited higher basal fasted (genotype:  $F_{(1,43)}=88.17$ ;  $p<0.001$ ) and fed (genotype:  $F_{(1,42)}=595.6$ ,  $p<0.001$ ) blood glucose levels, when compared to *db/+* mice (table 3). Whereas ED failed to improve blood glucose levels in fasted conditions, it significantly improved basal glycaemia in fed conditions (diet:  $F_{(1,42)}=4.223$ ,  $p<0.05$ ).

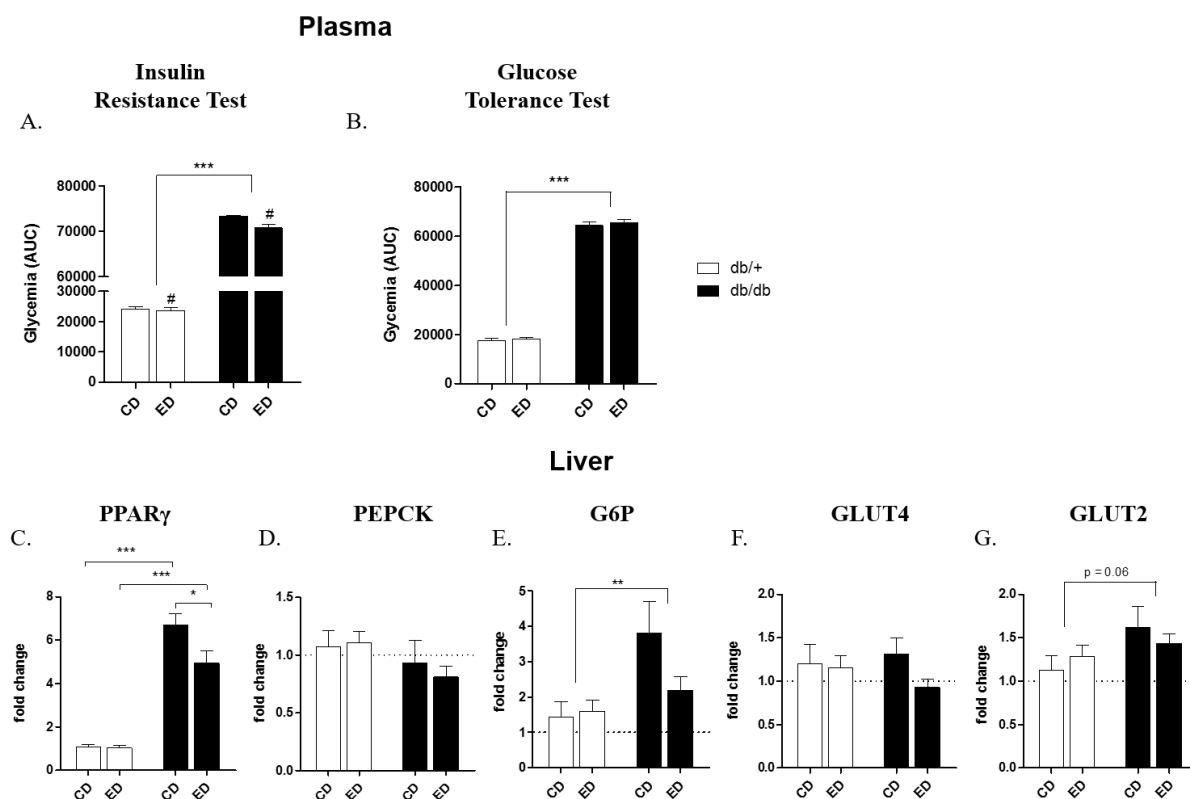
Similarly, ED significantly improved insulin sensitivity (diet:  $F_{(1,42)}=4.043$ ;  $p=0.05$ ; Fig. 1A), in particular in *db/db* mice, which displayed decreased insulin sensitivity in comparison to *db/+* mice, as observed with the increased area under the curve (genotype:  $F_{(1,42)}=4220$ ;  $p<0.001$ ). However, decreased glucose tolerance displayed by *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,42)}=1808$ ;  $p<0.001$ ) was not improved by ED (Fig. 1B).

**Table 3.** Effect of ED on body weight gain, food and water intake, glycemia, plasma triglycerides, metabolic hormones and MDA (n=11-13/group. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ . When interaction, \*\* $p<0.01$  vs CD *db/+*).

	<i>db/+</i>		<i>db/db</i>		Statistics		
	CD	ED	CD	ED	Genotype effect	Diet effect	Interaction
	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM			
Total body weight gain (g)	7.81 $\pm$ 0.39	7.57 $\pm$ 0.18	11.84 $\pm$ 1.65	14.55 $\pm$ 1.83	***		
Cumulative water intake (mL)	322.50 $\pm$ 16.46	288.60 $\pm$ 8.54	2316.00 $\pm$ 127.50	2296.00 $\pm$ 153.30	***		
Cumulative food intake (g)	311.00 $\pm$ 5.28	302.90 $\pm$ 4.83	584.30 $\pm$ 16.89	616.90 $\pm$ 17.17	***		
Fasted glycemia (mg/dL)	95.50 $\pm$ 6.50	92.82 $\pm$ 4.59	338.80 $\pm$ 37.55	334.20 $\pm$ 33.19	***		
Fed glycemia (mg/dL)	180.20 $\pm$ 8.83	167.00 $\pm$ 8.06	574.40 $\pm$ 15.08	524.30 $\pm$ 23.32	***	*	
Plasma triglycerides (mmol/L)	3.49 $\pm$ 0.35	3.43 $\pm$ 0.30	5.99 $\pm$ 0.78	5.02 $\pm$ 0.76	**		
Plasma adiponectine ( $\mu$ g/mL)	10.89 $\pm$ 0.56	9.04 $\pm$ 0.61	6.72 $\pm$ 0.86	7.36 $\pm$ 0.72	***		
Plasma insulin (ng/mL)	0.98 $\pm$ 0.26	1.13 $\pm$ 0.24	1.84 $\pm$ 0.21	2.20 $\pm$ 0.43	**		
Plasma resistin (ng/mL)	8.17 $\pm$ 0.41	6.57 $\pm$ 0.75	5.57 $\pm$ 0.75**	7.49 $\pm$ 1.12			*
MDA ( $\mu$ M)	27.03 $\pm$ 1.641	30.13 $\pm$ 1.585	82.41 $\pm$ 8.199	97.32 $\pm$ 4.58	***	p = 0.06	

Because the liver is a key organ in the regulation of glycemic control (Rines, et al., 2016), mRNA expression of genes associated with glucose control was assessed. Statistical analyses revealed an interaction between genotype and diet on PPAR $\gamma$  mRNA expression (genotype x diet:  $F_{(1,39)}=4.626$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 1C). Indeed, it was increased in CD *db/db* mice in comparison to CD *db/+* mice ( $t_{(19)}=10.72$ ;  $p<0.001$ ). Interestingly, ED decreased PPAR $\gamma$  mRNA levels in *db/db* mice in comparison to CD *db/db* mice ( $t_{(19)}=2.217$ ;  $p<0.05$ ). mRNA expression of PEPCK, the enzyme catalyzing the first step of neoglucogenesis, was not changed by the genotype and the diet (Fig. 1D). On the contrary, the mRNA expression of G6Pase, the enzyme which catalyzes the last step of neoglucogenesis, was increased in *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,35)}=7.698$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 1E). Interestingly, statistical analysis revealed a slight tendency to an interaction between genotype and diet ( $F_{(1,32)}=2.786$ ;  $p=0.10$ ), ED tending to decrease G6P mRNA expression in *db/db* mice ( $t_{(17)}=1.714$ ;  $p=0.10$ ). We also assessed the liver mRNA expression of glucose transporters GLUT2 and GLUT4. There was no significant diet or genotype effect on GLUT4 mRNA expression (Fig. 1F), although ED tended to decrease this expression in *db/db* mice ( $t_{(21)}=1.794$ ;  $p=0.09$ ). Finally, GLUT2 mRNA expression tended to be increased in the liver of *db/db* mice in comparison to *db/+*

mice (genotype:  $F_{(1,38)}=3.629$ ;  $p=0.06$ ; Fig. 1G), regardless the diet. Taken together, these data suggest that ED-induced improvement of hepatic glucose metabolism may contribute to decrease insulin resistance in *db/db*.



**Figure 1.** Effect of ED on glucose homeostasis. A) Area under the curve (AUC) of plasma glucose response to ip insulin injection during insulin resistance test. B) AUC of plasma glucose response to glucose injection during glucose tolerance test. C-G) Hepatic mRNA expression of PPAR $\gamma$ , PEPCK, G6P, GLUT4 and GLUT2. (n=11-13/group. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  genotype effect; # $p<0.05$  diet effect. When interaction \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ;  $p<0.001$ )

**Table 4.** Effect of ED on plasma fatty acid composition (n=6-7/group. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ . When interaction, # $p<0.05$ ; ### $p<0.001$  vs CD same genotype; \* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$  vs *db/+* same diet).

	<i>db/+</i>		<i>db/db</i>		Statistics		
	CD Mean $\pm$ SD	ED Mean $\pm$ SD	CD Mean $\pm$ SD	ED Mean $\pm$ SD	Genotype effect	Diet effect	Interaction
<i>Fatty acids</i>							
SFA	33.085 $\pm$ 1.772	32.864 $\pm$ 2.157	33.262 $\pm$ 0.666	31.065 $\pm$ 0.733		*	
MUFAs	32.942 $\pm$ 2.214	29.898 $\pm$ 2.575	26.613 $\pm$ 3.127	25.145 $\pm$ 2.179	***	*	
18:2 n-6	18.32 $\pm$ 1.09	19.84 $\pm$ 1.04	21.94 $\pm$ 2.32	24.926 $\pm$ 1.56	***	***	
20:2 n-6	0.12 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02	0.101 $\pm$ 0.02	***	**	
20:3 n-6	1.68 $\pm$ 0.22	1.67 $\pm$ 0.37	1.57 $\pm$ 0.19	1.747 $\pm$ 0.51			
20:4 n-6	9.22 $\pm$ 1.39	8.03 $\pm$ 1.72	12.80 $\pm$ 2.32	9.865 $\pm$ 2.05	**	*	
22:4 n-6	0.14 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.04	0.080 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>		***	**
22:5 n-6	0.59 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>###</sup>	0.22 $\pm$ 0.08 <sup>****</sup>	0.040 $\pm$ 0.01 <sup>###****</sup>	***	***	***
n-6	30.312 $\pm$ 2.598	30.191 $\pm$ 2.799	37.079 $\pm$ 3.218	37.006 $\pm$ 2.235	***		
20:5 n-3 (EPA)	0.18 $\pm$ 0.29	0.95 $\pm$ 0.33	0.17 $\pm$ 0.13	1.248 $\pm$ 0.32		***	
22:5 n-3	0.09 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.06 <sup>###</sup>	0.20 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>	0.597 $\pm$ 0.04 <sup>###****</sup>	***	***	**
22:6 n-3 (DHA)	1.06 $\pm$ 0.81	4.12 $\pm$ 1.04 <sup>###</sup>	1.94 $\pm$ 0.23 <sup>*</sup>	3.757 $\pm$ 0.24 <sup>###</sup>		***	*
n-3	1.443 $\pm$ 1.279	5.869 $\pm$ 1.220	2.432 $\pm$ 0.439	6.343 $\pm$ 0.206	*	***	
n-6/n-3	28.231 $\pm$ 9.847	5.270 $\pm$ 0.799	15.637 $\pm$ 2.754	5.831 $\pm$ 0.256	**	***	**
20:3 n-9	1.51 $\pm$ 0.29	0.57 $\pm$ 0.19 <sup>###</sup>	0.22 $\pm$ 0.09 <sup>****</sup>	0.135 $\pm$ 0.06 <sup>###****</sup>	***	***	***
PUFAs	33.324 $\pm$ 3.601	36.673 $\pm$ 3.959	39.745 $\pm$ 3.229	43.489 $\pm$ 2.423	***	*	

To confirm that ED has increase plasma n-3 PUFAs and AO levels, we have measured the concentration of these nutrients in the plasma. Surprisingly, n-3 PUFAs levels were higher in the plasma of *db/db* mice when compared to *db/+* mice (genotype  $F(1,22)=4.458$ ;  $p<0.05$ , Table 4). This can be explained by the increased level of total fatty acids in *db/db* mice (genotype  $F(1,22)=5.805$ ;  $p<0.05$ , data not shown). As expected, chronic ED consumption for 13 weeks increased plasma n-3 PUFAs content in both *db/+* and *db/db* mice (diet:  $F(1,22)=145$ ;  $p<0.001$ ). More specifically, ED increased plasma EPA content in both genotypes (diet:  $F(1,22)=78.46$ ;  $p<0.001$ ). On the contrary, there was a significant interaction between genotype and diet for plasma DHA levels (genotype x diet:  $F(1,22)=5,884$ ;  $p<0.05$ ). Indeed, they were increased in CD *db/db* mice when compared to CD *db/+* mice ( $t_{(11)}=2.746$ ;  $p<0.05$ ), and ED increased DHA content in both genotype (CD *db/+* vs. ED *db/db*:  $t_{(10)}=5.670$ ;  $p<0.001$ ; CD *db/db* mice vs. ED *db/db*:  $t_{(12)}=15,07$ ;  $p<0.001$ ). Because n-3 PUFAs are highly incorporated within the brain (Wainwright, 2002), brain fatty acid content has been assessed in the cortex (Table 5). A significant genotype by diet interaction appeared for n-3 PUFAs content in the cerebral cortex (genotype x diet:  $F(1,20)=19.08$ ;  $p<0.001$ ). Post-hoc analysis showed that n-3 PUFAs levels were increased in the brain of CD *db/db* mice in comparison to CD *db/+* mice ( $t_{(10)}=9.796$ ;  $p<0.001$ ). ED increased n-3 PUFAs levels in both *db/+* and *db/db* mice (diet effect:  $F(1,20)=104.0$ ; CD *db/+* vs. ED *db/+*:  $t_{(10)}=5.531$ ; ED *db/db* vs. ED *db/db*:  $t_{(10)}=8.572$ ). Regarding AO (Table 6), analysis showed that *db/db* mice displayed increased plasma levels of CoQ10-one (genotype:  $F(1,17)=225.6$ ;  $p<0.001$ ), total CoQ10 (genotype:  $F(1,18)=199.1$ ;  $p<0.001$ ) and  $\alpha$ -tocopherol (genotype:  $F(1,20)=27.69$ ;  $p<0.001$ ) when compared to *db/+* mice. ED increased plasma  $\alpha$ -tocopherol levels (diet:  $F(1,20)=8.789$ ;  $p<0.01$ ); however, it was difficult to conclude about its effect on CoQ10 levels because of the high intra-group variability.

To conclude, ED slightly improved glycemic dysregulation in the liver of *db/db* mice, as well as their insulin resistance. Moreover, ED increased plasma n-3 PUFAs and  $\alpha$ -tocopherol, and brain n-3 PUFAs in both *db/+* and *db/db* mice.



**Table 5.** Effect of ED on brain fatty acid composition (n=6/group. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001. When interaction, #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 vs CD same genotype; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs db/+ same diet).

	<i>db/+</i>		<i>db/db</i>		Statistics		
	CD Mean ± SD	ED Mean ± SD	CD Mean ± SD	ED Mean ± SD	Genotype effect	Diet effect	Interaction
<i>Fatty acids</i>							
<b>SFA</b>	<b>44.0 ± 0.15</b>	<b>43.9 ± 0.22</b>	<b>44.6 ± 0.10</b>	<b>44.6 ± 0.14</b>	***		
<b>MUFAs</b>	<b>20.9 ± 0.26</b>	<b>21.1 ± 0.15</b>	<b>19.7 ± 0.17</b>	<b>19.6 ± 0.14</b>	***		
18:2 n-6	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.03	***	***	
20:2 n-6	0.1 ± 0.002	0.1 ± 0.002	0.1 ± 0.006	0.1 ± 0.007	***	***	
20:3 n-6	0.2 ± 0.003	0.4 ± 0.004###	0.3 ± 0.01***	0.4 ± 0.004###	***	***	***
20:4 n-6	8.5 ± 0.11	7.8 ± 0.07	8.5 ± 0.07	8.1 ± 0.06		***	
22:4 n-6	2.4 ± 0.03	2.0 ± 0.03	2.3 ± 0.03	2.3 ± 0.03		***	
22:5 n-6	1.4 ± 0.04	0.3 ± 0.01###	0.4 ± 0.01***	0.2 ± 0.04####	***	***	***
<b>n-6</b>	<b>13 ± 0.17</b>	<b>11 ± 0.12</b>	<b>12.3 ± 0.12</b>	<b>11.5 ± 0.1</b>		***	***
20:5 n-3 (EPA)	0.07 ± 0.004	0.07 ± 0.002	0.06 ± 0.003	0.05 ± 0.007	***		
22:5 n-3	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.02	***	***	
22:6 n-3 (DHA)	13.2 ± 0.21	15.1 ± 0.15###	15.1 ± 0.14***	15.8 ± 0.07###	***	***	***
<b>n-3</b>	<b>13.4 ± 0.19</b>	<b>15.4 ± 0.14###</b>	<b>15.3 ± 0.14***</b>	<b>16.2 ± 0.06###</b>	***	***	***
<b>n-6/n-3</b>	<b>0.97 ± 0.007</b>	<b>0.71 ± 0.004###</b>	<b>0.80 ± 0.014***</b>	<b>0.71 ± 0.005###</b>	***	***	***
20:3 n-9	0.2 ± 0.004	0.1 ± 0.002###	0.1 ± 0.003***	0.1 ± 0.003###	***	***	*
<b>PUFAs</b>	<b>26.6 ± 0.35</b>	<b>26.6 ± 0.25</b>	<b>27.8 ± 0.16</b>	<b>27.7 ± 0.14</b>	***		

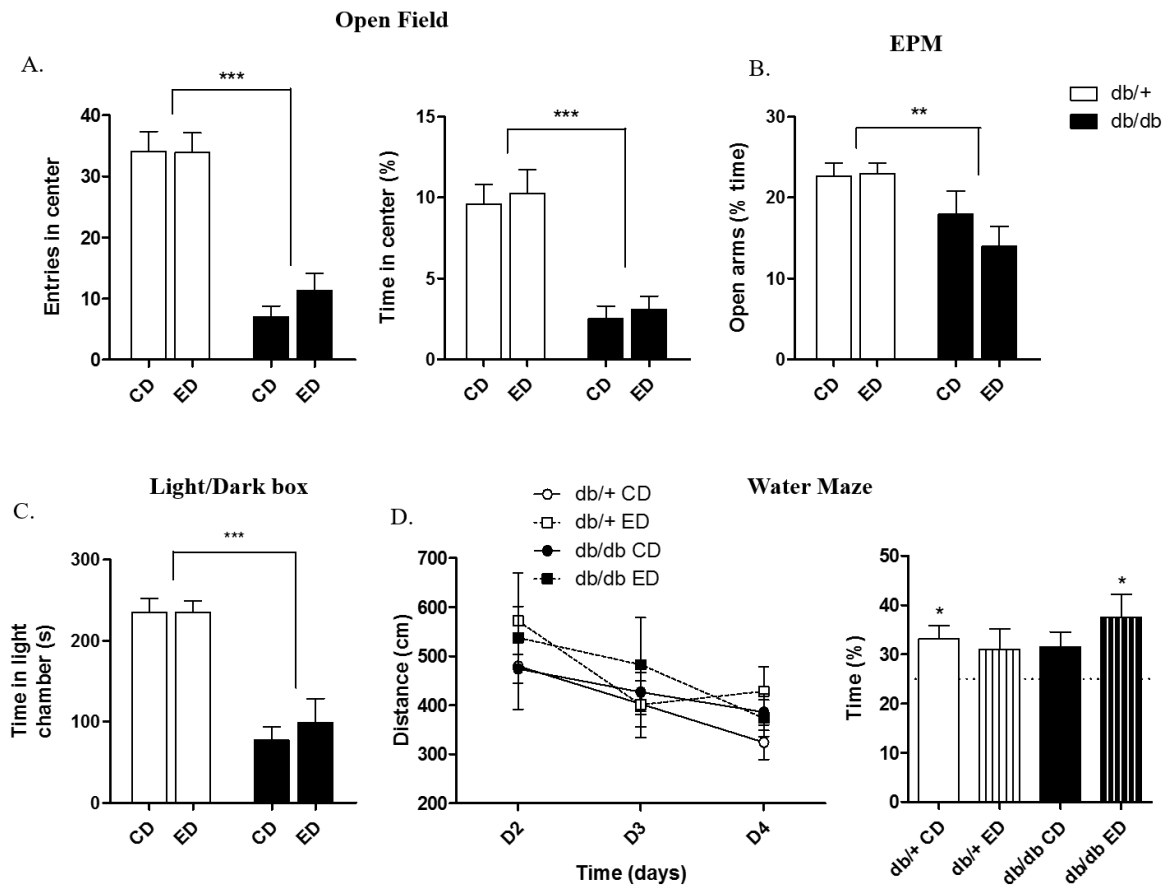
**Table 6.** Effect on ED on CoQ10 and α-tocopherol composition (n=6/group).

	<i>db/+</i>		<i>db/db</i>		Statistics		
	CD Mean ± SD	ED Mean ± SD	CD Mean ± SD	ED Mean ± SD	Genotype effect	Diet effect	Interaction
CoQ10-ol	6.5 ± 4.336	2.537 ± 3.491	3.479 ± 2.936	2.601 ± 2.458		**	
CoQ10-one	30.5 ± 12.359	19.419 ± 5.212	198.507 ± 145.914	173.134 ± 31.726	***		
<b>Total CoQ10</b>	<b>37.0 ± 10.83</b>	<b>21.96 ± 3.79</b>	<b>201.99 ± 147.44</b>	<b>175.735 ± 31.56</b>	***		
<b>α-tocopherol</b>	<b>3.2 ± 0.18</b>	<b>3.83 ± 0.38</b>	<b>4.54 ± 0.59</b>	<b>5.786 ± 1.35</b>	***	**	

### **3.2. ED improved spatial memory deficits, but not anxiety-like behavior in db/db mice**

We and others previously reported increased anxiety-like behavior and altered hippocampus-dependent spatial memory in *db/db* mice (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Erion, et al., 2014; Fernandez de Cossio, et al., 2016; Stranahan, et al., 2008). Based on our previous findings demonstrating a beneficial effect of n-3 PUFAs or AO supplementation on mood (Larrieu, et al., 2014) and cognition (Bensalem, et al., 2016; Delpech, et al., 2015a; Labrousse, et al., 2012), we tested if a n-3 PUFAs/AO ED may similarly improve behavioral alterations displayed by *db/db* mice. Akin with our previous studies, *db/db* mice visited less often (genotype F(1,43)=77.49; p<0.001) and spent less time (genotype F(1,43)=41.95; p<0.001) than *db/+* mice in the anxiogenic central area of the OF, whatever the diet (Fig. 2A). Similarly, when compared to *db/+* mice, all *db/db* mice spent less time in the open arms of the EPM (genotype F(1,42)=9.812; p<0.01; Fig. 2B), and in the light chamber of the L/D box

(genotype  $F(1,44)=47.68$ ;  $p<0.001$ ; Fig. 2C), which are considered as more anxiogenic than the closed arms or the dark chamber, respectively. These results confirmed that *db/db* mice displayed increased anxiety-like behavior in comparison to *db/+* mice. Importantly, ED failed to decrease anxiety-like behavior in these three behavioral tests, whatever the genotype.



**Figure 2.** Effect of ED on anxiety-like behaviors and spatial learning and memory performances. A) Number of entries (left) and percent of time spent (right) in the center of the OF. B) Percent of time spent in the open arms of the EPM. C) Time in the light chamber of the L/D box. D) Spatial learning (left) and memory (right) performances in the water maze test (n=8-13/group \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  genotype effect; for spatial memory, \* $p<0.05$  vs chance level).

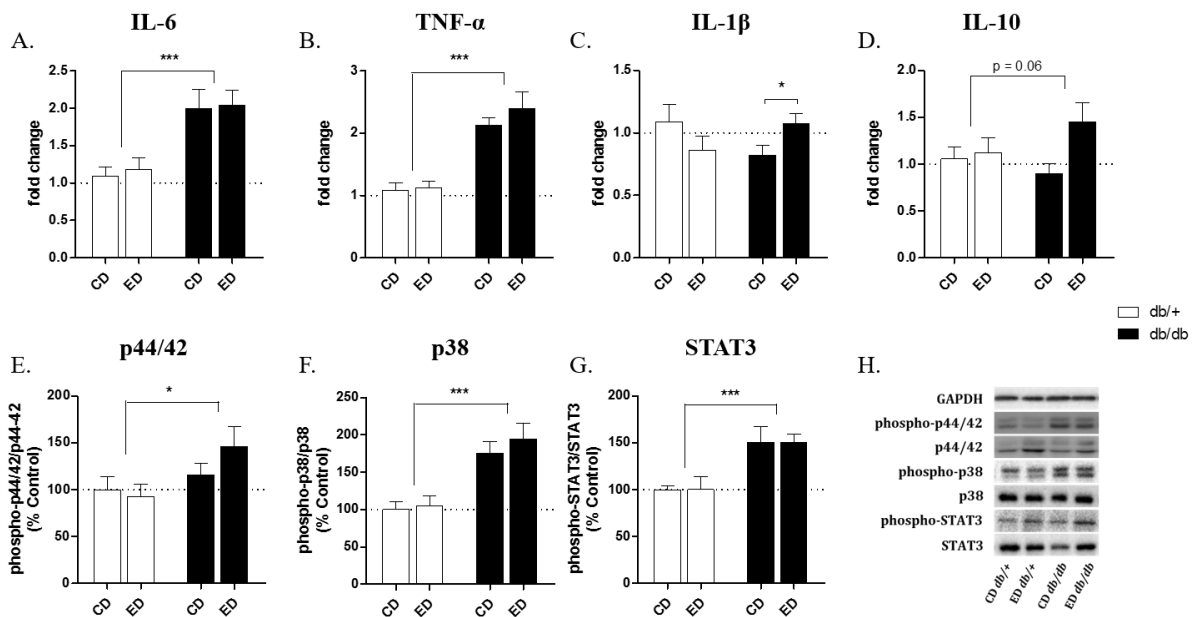
In the MWM task, mice spent the same time swimming (data not shown) and travelled the same distance (data not shown) to reach the platform in the familiarization step and in the cued learning respectively, whatever the genotype and the diet. Swimming speed of *db/db* mice was strongly decreased in comparison to *db/+* mice (genotype  $F(1,28)=307.3$ ,  $p<0.001$ ; data not shown). Hence, we decided to use path length to assess performances during the learning phase. The four groups of mice travelled significantly less distance to reach the platform between day 2 and day 4 (time:  $F(2,56)=4.057$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 2D, left), indicating that

all learned the platform location. Across the days, all mice displayed similar performances to learn this location since path length did not differ between *db/+* and *db/db* mice and between CD and ED. Spatial memory was finally assessed 72 h after the end of the training phase. One sample t-test comparing to the chance level (25 %) revealed that CD *db/db* mice displayed spatial memory deficits since they swam randomly across the four quadrants ( $t_{(7)}=2.057$ ;  $p=0.08$ ; Fig. 2D, right), whereas CD *db/+* mice spent significantly more than 25 % of the time in the target quadrant ( $t_{(6)}=3.011$ ;  $p<0.05$ ). Interestingly, ED *db/db* mice also spent significantly more than 25 % of the time in the target quadrant ( $t_{(6)}=2.693$ ;  $p<0.05$ ), showing that ED improved spatial memory deficits displayed by *db/db* mice. Of note, it decreased spatial memory performances in *db/+* mice since this group swam randomly in the water maze ( $t_{(7)}=1.419$ ;  $p=0.20$ ). Hence, ED improved spatial memory, but not anxiety-like behaviors in *db/db* mice. The next step was then to try identifying the biological mechanisms potentially underlying improvement of Mets-related memory deficits.

### **3.3. ED-induced cognitive improvement was not associated with changes in neuroinflammatory processes in the hippocampus of *db/db* mice**

Inflammatory processes, especially in the hippocampus, participate to the regulation of cognition (Bazinet and Laye, 2014; Delpech, et al., 2015b; Vauzour, et al., 2015) and can be modulated by both n-3 PUFAs (Bazinet and Laye, 2014; Vauzour, et al., 2015) and AO (Accomando, et al., 2010). We therefore assessed the effect of ED on hippocampal inflammation by measuring both local expression of cytokines and activation of their main signaling pathways. As previously described (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Fernandez de Cossio, et al., 2016), hippocampal mRNA expression of proinflammatory cytokines IL-6 (genotype:  $F_{(1,43)}=20.39$ ;  $p<0.001$ , Fig. 3A) and TNF- $\alpha$  (genotype:  $F_{(1,41)}=44.20$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3B) was increased in *db/db* mice when compared to *db/+* mice, regardless the diet. On the contrary, statistical analysis revealed an interaction between genotype and diet for IL-1 $\beta$  mRNA expression (genotype x diet:  $F_{(1,41)}=5.343$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 3C), ED increasing expression of IL-1 $\beta$  mRNA in *db/db* mice to the level of CD *db/+* mice (CD *db/db* vs ED *db/db*:  $t_{(21)}=2.309$ ,  $p<0.05$ ). Interestingly, hippocampal expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 mRNA tended to be increased by ED (diet:  $F_{(1,39)}=3.757$ ;  $p=0.06$ ; Fig. 3D), particularly in *db/db* mice. In agreement with increased hippocampus cytokine expression, levels of phosphorylated p44/42 (genotype:  $F_{(1,39)}=4.235$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 3E) and p38 proteins (genotype:  $F_{(1,37)}=22.38$ ;  $p<0.001$ ; Fig. 3F) were higher in *db/db* than

*db/+* mice, whatever the diet. These proteins belong to MAPK signaling pathways activated by both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , whereas IL-10 and IL-6 rather activate the STAT3 signaling pathway. As expected, STAT3 phosphorylation was also increased in *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,41)}=18.52$ ;  $p<0.001$ ; Fig. 3G) in comparison to *db/+* mice, regardless the diet. Hence, activation of these signaling pathways was increased in the hippocampus of *db/db* mice, in agreement with their local inflammation, but it was not reduced by ED despite its effects on IL-1 $\beta$  and IL-10 mRNA expression.

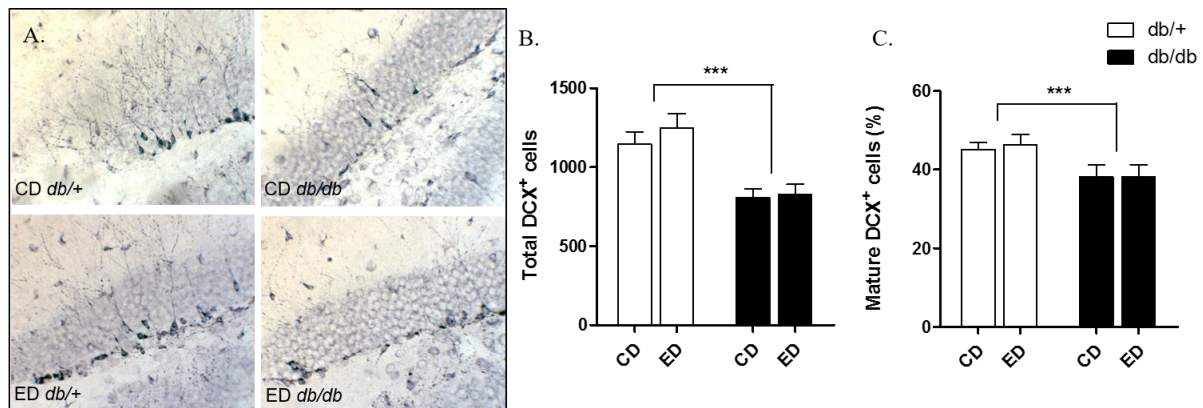


**Figure 3.** Effect of ED on hippocampal inflammatory processes. A-D) Hippocampal mRNA expression of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10. E-G) Phosphorylation levels of p44/42, p38 and STAT3 proteins. H) Blots of GAPDH, phospho-p44/42, p44/42, phospho-p38, p38, phospho-STAT3 and STAT3. (n=11-13/group. \* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$  genotype effect. When interaction, \* $p<0.05$ )

### 3.4. ED did not improve neurogenesis in the DG but altered the composition of AMPA and NMDA receptors within the hippocampus

Deficits or supplementation in n-3 PUFAs and/or AO are known to modulate processes involved in neuronal plasticity, such as neurogenesis (Shukitt-Hale, et al., 2008) or synaptic plasticity (Delpech, et al., 2015a; Lafourcade, et al., 2011). Similarly, ED-induced modulation of these processes may participate to the cognitive improvement reported in ED-fed *db/db* mice. Decreased neurogenesis in the DG of the hippocampus is classically associated with impaired spatial memory (Lieberwirth, et al., 2016), including in *db/db* mice (Fernandez de Cossio, et al., 2016; Stranahan, et al., 2008). We therefore measured whether

ED may improve spatial memory by acting on neurogenesis in the DG. Here, *db/db* mice indeed displayed reduced neurogenesis compared to *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,40)}=25.52$ ;  $p<0.001$ , Fig. 4B). Moreover, among the newborn neurons, the proportion of neurons with ramifications was lower in *db/db* mice than in *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,40)}=7.947$ ;  $p<0.01$ ; Fig. 4C), suggesting that less neurons are involved in a process of maturation. However, both the formation and maturation of newborn neurons were unaffected by ED.

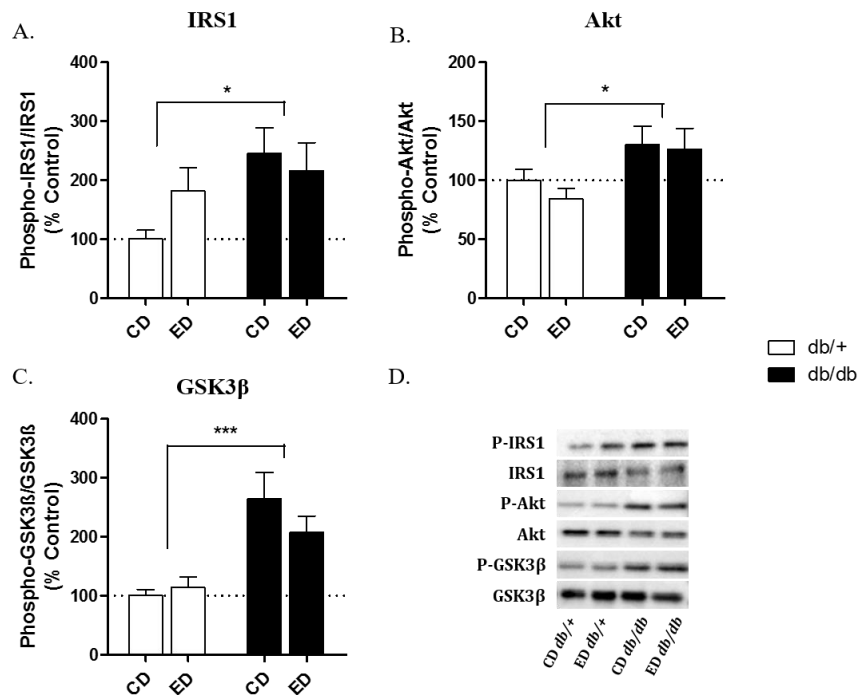


**Figure 4.** Effect of ED on hippocampal neurogenesis. A) DCX staining in the dentate gyrus of mice. B) Total DCX<sup>+</sup> cell. C) DCX<sup>+</sup> cells with ramifications. (n=11-13/group. \*\*\* $p<0.001$  genotype effect)

Numerous studies have highlighted a role of hippocampal insulin resistance in the development of cognitive deficits associated with MetS (Dey, et al., 2014; Nuzzo, et al., 2015; Spolcova, et al., 2014). Although this causal link has not yet been demonstrated in *db/db* mice, they did display impaired insulin signaling pathway activation in the hippocampus (Dey, et al., 2014), together with memory impairments. We therefore evaluated hippocampal insulin signaling pathway activation in ED-fed mice by measuring the phosphorylation levels of the three main proteins of this pathway, namely IRS-1, Akt, and GSK3 $\beta$ . As anticipated, *db/db* mice displayed higher phosphorylation levels of IRS-1 (genotype:  $F_{(1,35)}=5.238$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 5A), Akt (genotype:  $F_{(1,40)}=6.649$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 5B) and GSK3 $\beta$  (genotype :  $F_{(1,38)}=23.61$ ;  $p<0.001$ ; Fig. 5C), but no significant effect of ED was detected, suggesting that its pro-mnesic effect did not involve changes in hippocampal insulin signaling pathway activation.

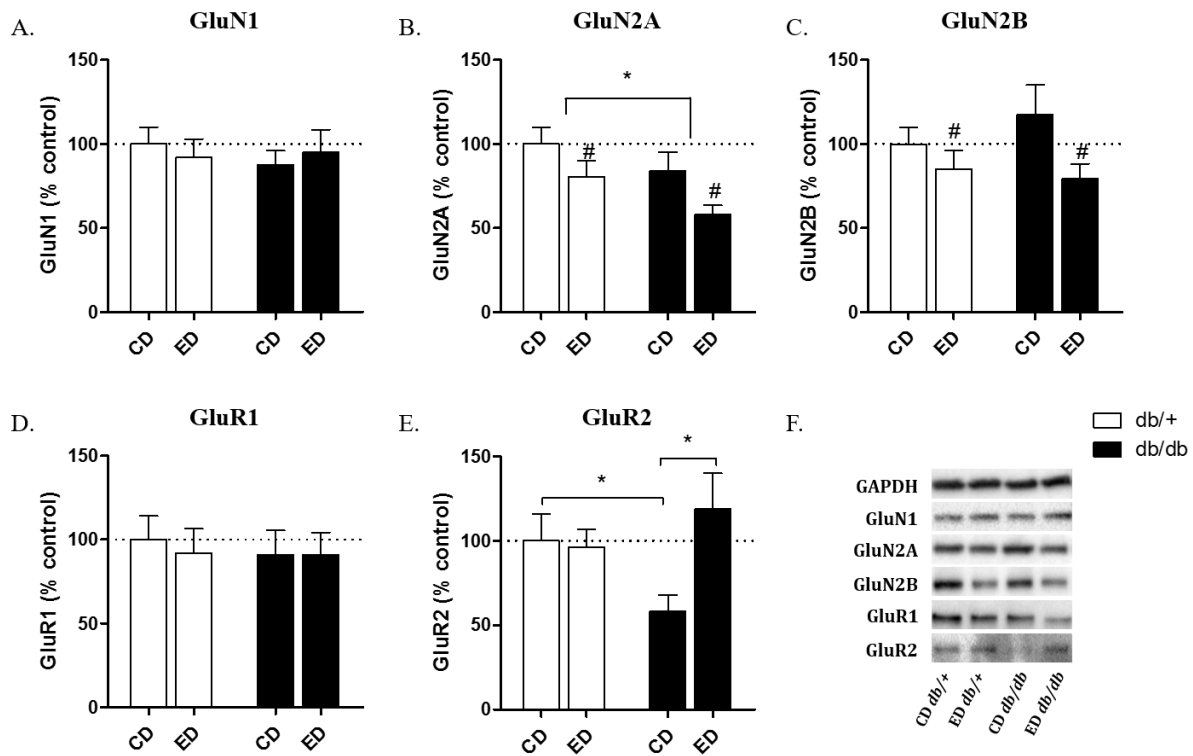
Neuronal plasticity also involves synaptic plasticity processes, such as LTP, which is known to be altered in the hippocampus of *db/db* mice. Two main glutamatergic receptors are strongly involved in the regulation of LTP, namely NMDA and AMPA receptors, which are both constituted of specific subunits: GluN1, GluN2A and GluN2B for NMDA, and GluR1

and GluR2 for AMPA receptors. Interestingly, the subunit composition of these receptors can be modulated by n-3 PUFAs and AO (Calon, et al., 2005; Schroeter, et al., 2007). Hence, such a modulation may similarly participate in the present study to ED-induced cognitive improvement. GluN1 protein expression was not affected by the genotype or ED (Fig. 6A).



**Figure 5.** Effect of ED on hippocampal insulin signaling pathway. A-C) Phosphorylation levels of IRS1, Akt and GSK3β proteins. H) Blots of GAPDH, phospho-IRS1, IRS1, phospho-Akt, Akt, phospho-GSK3β and GSK3β. (n = 11-13/group. \**p*<0.05; \*\*\**p*<0.001 genotype effect)

Interestingly, ED decreased however hippocampal levels of GluN2A (diet:  $F_{(1,41)}=6.371$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 6B) and GluN2B subunits (diet:  $F_{(1,41)}=5.070$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 6C) in both *db/+* and *db/db* mice. Regarding now the composition of AMPA receptors, GluR1 expression was similar in all four groups (Fig. 6D), whereas GluR2 expression analysis revealed a significant interaction between genotype and diet (genotype x diet:  $F_{(1,41)}=4.369$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 6E). Indeed, GluR2 levels were decreased in CD *db/db* mice in comparison to CD *db/+* mice ( $t_{(14)}=2.351$ ;  $p<0.05$ ), but ED normalized this levels in *db/db* mice ( $t_{(13)}=2.546$ ;  $p<0.05$ ). In summary, enhanced spatial memory in *db/db* mice fed with ED was associated with changes in the composition of AMPA and NMDA receptors, which may contribute to modulate synaptic plasticity.



**Figure 6.** Effect of ED on glutamatergic receptor composition in the hippocampus. A-C) Hippocampal protein levels of NMDA subunits GluN1, GluN2A and GluN2B. D-E) Hippocampal protein levels of AMPA subunits GluR1 and GluR2. H) Blots of GAPDH, GluN1, GluN2A, GluN2B, GluR1 and GluR2. (n = 11-13/group. \*p<0.05 genotype effect; #p<0.05 diet effect. When interaction, \*p<0.05)

#### 4. DISCUSSION

In the present study, we aimed to assess the impact of a nutritional intervention with important nutrients (n-3 PUFAs and AO) on metabolic and behavioral alterations associated with MetS, as well as on some of their main neurobiological correlates. This work shows that this supplementation slightly improved some metabolic alterations displayed by *db/db* mice, but had no impact on their anxiety-like behavior. However, n-3 PUFAs/AO supplementation did reverse spatial memory deficits, and this cognitive improvement may involve changes in synaptic plasticity.

Both clinical and preclinical studies have already reported beneficial effect of dietary supplementation with n-3 PUFAs or AO on metabolic alterations displayed by patients with MetS or animal models of the disease (Alcala, et al., 2015; Bhaswant, et al., 2015; Fedor and Kelley, 2009; Flachs, et al., 2014; Kasbi-Chadli, et al., 2014; Kim, et al., 2013), including genetic models of MetS (Bang and Choung, 2014; Cho, et al., 2014). Here, we used the *db/db*

mice, which progressively develop severe obesity because of an excessive food intake, associated with most of the metabolic alterations characterizing MetS, including polydipsia (increased water intake), insulin resistance and hyperglycemia (Dinel, et al., 2011; Everard, et al., 2014). Here, ED only improved some of the metabolic alterations displayed by *db/db* mice. Indeed, it did not improve total body weight gain or excessive food and water intake. However, although it did not improve fasted glycemia and glucose tolerance, it decreased fed glycemia and insulin resistance. Consistent with these results, ALA or EPA/DHA supplementation has been shown to improve insulin secretion and sensitivity in type 2 diabetes patients (Bhaswant, et al., 2015; Fedor and Kelley, 2009; Flachs, et al., 2014; Kasbi-Chadli, et al., 2014). In our study, the slight but still significant improvement of glycemic control may be due to the combination of n-3 PUFAs and AO, which was tested for the first time. A major effect of  $\alpha$ -tocopherol can be suggested, since it was increased in the plasma following 13 weeks of dietary supplementation, in contrast with CoQ10. Consistent with this hypothesis,  $\alpha$ -tocopherol supplementation has been reported to decrease insulin resistance and plasma triglyceride levels in high-fat diet-induced obesity in rodents (Alcala, et al., 2015; Kim, et al., 2013; Laight, et al., 1999). n-3 PUFAs and AO are well described to display systemic anti-inflammatory properties. However, glycemic improvement unlikely involves changes in systemic inflammation in the present case as it was undetectable in *db/db* mice. Alternatively, decreased insulin resistance may be mediated by an improved glucose regulation in the liver, since local PPAR $\gamma$  mRNA expression was normalized, and mRNA expression of both G6P and GLUT2 tended to be decreased in *db/db* mice following ED chronic consumption. Interestingly, PPAR $\gamma$  is a strong regulator of insulin action, and it has been already identified as a target to treat insulin resistance (Olefsky and Saltiel, 2000). It can be argued that n-3 PUFAs and AO supplementation used in the present study, and/or the duration of ED exposure, are not sufficient to more largely improve metabolic alterations displayed by *db/db* mice. Changing diet composition and/or increasing the duration of supplementation may indeed allow improving ED effect on metabolic alterations. However, it is noteworthy that the present conditions of supplementation already increased both peripheral and brain n-3 PUFAs content, and more importantly reversed cognitive alterations in *db/db* mice.

To our knowledge, this is the first attempt to measure the impact of combined n-3 PUFAs/AO supplementation on the behavioral alterations in a model of MetS. Interestingly, ED differentially affected anxiety-like behavior and memory performances. Indeed, both CD-



fed and ED-fed *db/db* mice displayed similar anxiety-like behavior in the different behavioral paradigms used, which have been all pharmacologically validated (Cryan and Slattery, 2007) and are routinely used in preclinical studies to model different core symptoms of anxiety. Hence, these results corroborate previous studies reporting anxiety-like behaviors in *db/db* mice (Dinel, et al., 2011; Sharma, et al., 2010; Zhao, et al., 2012), although ED is not sufficient to improve these behavioral alterations. On the contrary, ED restored spatial memory performances in *db/db* mice in the Morris water maze test. This is consistent with previous studies showing spatial memory improvement following n-3 PUFAs or AO supplementation in different conditions associated with cognitive deficits (Bazinet and Laye, 2014; Vauzour, et al., 2015), such as aging (Bensalem, et al., 2016; Labrousse, et al., 2012) and Alzheimer's disease (Hosono, et al., 2015). A dietary supplementation with natural polyphenols also improved spatial memory in obese *db/db* mice in the same task, in association with reduced inflammation in the hippocampus and the cortex (Infante-Garcia, et al., 2016). Previous study has already reported cognitive deficits in *db/db* mice, but both in the learning and retention phase (Li, et al., 2002; Stranahan, et al., 2008), whereas they displayed normal learning in the present study. Of note, some studies only report swimming time to reach the platform (Chen, et al., 2016), whereas it is important to report path length since swimming speed is decreased in *db/db* mice (Zhao, et al., 2012). Moreover, important differences between their experimental protocol and ours can likely explain this apparent discrepancy. Unlike what has been done here, in those studies no habituation to the test conditions (water immersion, swimming...), which are obviously highly stressful and likely interfere with spatial learning performances, is performed before spatial learning (Stranahan, et al., 2008; Stranahan, et al., 2009; Zhao, et al., 2011). Supporting this assumption, learning performances in the water maze task have been to be improved when mice are handled or submitted to habituation (Holscher, 1999).

Since the ED attenuated impairment in glycemic control at the periphery, in particular insulin resistance, we hypothesized that ED-induced cognitive improvement may somehow involve decreased insulin resistance in the hippocampus. Indeed, hippocampal insulin resistance plays a role in memory impairments, in particular in Alzheimer's disease (Biessels and Reagan, 2015). Here, we show that insulin signaling pathway was indeed altered in the hippocampus of *db/db* mice, but ED failed to improve these alterations. This suggests that improvement of brain insulin resistance does not mediate the behavioral effect of ED, but also that n-3 PUFAs and AO differentially influenced insulin resistance at the periphery and within

the brain. On the contrary, the present n-3 PUFAs/AO supplementation did impact some of the hippocampal neurobiological processes known to modulate behavior, in particular synaptic plasticity. Indeed, ED restored hippocampal levels of the AMPA subunit GluR2 in *db/db* mice, and decreased NMDA subunits GluN2A and GluN2B in both *db/+* and *db/db* mice. The subunit composition of AMPA and NMDA receptors is a key regulator of LTP (Luscher and Malenka, 2012; Makino, et al., 2011; Paoletti, et al., 2013), the main neurobiological substrate of spatial memory (Bannerman, et al., 2014; Tsien, et al., 1996). Both n-3 PUFAs and AO have already been related to changes in NMDA and AMPA receptor composition (Calon, et al., 2005; Schroeter, et al., 2007), however, this is the first time such an effect is reported in the context of obesity. Interestingly, DHA has been shown to change neuronal membrane fluidity, and consequently the localization of membrane receptors (De Smedt-Peyrusse, et al., 2008). In the present study, n-3 PUFAs may similarly change the composition and localization of neuronal AMPA and NMDA receptors. Further studies are necessary to test this hypothesis and to deeply characterize how ED modulates synaptic plasticity to improve cognition in *db/db* mice. In particular, the impact of hippocampal LTP should be studied, since it is impaired in *db/db* mice (Erion, et al., 2014; Li, et al., 2002; Stranahan, et al., 2008), and changing n-3 PUFAs and AO dietary levels has already been shown to modulate LTP in other conditions (Delpech, et al., 2015b; Wang, et al., 2011). Interestingly, cognitive alterations in *db/db* mice have been previously related to increased glucocorticoid levels (Stranahan, et al., 2008). Here however, ED reversed memory deficits without normalizing corticosterone levels or hippocampal glucocorticoid receptor activation (data not shown). Hence, this suggests that different, although not mutually exclusive, mechanisms are likely involved in the development of cognitive deficits in *db/db* mice. This is consistent with another study showing that IL-1 $\beta$  also participates to the development of cognitive deficits in *db/db* mice (Erion, et al., 2014). Here, we report for the first time that cognitive alterations were associated in *db/db* mice, not only with increased hippocampal expression of cytokines (Dinel, et al., 2011; Dinel, et al., 2014; Erion, et al., 2014), but also with concomitant over-activation of their intracellular signaling pathways. ED was able to improve behavioral alterations without apparent impact on hippocampal inflammation. However, we cannot totally exclude a role of inflammatory processes in ED-induced cognitive improvement, since ED may affect other cytokines (e.g. IL-4, IL10, IFN $\gamma$ ) and signaling pathways (JNK, NF $\kappa$ B, STAT1/2). Alternatively, we postulated that ED may reverse reduced neurogenesis displayed by *db/db* mice. Although it was not the case, it is

noteworthy that they also displayed a decrease in the number of DCX<sup>+</sup> cells with ramifications. We show for the first time that *db/db* mice not only have fewer neurons, but these new cells are less involved in processes of maturation and network integration. Importantly, these behavioral data show that different mechanisms are involved in the regulation of emotional behaviors and cognition in the context of MetS, since ED improved spatial memory but not anxiety-like behaviors. This is consistent with our previous study in which we reported a role of TNF- $\alpha$  in the development of anxiety-like behavior in *db/db* mice (Fourrier, et al., 2016). In the present study, ED was not sufficient to improve hippocampal TNF- $\alpha$  mRNA and anxiety-like behavior, confirming our previous assumption.

In conclusion, n-3 PUFAs/AO supplementation can improve cognitive alterations associated with obesity. Although more studies are necessary to further characterize the mechanisms underlying this behavioral improvement, our results point synaptic plasticity as a contributor of n-3 PUFAs/AO effect on cognition. These results are promising in the context of cognitive alterations, although such a supplementation should be used with caution since it seems to impair memory in lean *db/+* mice. One can hypothesized a deleterious effect of n-3 PUFAs and/or AO supplementation on neurobiological systems involved in the regulation of memory in basal conditions. Some studies report a pro-oxidant effect of AO, such as vitamin C and  $\alpha$ -tocopherol, especially when the dose administered is high (Carocho and Ferreira, 2013; Kondakci, et al., 2013). More studies are needed to address this issue. Beyond that, this study also helps understanding how nutrients such as n-3 PUFAs and AO may act in the brain to modulate behavior. Hence, these findings contribute to point to n-3 PUFAs and AO supplementation as a promising nutritional strategy helping to improve the management of neuropsychiatric symptoms, not only in patients with MetS, but also in other conditions associated with cognitive deficits.

## 5. REFERENCES

- Accomando, S., Pellitteri, V., Corsello, G. 2010. Natural polyphenols as anti-inflammatory agents. *Front Biosci (Schol Ed)* 2, 318-31. doi:67 [pii].
- Alcala, M., Sanchez-Vera, I., Sevillano, J., Herrero, L., Serra, D., Ramos, M.P., Viana, M. 2015. Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 23(8), 1598-606. doi:10.1002/oby.21135.

- Alosco, M.L., Gunstad, J. 2014. The negative effects of obesity and poor glycemic control on cognitive function: a proposed model for possible mechanisms. *Curr Diab Rep* 14(6), 495. doi:10.1007/s11892-014-0495-z.
- Anhe, F.F., Roy, D., Pilon, G., Dudonne, S., Matamoros, S., Varin, T.V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E., Marette, A. 2015. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64(6), 872-83. doi:gutjnl-2014-307142 [pii] 10.1136/gutjnl-2014-307142.
- Bang, C.Y., Choung, S.Y. 2014. Enzogenol improves diabetes-related metabolic change in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol* 66(6), 875-85. doi:10.1111/jphp.12211.
- Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N., Monyer, H., Seeburg, P.H. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 15(3), 181-92. doi:nrn3677 [pii]10.1038/nrn3677.
- Bazin, R.P., Laye, S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(12), 771-85. doi:nrn3820 [pii] 10.1038/nrn3820.
- Bedse, G., Di Domenico, F., Serviddio, G., Cassano, T. 2015. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Front Neurosci* 9, 204. doi:10.3389/fnins.2015.00204.
- Bensalem, J., Servant, L., Alfos, S., Gaudout, D., Laye, S., Pallet, V., Lafenetre, P. 2016. Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. *Front Behav Neurosci* 10, 9. doi:10.3389/fnbeh.2016.00009.
- Bhaswant, M., Poudyal, H., Brown, L. 2015. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 26(6), 571-84. doi:S0955-2863(15)00030-3 [pii] 10.1016/j.jnutbio.2015.02.001.
- Biessels, G.J., Reagan, L.P. 2015. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 16(11), 660-71. doi:nrn4019 [pii] 10.1038/nrn4019.
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauviant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., Ferreira, G. 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun*. doi:S0889-1591(14)00071-3 [pii] 10.1016/j.bbi.2014.03.005.
- Brunault, P., Jacobi, D., Miknius, V., Bourbao-Tournois, C., Hutten, N., Gaillard, P., Couet, C., Camus, V., Ballon, N. 2012. High preoperative depression, phobic anxiety, and binge eating scores

and low medium-term weight loss in sleeve gastrectomy obese patients: a preliminary cohort study. *Psychosomatics* 53(4), 363-70. doi:S0033-3182(11)00388-4 [pii] 10.1016/j.psym.2011.12.008.

Calon, F., Lim, G.P., Morihara, T., Yang, F., Ubeda, O., Salem, N., Jr., Frautschy, S.A., Cole, G.M. 2005. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 22(3), 617-26. doi:EJN4253 [pii] 10.1111/j.1460-9568.2005.04253.x.

Canello, R., Clement, K. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113(10), 1141-7. doi:BJO1004 [pii] 10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x.

Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., Everard, A. 2012. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3(4), 279-88. doi:19625 [pii] 10.4161/gmic.19625.

Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58(8), 1091-103. doi:gut.2008.165886 [pii] 10.1136/gut.2008.165886.

Capuron, L., Lasselin, J., Castanon, N. 2016. Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. *Neuropsychopharmacology*. doi:npp2016123 [pii] 10.1038/npp.2016.123.

Capuron, L., Miller, A.H. 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 130(2), 226-38. doi:S0163-7258(11)00047-7 [pii] 10.1016/j.pharmthera.2011.01.014.

Carocho, M., Ferreira, I.C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51, 15-25. doi:S0278-6915(12)00694-1 [pii] 10.1016/j.fct.2012.09.021.

Castanon, N., Lasselin, J., Capuron, L. 2014. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 74. doi:10.3389/fendo.2014.00074.

Castanon, N., Luheshi, G., Laye, S. 2015. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci* 9, 229. doi:10.3389/fnins.2015.00229.

Chalut-Carpentier, A., Pataky, Z., Golay, A., Bobbioni-Harsch, E. 2015. Involvement of dietary Fatty acids in multiple biological and psychological functions, in morbidly obese subjects. *Obes Surg* 25(6), 1031-8. doi:10.1007/s11695-014-1471-z.

- Chen, F., Dong, R.R., Zhong, K.L., Ghosh, A., Tang, S.S., Long, Y., Hu, M., Miao, M.X., Liao, J.M., Sun, H.B., Kong, L.Y., Hong, H. 2016. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-beta across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice. *Neuropharmacology* 101, 123-36. doi:S0028-3908(15)30030-7 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2015.07.023.
- Cho, S.J., Park, H.J., Jung, U.J., Kim, H.J., Moon, B.S., Choi, M.S. 2014. The beneficial effects of combined grape pomace and omija fruit extracts on hyperglycemia, adiposity and hepatic steatosis in db/db mice: a comparison with major index compounds. *Int J Mol Sci* 15(10), 17778-89. doi:ijms151017778 [pii] 10.3390/ijms151017778.
- Cryan, J.F., Slattery, D.A. 2007. Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20(1), 1-7. doi:10.1097/YCO.0b013e3280117733 00001504-200701000-00002 [pii].
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1), 46-56. doi:nrn2297 [pii] 10.1038/nrn2297.
- 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(2), 296-307. doi:JNC5129 [pii] 10.1111/j.1471-4159.2007.05129.x.
- Delpech, J.C., Madore, C., Joffre, C., Aubert, A., Kang, J.X., Nadjar, A., Laye, S. 2015a. Transgenic increase in n-3/n-6 fatty acid ratio protects against cognitive deficits induced by an immune challenge through decrease of neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 40(3), 525-36. doi:npp2014196 [pii] 10.1038/npp.2014.196.
- Delpech, J.C., Thomazeau, A., Madore, C., Bosch-Bouju, C., Larrieu, T., Lacabanne, C., Remus-Borel, J., Aubert, A., Joffre, C., Nadjar, A., Laye, S. 2015b. Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment. *Neuropsychopharmacology*. doi:npp2015127 [pii] 10.1038/npp.2015.127.
- Dey, A., Hao, S., Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., Stranahan, A.M. 2014. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. *J Neuroimmunol*. doi:S0165-5728(14)00030-7 [pii] 10.1016/j.jneuroim.2014.01.013.
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2011. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One* 6(9), e24325. doi:10.1371/journal.pone.0024325 PONE-D-11-08473 [pii].
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2014. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are

impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 40, 48-59. doi:S0306-4530(13)00397-1 [pii] 10.1016/j.psyneuen.2013.10.014.

Dixon, J.B., Dixon, M.E., O'Brien, P.E. 2003. Depression in association with severe obesity: changes with weight loss. *Arch Intern Med* 163(17), 2058-65. doi:10.1001/archinte.163.17.2058 163/17/2058 [pii].

Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., Dey, A., Hao, S., Davis, C.L., Pollock, N.K., Stranahan, A.M. 2014. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 34(7), 2618-31. doi:34/7/2618 [pii 10.1523/JNEUROSCI.4200-13.2014.

Esmaily, H., Sahebkar, A., Iranshahi, M., Ganjali, S., Mohammadi, A., Ferns, G., Ghayour-Mobarhan, M. 2015. An investigation of the effects of curcumin on anxiety and depression in obese individuals: A randomized controlled trial. *Chin J Integr Med*. doi:10.1007/s11655-015-2160-z.

Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N.M., Cani, P.D. 2014. *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic db/db Mice. *MBio* 5(3). doi:mBio.01011-14 [pii] 10.1128/mBio.01011-14.

Fedor, D., Kelley, D.S. 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12(2), 138-46. doi:10.1097/MCO.0b013e3283218299 00075197-200903000-00007 [pii].

Fernandez de Cossio, L., Fourier, C., Sauvant, J., Everard, A., Capuron, L., Cani, P.D., Laye, S., Castanon, N. 2016. Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. Submitted to *Brain, Behavior and Immunity*.

Flachs, P., Rossmeisl, M., Kopecky, J. 2014. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res* 63 Suppl 1, S93-118. doi:932715 [pii].

Fourier, C., Bosch-Bouju, C., Boursereau, R., Sauvant, J., Aubert, A., Capuron, L., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N. 2016. Brain TNF- $\alpha$  mediates anxiety-like behavior in a mouse model of obesity. In progress.

Hadley, K.B., Ryan, A.S., Nelson, E.B., Salem, N. 2009. An assessment of dietary docosahexaenoic acid requirements for brain accretion and turnover during early childhood. *World Rev Nutr Diet* 99, 97-104. doi:000193000 [pii] 10.1159/000193000.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85. doi:0076-6879(90)86093-B [pii].

- Hao, S., Dey, A., Yu, X., Stranahan, A.M. 2015. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*. doi:S0889-1591(15)30007-6 [pii] 10.1016/j.bbi.2015.08.023.
- Holscher, C. 1999. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 100(1-2), 225-35. doi:S0166-4328(98)00134-X [pii].
- Hosono, T., Nishitsuji, K., Nakamura, T., Jung, C.G., Kontani, M., Tokuda, H., Kawashima, H., Kiso, Y., Suzuki, T., Michikawa, M. 2015. Arachidonic acid diet attenuates brain Abeta deposition in Tg2576 mice. *Brain Res* 1613, 92-9. doi:S0006-8993(15)00294-2 [pii] 10.1016/j.brainres.2015.04.005.
- Infante-Garcia, C., Ramos-Rodriguez, J.J., Marin-Zambrana, Y., Fernandez-Ponce, M.T., Casas, L., Mantell, C., Garcia-Alloza, M. 2016. Mango leaf extract improves central pathology and cognitive impairment in a type 2 diabetes mouse model. *Brain Pathol*. doi:10.1111/bpa.12433.
- Innis, S.M. 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 1237, 35-43. doi:S0006-8993(08)02103-3 [pii] 10.1016/j.brainres.2008.08.078.
- Jia, N., Han, K., Kong, J.J., Zhang, X.M., Sha, S., Ren, G.R., Cao, Y.P. 2013. (-)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates spatial memory impairment in APP/PS1 mice by restoring IRS-1 signaling defects in the hippocampus. *Mol Cell Biochem* 380(1-2), 211-8. doi:10.1007/s11010-013-1675-x.
- Karlsen, A., Paur, I., Bohn, S.K., Sakhi, A.K., Borge, G.I., Serafini, M., Erlund, I., Laake, P., Tonstad, S., Blomhoff, R. 2010. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr* 49(6), 345-55. doi:10.1007/s00394-010-0092-0.
- Kasbi-Chadli, F., Boquien, C.Y., Simard, G., Ulmann, L., Mimouni, V., Leray, V., Meynier, A., Ferchaud-Roucher, V., Champ, M., Nguyen, P., Ouguerram, K. 2014. Maternal supplementation with n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during perinatal period alleviates the metabolic syndrome disturbances in adult hamster pups fed a high-fat diet after weaning. *J Nutr Biochem* 25(7), 726-33. doi:S0955-2863(14)00057-6 [pii] 10.1016/j.jnutbio.2014.03.003.
- Kiecolt-Glaser, J.K., Belury, M.A., Andridge, R., Malarkey, W.B., Glaser, R. 2011. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 25(8), 1725-34. doi:10.1016/j.bbi.2011.07.229.
- Kim, D.Y., Kim, J., Ham, H.J., Choue, R. 2013. Effects of d-alpha-tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model. *Nutr Res Pract* 7(6), 481-7. doi:10.4162/nrp.2013.7.6.481.



- Kinzl, J.F., Schrattenecker, M., Traweger, C., Mattesich, M., Fiala, M., Biebl, W. 2006. Psychosocial predictors of weight loss after bariatric surgery. *Obes Surg* 16(12), 1609-14. doi:10.1381/096089206779319301.
- Kolehmainen, M., Mykkanen, O., Kirjavainen, P.V., Leppanen, T., Moilanen, E., Adriaens, M., Laaksonen, D.E., Hallikainen, M., Puupponen-Pimia, R., Pulkkinen, L., Mykkanen, H., Gylling, H., Poutanen, K., Torronen, R. 2012. Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res* 56(10), 1501-10. doi:10.1002/mnfr.201200195.
- Kondakci, E., Ozyurek, M., Guclu, K., Apak, R. 2013. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. *Talanta* 115, 583-9. doi:S0039-9140(13)00506-7 [pii] 10.1016/j.talanta.2013.06.006.
- Kume, A., Herbas, M.S., Shichiri, M., Ishida, N., Suzuki, H. 2016. Effect of anti-hyperlipidemia drugs on the alpha-tocopherol concentration and their potential for murine malaria infection. *Parasitol Res* 115(1), 69-75. doi:10.1007/s00436-015-4722-6 10.1007/s00436-015-4722-6 [pii].
- Labrousse, V.F., 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(5), e36861. doi:10.1371/journal.pone.0036861 PONE-D-11-25487 [pii].
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V.F., Bretillon, L., Matute, C., Rodriguez-Puertas, R., Laye, S., Manzoni, O.J. 2011. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14(3), 345-50. doi:nn.2736 [pii] 10.1038/nn.2736.
- Laight, D.W., Desai, K.M., Gopaul, N.K., Anggard, E.E., Carrier, M.J. 1999. F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 377(1), 89-92. doi:S0014-2999(99)00407-0 [pii].
- Larrieu, T., Hilal, M.L., Fourrier, C., De Smedt-Peyrusse, V., Sans, N., Capuron, L., Laye, S. 2014. Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl Psychiatry* 4, e437. doi:tp201477 [pii] 10.1038/tp.2014.77.
- Lasselain, J., Capuron, L. 2014. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation* 21(2-3), 95-101. doi:000356535 [pii] 10.1159/000356535.
- Lehtonen, H.M., Suomela, J.P., Tahvonen, R., Yang, B., Venojarvi, M., Viikari, J., Kallio, H. 2011. Different berries and berry fractions have various but slightly positive effects on the associated

variables of metabolic diseases on overweight and obese women. *Eur J Clin Nutr* 65(3), 394-401. doi:ejcn2010268 [pii] 10.1038/ejcn.2010.268.

Leonard, A.E., Kelder, B., Bobik, E.G., Chuang, L.T., Lewis, C.J., Kopchick, J.J., Mukerji, P., Huang, Y.S. 2002. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* 37(8), 733-40.

Letondor, A., Buaud, B., Vaysse, C., Fonseca, L., Herrouin, C., Servat, B., Laye, S., Pallet, V., Alfos, S. 2014. Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 long-chain PUFA-supplemented aged rats. *Br J Nutr* 112(11), 1805-18. doi:S0007114514002529 [pii] 10.1017/S0007114514002529.

Li, X.L., Aou, S., Oomura, Y., Hori, N., Fukunaga, K., Hori, T. 2002. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113(3), 607-15. doi:S0306452202001628 [pii].

Lieberwirth, C., Pan, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z. 2016. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Res* 1644, 127-40. doi:S0006-8993(16)30370-5 [pii] 10.1016/j.brainres.2016.05.015.

Liu, Y., Fu, X., Lan, N., Li, S., Zhang, J., Wang, S., Li, C., Shang, Y., Huang, T. 2014. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav Brain Res*. doi:S0166-4328(14)00125-9 [pii] 10.1016/j.bbr.2014.02.040.

Lombardo, Y.B., Hein, G., Chicco, A. 2007. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* 42(5), 427-37. doi:10.1007/s11745-007-3039-3.

Luscher, C., Malenka, R.C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6). doi:cshperspect.a005710 [pii] 10.1101/cshperspect.a005710.

Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J.C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., Joffre, C., Laye, S. 2014. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav Immun* 41, 22-31. doi:S0889-1591(14)00087-7 [pii] 10.1016/j.bbi.2014.03.021.

Makino, Y., Johnson, R.C., Yu, Y., Takamiya, K., Huganir, R.L. 2011. Enhanced synaptic plasticity in mice with phosphomimetic mutation of the GluA1 AMPA receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20), 8450-5. doi:1105261108 [pii] 10.1073/pnas.1105261108.

Manosso, L.M., Neis, V.B., Moretti, M., Daufenbach, J.F., Freitas, A.E., Colla, A.R., Rodrigues, A.L. 2013. Antidepressant-like effect of alpha-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior

induced by TNF-alpha. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46, 48-57. doi:S0278-5846(13)00123-1 [pii] 10.1016/j.pnpbp.2013.06.012.

Marteinsdottir, I., Horrobin, D.F., Stenfors, C., Theodorsson, E., Mathe, A.A. 1998. Changes in dietary fatty acids alter phospholipid fatty acid composition in selected regions of rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22(6), 1007-21. doi:S0278584698000529 [pii].

Nuzzo, D., Picone, P., Baldassano, S., Caruana, L., Messina, E., Gammazza, A.M., Cappello, F., Mule, F., Di Carlo, M. 2015. Insulin Resistance as Common Molecular Denominator Linking Obesity to Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. doi:CAR-EPUB-68725 [pii].

Olefsky, J.M., Saltiel, A.R. 2000. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 11(9), 362-8. doi:S1043-2760(00)00306-4 [pii].

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14(6), 383-400. doi:nrn3504 [pii] 10.1038/nrn3504.

Park, H.S., Park, J.Y., Yu, R. 2005. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 69(1), 29-35. doi:S0168-8227(04)00374-2 [pii] 10.1016/j.diabres.2004.11.007.

Rines, A.K., Sharabi, K., Tavares, C.D., Puigserver, P. 2016. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. doi:nrd.2016.151 [pii] 10.1038/nrd.2016.151.

Ruel, G., Lapointe, A., Pomerleau, S., Couture, P., Lemieux, S., Lamarche, B., Couillard, C. 2013. Evidence that cranberry juice may improve augmentation index in overweight men. *Nutr Res* 33(1), 41-9. doi:S0271-5317(12)00229-1 [pii] 10.1016/j.nutres.2012.11.002.

Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., Williams, R.J. 2007. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* 101(6), 1596-606. doi:JNC4434 [pii] 10.1111/j.1471-4159.2006.04434.x.

Sharma, A.N., Elased, K.M., Garrett, T.L., Lucot, J.B. 2010. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav* 101(3), 381-8. doi:S0031-9384(10)00257-X [pii] 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.

Shukitt-Hale, B., Lau, F.C., Carey, A.N., Galli, R.L., Spangler, E.L., Ingram, D.K., Joseph, J.A. 2008. Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. *Nutr Neurosci* 11(4), 172-82. doi:10.1179/147683008X301487.

Smith, K.M., Matson, S., Matson, W.R., Cormier, K., Del Signore, S.J., Hagerty, S.W., Stack, E.C., Ryu, H., Ferrante, R.J. 2006. Dose ranging and efficacy study of high-dose coenzyme Q10

formulations in Huntington's disease mice. *Biochim Biophys Acta* 1762(6), 616-26. doi:S0925-4439(06)00048-2 [pii] 10.1016/j.bbadis.2006.03.004.

Spolcova, A., Mikulaskova, B., Krskova, K., Gajdosechova, L., Zorad, S., Olszanecki, R., Suski, M., Bujak-Gizycka, B., Zelezna, B., Maletinska, L. 2014. Deficient hippocampal insulin signaling and augmented Tau phosphorylation is related to obesity- and age-induced peripheral insulin resistance: a study in Zucker rats. *BMC Neurosci* 15, 111. doi:1471-2202-15-111 [pii] 10.1186/1471-2202-15-111.

Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Cutler, R.G., Lee, K., Egan, J.M., Mattson, M.P. 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 11(3), 309-17. doi:nn2055 [pii] 10.1038/nn2055.

Stranahan, A.M., Lee, K., Martin, B., Maudsley, S., Golden, E., Cutler, R.G., Mattson, M.P. 2009. Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* 19(10), 951-61. doi:10.1002/hipo.20577.

Stull, A.J., Cash, K.C., Johnson, W.D., Champagne, C.M., Cefalu, W.T. 2010. Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *J Nutr* 140(10), 1764-8. doi:jn.110.125336 [pii] 10.3945/jn.110.125336.

Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenetre, P., Richard, E., Higuieret, P., Pallet, V. 2013. A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS One* 8(8), e72101. doi:10.1371/journal.pone.0072101 PONE-D-13-06443 [pii].

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S. 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87(7), 1327-38. doi:S0092-8674(00)81827-9 [pii].

Vauzour, D., Martinsen, A., Laye, S. 2015. Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochem Int*. doi:S0197-0186(15)30032-2 [pii] 10.1016/j.neuint.2015.08.004.

Wainwright, P.E. 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 61(1), 61-9. doi:S0029665102000113 [pii].

Wang, T., Yang, Y.J., Wu, P.F., Wang, W., Hu, Z.L., Long, L.H., Xie, N., Fu, H., Wang, F., Chen, J.G. 2011. Tetrahydroxystilbene glucoside, a plant-derived cognitive enhancer, promotes hippocampal synaptic plasticity. *Eur J Pharmacol* 650(1), 206-14. doi:S0014-2999(10)01004-6 [pii] 10.1016/j.ejphar.2010.10.002.

Wang, Y., Huang, F. 2015. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation in Obesity: Local Effect and Systemic Benefit. *Biomed Res Int* 2015, 581469. doi:10.1155/2015/581469.

Wilson, T., Luebke, J.L., Morcomb, E.F., Carrell, E.J., Leveranz, M.C., Kobs, L., Schmidt, T.P., Limburg, P.J., Vorsa, N., Singh, A.P. 2010. Glycemic responses to sweetened dried and raw cranberries in humans with type 2 diabetes. *J Food Sci* 75(8), H218-23. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01800.x.

Wilson, T., Meyers, S.L., Singh, A.P., Limburg, P.J., Vorsa, N. 2008. Favorable glycemic response of type 2 diabetics to low-calorie cranberry juice. *J Food Sci* 73(9), H241-5. doi:JFDS964 [pii] 10.1111/j.1750-3841.2008.00964.x.

Zhao, Q., Matsumoto, K., Tsuneyama, K., Tanaka, K., Li, F., Shibahara, N., Miyata, T., Yokozawa, T. 2011. Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, kangen-karyu: elucidation in type 2 diabetes db/db mice. *J Pharmacol Sci* 117(4), 230-42. doi:JST.JSTAGE/jphs/11115FP [pii].

Zhao, Q., Niu, Y., Matsumoto, K., Tsuneyama, K., Tanaka, K., Miyata, T., Yokozawa, T. 2012. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complement Altern Med* 12, 188. doi:1472-6882-12-188 [pii] 10.1186/1472-6882-12-188.

**Chapitre 3**

**IMPACT OF PREBIOTICS ON METABOLIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN A MOUSE MODEL OF METABOLIC SYNDROME**

Lourdes Fernández de Cossío, Célia Fourier, Julie Sauvant, Amandine Everard, Lucile Capuron, Patrice D. Cani, Sophie Layé and Nathalie Castanon

*Accepté dans Brain, Behavior and Immunity 2016 Dec 24*

**Objectif :**

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact d'une manipulation du microbiote intestinal par un prébiotique, l'oligofructose (OFS), non seulement sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité chez la souris *db/db*, mais également sur les systèmes neurobiologiques potentiellement impliqués dans le développement de ces troubles. Pour cela, des souris *db/+* et *db/db* ont consommé de l'OFS (dilué dans l'eau de boisson) pendant 9 semaines. Ce traitement réduisait la prise alimentaire et la consommation hydrique des souris *db/db*, ainsi que leurs altérations glycémiques (amélioration de la résistance au glucose et de la sensibilité à l'insuline). Ces améliorations métaboliques étaient associées à une diminution des niveaux de résistine et de corticostérone et à une augmentation des taux d'IL-10 dans le plasma des souris *db/db*. Au niveau cérébral, l'OFS n'améliorait pas l'expression des gènes des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (NPY, POMC et CART), mais restaurait les niveaux d'ARNm de la cytokine anorexigène IL-1 $\beta$  et des protéines de jonctions serrées ZO-1 et occludine, suggérant donc une amélioration de l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique (BHE). Sur le plan comportemental, l'OFS n'améliorait pas les comportements de type anxieux et les altérations cognitives dans le test du Y maze. La diminution de neurogenèse hippocampique des souris *db/db* n'était de même pas améliorée par l'administration d'OFS. Cependant, il est intéressant de noter qu'une corrélation négative existait entre les niveaux de neurogenèse et la densité des cellules microgliales dans le DG des souris *db/db*, et que cette relation influençait les performances mnésiques dans le test du labyrinthe en Y. Pour conclure, la manipulation de la composition du microbiote intestinal induite par l'administration chronique d'OFS améliore les altérations métaboliques des souris *db/db*, ceci s'accompagnant d'une diminution sélective de l'inflammation systémique et centrale et de la perméabilité de la BHE. Cette étude suggère ainsi que le microbiote intestinal puisse être une cible dans le développement de stratégies nutritionnelles et pharmacologiques dans le but de diminuer les altérations métaboliques associées à l'obésité. Cette intervention nutritionnelle ne permet pas en revanche d'améliorer les comportements de type anxieux et des altérations de la mémoire spatiale des souris *db/db*. Cependant, la relation qui a été mise en évidence entre le microbiote intestinal, la neurogenèse hippocampique, l'activation microgliale et les déficits cognitifs chez les souris *db/db* suggère que de nouveaux mécanismes restent à mettre en évidence dans la mise en place des altérations comportementales associées à l'obésité.

**Objective:**

This study aimed at assessing the impact of gut microbiota manipulation through prebiotic (oligofructose, OFS) administration, not only on metabolic and behavioral alterations associated with obesity in *db/db*, but also on potential biological mechanisms involved in the development of these alterations. For this purpose, OFS has been chronically (9 weeks) administrated into the water to *db/+* and *db/db* mice. This treatment improved both food and water intake and glycemic alterations (glucose intolerance and insulin resistance). These metabolic improvements were associated to decreased resistin and corticosterone levels and to increased IL-10 levels in the plasma of *db/db* mice. Within the hypothalamus, OFS did not improve mRNA expression of NPY, POMC and CART peptides, which are well-known to regulate food intake, but improved mRNA expression of the anorexigenic cytokine IL-1 $\beta$ , as well as tight junction proteins ZO-1 and occludin. On the other hand, OFS did not improve anxiety-like behavior, cognitive deficits in the Y maze test, and neurogenesis in *db/db* mice. However, it should be noticed that a negative correlation was found between neurogenesis levels and microglia density in the dentate gyrus of *db/db* mice. Moreover, this relationship predicted cognitive performances in the Y maze. To conclude, OFS-induced gut microbiota manipulation improves metabolic alterations in *db/db* mice, and this is associated with a selective decrease of peripheral and brain inflammation and blood-brain-barrier permeability. Hence, this study points to the gut microbiota as a potential target in the development of nutritional or pharmacological strategies aiming at decreasing metabolic alterations associated with obesity. This nutritional intervention did not improve behavior in *db/db* mice. However, the reported relationship between gut microbiota, hippocampal neurogenesis, microglial activation and cognition in *db/db* mice suggests that new mechanisms still need to be identified in the regulation of behavioral alterations associated with obesity.



**Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome**

Lourdes Fernández de Cossío<sup>1,2</sup>, Célia Fourier<sup>1,2</sup>, Julie Sauvant<sup>1,2</sup>, Amandine Everard<sup>3</sup>, Lucile Capuron<sup>1,2</sup>, Patrice D. Cani<sup>3</sup>, Sophie Layé<sup>1,2</sup>, Nathalie Castanon<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France

<sup>2</sup>Université de Bordeaux, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France

<sup>3</sup>Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, WELBIO (Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology), Metabolism and Nutrition Research Group, 1200 Brussels, Belgium

**Corresponding author:**

\* Nathalie Castanon

Nutrition et Neurobiologie Intégrée, INRA UMR 1286

Bâtiment UFR Pharmacie, 2<sup>o</sup> tranche, 2<sup>o</sup> étage, Case courrier 34,

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

E-mail : [nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr](mailto:nathalie.castanon@bordeaux.inra.fr)

Phone: 33 557 574 505

Fax: 33 557 571 227

**Abstract**

Mounting evidence shows that the gut microbiota, an important player within the gut-brain communication axis, can affect metabolism, inflammation, brain function and behavior. Interestingly, gut microbiota composition is known to be altered in patients with metabolic syndrome (MetS), who also often display neuropsychiatric symptoms. The use of prebiotics,

which beneficially alters the microbiota, may therefore be a promising way to potentially improve physical and mental health in MetS patients.

This hypothesis was tested in a mouse model of MetS, namely the obese and type-2 diabetic *db/db* mice, which display emotional and cognitive alterations associated with changes in gut microbiota composition and hippocampal inflammation compared to their lean *db/+* littermates. We assessed the impact of chronic administration (8 weeks) of prebiotics (oligofructose) on both metabolic (body weight, food intake, glucose homeostasis) and behavioral (increased anxiety-like behavior and impaired spatial memory) alterations characterizing *db/db* mice, as well as related neurobiological correlates, with particular attention to neuroinflammatory processes.

Prebiotic administration improved excessive food intake and glycemic dysregulations (glucose tolerance and insulin resistance) in *db/db* mice. This was accompanied by an increase of plasma anti-inflammatory cytokine IL-10 levels and hypothalamic mRNA expression of the anorexigenic cytokine IL-1 $\beta$ , whereas unbalanced mRNA expression of hypothalamic orexigenic (NPY) and anorexigenic (CART, POMC) peptides was unchanged. We also detected signs of improved blood-brain-barrier integrity in the hypothalamus of oligofructose-treated *db/db* mice (normalized expression of tight junction proteins ZO-1 and occludin). On the contrary, prebiotic administration did not improve behavioral alterations and associated reduction of hippocampal neurogenesis displayed by *db/db* mice, despite normalization of increased hippocampal IL-6 mRNA expression. Of note, we found a relationship between the effect of treatment on dentate gyrus neurons and spatial memory. These findings may prove valuable for introducing novel approaches to treat neuropsychiatric comorbidities associated with MetS.

**Keywords:** metabolic syndrome; gut microbiota; prebiotics; *db/db* mice; hippocampus; hypothalamus; inflammation; cytokines; anxiety; spatial memory

## 1. INTRODUCTION

The Metabolic Syndrome (MetS) is a widely accepted concept that clusters together several risk factors for Type 2 Diabetes (T2D) and cardiovascular diseases including: overweight/obesity, hypertension, hyperglycemia, and disturbances of lipid/carbohydrate metabolism. Interestingly, low-grade inflammation originating from the adipose tissue and/or

gut microbiota environment increasingly appears as another key component of MetS (Cancello & Clement 2006; Cani et al., 2009; Gregor & Hotamisligil 2011). In addition, clinical data of patients with MetS and experiments conducted in animal models of obesity/MetS also document an augmented risk for neuropsychiatric disorders (Castanon et al 2015; Farooqui et al., 2012). Due to the breadth of complications resulting from the MetS, both the quality of life of affected patients is impaired and the costs to health care systems worldwide have increased. This leads therefore to heightened interest in better understanding the physiopathological mechanisms underlying MetS-associated complications, with the final goal of improving treatment options.

There is now compelling evidence for the participation of the gut microbiota in the systemic low-grade inflammation associated with obesity and related metabolic disorders (for review see Cani et al., 2012; Nakamura & Omaye, 2012). The gut microbiota is involved in high-fat diet-induced endotoxemia leading to the chronic low-grade inflammation observed in obesity, through impaired gut barrier permeability (Cani et al., 2016). Gut microbial population is also altered in genetically obese and diabetic mice (Geurts et al., 2011; Ley et al., 2005), and transferring the microbial flora from genetically obese mice to germ-free lean animals induces the obese phenotype in the latter (Turnbaugh et al., 2006). More recent evidence further suggests that modulating gut microbiota composition through nutritional interventions may have therapeutic potential in the management of MetS and related co-morbidities (Erejuwa et al., 2014; Petra et al., 2015). Interestingly, these interventions may impact both systemic and brain functions, although the nature of the biological pathways targeted within the so called “gut-brain axis” is still elusive (Cani and Knauf, 2016; Cryan & Dinan, 2012; Moloney et al., 2013). Improvement of metabolic alterations has been shown with the use of probiotics, which are live microorganisms able to confer health benefits to the host when administered in adequate amount (Delzenne et al., 2011). Similarly, prebiotics such as the nondigestible carbohydrate oligofructose, which selectively stimulate the growth of some healthy commensal bacteria, have been shown to improve alterations of glucose homeostasis, plasma lipid profile (Mallappa et al., 2012), and importantly peripheral inflammation associated with MetS and/or obesity (Cani et al., 2007; Cani et al., 2016). Indeed, converging studies strongly suggest that oligofructose’s beneficial effects are mediated by the ability of several commensal bacteria to reduce endotoxemia-induced systemic inflammation (Cani et al., 2009; Kootte et al., 2012). Much less is known however about the potential impact on brain inflammation, which is also classically reported in rodent

models of MetS/obesity (Dinel et al., 2011; 2014; Guillemot-Legrís et al., 2016; Pistell et al., 2010), as well as in other medical conditions sharing systemic inflammation and neuropsychiatric symptoms as common features (Capuron et al., 2016; Capuron & Castanon, 2016).

Accumulating evidence indicates that the gut microbiota can impact the brain (Moloney et al., 2013; Neufeld et al., 2011), with which it communicates through neuronal, hormonal and/or immune pathways (D’Mello et al., 2015; Ochoa-Repáraz & Kasper, 2016). In addition, studies dealing with the pathophysiological consequences of impaired gut-brain communication increasingly report mood and cognitive alterations (Collins et al., 2012; Cryan & Dinan 2012; Savignac et al., 2016). This new research area has recently drawn much attention, but most of the present knowledge on how microbiota can influence brain function and behavior comes from studies primarily using germ-free mice, which display neuroendocrine, neurobiochemical, and behavioral alterations in basal and/or stressful conditions that can be rescued upon gut colonization with normal microbiota (Bercik et al., 2011; Crumeyrolle-Arias et al., 2014; Neufeld et al., 2011). Similarly, chronic stress exposure has also been reported to induce alterations of both microbiota composition and emotional behavior that can be prevented by prebiotic and/or probiotic treatment (Ait-Belgnaoui et al., 2014; Desbonnet et al., 2010; Gareau, 2014; Tarr et al 2015). Other compelling data come from studies showing that antimicrobial treatments, which change the microbiota profile in mice, induce neurobiochemical changes, as well as emotional and cognitive alterations (Bercik et al., 2011; Desbonnet et al., 2015; Pyndt-Jorgensen et al., 2015), although some contradictory data have also been reported (O’Mahony et al., 2014).

While these studies clearly contribute to better understand the role of the gut-brain axis in those particularly drastic conditions, much less is known regarding MetS-related emotional and cognitive alterations, although recent evidence points to a relationship between high-fat diet-related changes in gut microbiota and behavior (Bruce-Keller et al., 2015; Kang et al., 2014; Magnusson et al., 2015). This issue is however particularly relevant since the MetS emerges as an important risk factor for neuropsychiatric and neurological disorders including depression, anxiety, cognitive impairments, stroke, and Alzheimer’s disease (Farooqui et al., 2012). Conversely, these disorders have been shown to significantly aggravate the MetS and related health outcomes, including cardiovascular disease or type 2 diabetes (Capuron et al., 2016; Roberts et al., 2010; Wulsin & Singal, 2003). Understanding the etiology of

neuropsychiatric disorders in MetS patients appears therefore as a major public health challenge. Given the recent knowledge on the impact of the gut microbiota on brain and behavior, questions arise as to whether microbiota may play a role in the cognitive and emotional alterations associated with the MetS and whether prebiotics may have potential beneficial effects on such behavioral alterations.

In the present study, we addressed these issues by measuring the consequences of chronic administration of the prebiotic oligofructose on the behavioral alterations displayed by a genetic model of MetS, the *db/db* mouse. In addition, we investigated the potential underlying mechanisms by measuring the consequences on metabolism and systemic inflammation, but also on brain systems known to be involved in the control of food intake and behavior. The *db/db* model, which displays T2D, obesity, hyperglycemia and insulin-resistance as a consequence of an inactivating mutation in the leptin receptor, is notably suitable in that context since the metabolic alterations associated with this model have been related to changes in microbiota composition (Everard et al., 2014; Geurts et al., 2011). Moreover, previous work from our group further showed that *db/db* mice also exhibit emotional and cognitive alterations that are associated with increased inflammation in the hippocampus, a key area in the regulation of mood and cognition (Castanon et al., 2015; Dinel et al., 2011; Dinel et al., 2014). By using this model that allows simultaneously assessing the effect of microbiota manipulation on behavioral alterations associated with the MetS, and on their main potential systemic and neurobiological correlates, particularly inflammation, we provided here new and important findings helping to decipher the complexity of the gut brain-axis in the context of the MetS.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Animals and Treatment**

All animal care and use were conducted according to the relevant French (Directive 87/148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and international (Directive 10/63, European Community) legislation and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (approval ID: 5012047-A). Every effort was made to minimize suffering and the number of animals used. Five week old male *db/+* (C57BLKS/J-leprdb/+; n=28) and *db/db* mice (C57BLKS/J-leprdb/leprdb; n=28) from Charles River Laboratories (France) were housed individually under standardized conditions with a 12-h light/dark cycle. Food (Lab

Diet 5k52, Charles River, France) and water were available *ad libitum*. On arrival, half of the mice of each genotype was randomly allocated to the control groups receiving tap water or to the prebiotic groups drinking tap water supplemented with the prebiotic oligofructose (OFS) (Orafti®P95 kindly provided by Beneo Orafti, Belgium) in a concentration adequate to reach an intake of 0.6 g/day/mouse. Food and liquid (water or OFS) intake and body weight were measured once a week during the 9 weeks of treatment. Mice were individually handled daily for 1 week before behavioral tests were initiated to minimize stress reactions to manipulation.

## **2.2. Behavioral Measures**

Behavioral measures to assess anxiety-like behaviors and spatial memory began after 4 weeks of supplementation. One behavioral experiment was done per week, always in the morning, under conditions of dim light and low noise as follows: Open-Field, Y-maze, Elevated Plus-Maze and Light/Dark box. All behavioral experiments except the Light/Dark box were automatically scored by Smart tracking software (Bioseb, France). The Light/Dark box was scored manually by a trained observer blind to treatment. All testing equipment was thoroughly cleaned between each session.

### **2.2.1. Open-Field (OF).**

To assess anxiety-like behavior mice were exposed to an unknown square area (40x40cm) with 16cm high walls without bedding litter and placed in a brightly lit room (60 lux in the center), which constitutes an anxiogenic setup (Dinel et al., 2011). A central area was defined as a virtual 10x10cm square in the middle. Mice were placed in alternate corners and allowed to freely explore the OF for 10 min. Parameters measured to evaluate anxiety-like behavior were the number of entries and the percentage of time spent in the central area.

### **2.2.2. Y-Maze.**

Spontaneous spatial recognition in the Y-maze was used as a hippocampal-dependent test as previously described (Dellu et al., 2000; Dinel et al., 2011; Labrousse et al., 2009). The apparatus was a Y-shaped maze with three identical arms (34x8x14cm). Visual cues were placed in the testing room and kept constant during the whole test. Discrimination of novelty vs. familiarity was based on the different aspects of the environment that the mouse can perceive from each arm of the Y-maze. In a first trial (acquisition phase) one of the arms was closed with a door and the mouse could only explore two of the arms for 5 min, the “Entrance” arm, which was alternated for each mouse and the “Familiar” arm. In the second

trial (retrieval phase), which occurred after a 30 min inter-trial interval, the mouse was placed in its previous “Entrance” arm and allowed free access to all three arms. Soiled corncob litter was used to cover the floor and was mixed before each trial to erase scent cues. The walls of the maze were also wiped clean before each use. Parameters measured included time spent in each arm, from which a Discrimination Index (DI) was calculated according to:  $\text{time spent in Novel arm} / (\text{time spent in Novel} + \text{Entrance} + \text{Familiar arm}) \times 100$ . A DI significantly higher than chance level (33.33%) indicated recognition.

### 2.2.3. Elevated Plus-Maze (EPM).

In order to evaluate anxiety-like behavior, mice were placed in a plus-shaped maze made of four arms (30x8cm), two of which being closed with walls (15cm high) providing shelter (Dinel et al. 2011). Open arms were anxiogenic since the maze was elevated 120cm from the floor. Mice were placed in the center of the maze facing one of the open arms and allowed to freely explore for 5min. A reduction of the percent of time spent and number of entries into the open arms is considered as an anxiety-like index, independent of locomotor activity.

### 2.2.4. Light/Dark box (L/D box).

Anxiety-like behavior was also assessed in the L/D box. The apparatus was composed by a white acryl box with an open-top compartment (30x21x21cm with 205 lux) communicating through an opening (7x5cm) to a black lidded one (14x21x21cm with <5 lux). The communication between compartments was blocked for 5 seconds after inserting the mouse in the lidded compartment and the 10-min test began thereafter. Both compartments were thoroughly cleaned before each use to remove odor cues. The number of transitions between the two chambers and time spent in the light compartment were recorded to assess anxiety-like behavior (Bosch-Bouju et al., 2016).

## 2.3. Glucose tolerance test

A glucose tolerance test was performed after 9 weeks of treatment (age: 14 weeks), as previously described (Everard et al., 2011). Food was removed before the onset of night cycle and mice were tested for their tolerance to glucose after 13-h fasting period. Mice were weighed and fasting glycemia measured before an intraperitoneal (ip) injection of glucose (2g/kg prepared in NaCl solution), and at 15, 30, 60 and 120 min after. Blood sampling of glucose was made by clipping off the end of the tail to collect a droplet of blood that was

immediately analyzed with a Glucometer (Accu-Chek; Roche Diagnostics). Food was returned just after the last blood collection.

#### **2.4. Insulin resistance test**

The insulin resistance test was performed after 9 weeks of treatment (age: 14 weeks) in fed animals. Mice were weighed and glycemia measured before an ip injection of human insulin (0.75IU/kg; Insulin Glargine, Lantus.), and at 15, 30, 45, 60 and 120 min after. Blood sampling of glucose was done as above. The insulin solution was prepared in an aqueous vehicle solution (glycerol 0.2 mol/l, m-cresol 0.025 mol/l, ZnCl<sub>2</sub> 0.2 μmol/l) adjusted to pH 4.0, as previously described (Stammberger et al., 2002).

#### **2.5. Tissue Sampling**

After 10 weeks of treatment (age: 15 weeks), overnight fasted mice were anesthetized by isoflurane inhalation within a few seconds after being picked up from their home cage. Blood samples were immediately collected via cardiac puncture into EDTA (10%)-coated tubes. After centrifugation (10 min, 3000g, 4°C), aliquots of plasma were stored at -80°C for further analysis. Seven to eight mice from each experimental group were immediately perfused with chilled PBS via the ascending aorta to remove all traces of blood from tissues. Brains were rapidly extracted from the skulls and carefully dissected. The hypothalamus and hippocampus were immediately collected into labeled-sterile tubes which were frozen with dry ice and then stored at -80°C until assaying. The cecal content was also collected post-mortem in RNA-free tubes, immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until assay for bacteria composition. The remaining mice of each group were transcardially perfused with PBS (pH 7.4) followed by a 4% paraformaldehyde fixative solution (prepared in PBS, pH 7.4). Brains were removed, immediately immersed for 24h in fixative, and then processed as described below (see Immunohistochemistry section).

#### **2.6. Biochemical and histological measures**

##### **2.6.1. Plasma Cytokines and Hormones Assay.**

Plasma cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10) and hormones (GLP-1, insulin, resistin, ghrelin and glucagon) were measured with the mouse cytokines and metabolic hormones Milliplex kits (Merk-Millipore, France) following the manufacturer's instructions as previously described (Dinel et al., 2011; 2014). Total plasma corticosterone was measured with an in-house RIA using a highly specific antibody provided by H. Vaudry (University of



Rouen, France) as previously described (Richard et al., 2010). All samples were run in duplicate.

### 2.6.2. Reverse Transcription and Real-Time RT-PCR.

Total RNA was isolated from extracted structures (hippocampus and hypothalamus) using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies™) and reverse-transcribed as previously described (André et al., 2008; Dinel et al., 2011; 2014). Real-time RT-PCR for cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10) and tight junction proteins (ZO-1 and Occludin) of the blood brain barrier (BBB) was performed using Taqman gene expression assays for sequence-specific primers purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA). Reactions were performed in duplicate according to manufacturer instructions (André et al., 2008; Dinel et al., 2011; 2014). To measure expression of hypothalamic peptides (CART, POMC, NPY), quantitative PCR was performed using SYBR® Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) following the protocol previously described (Madore et al., 2014). Primers sequences (see Table 1) were designed using Primer Express® Software in order to avoid genomic DNA amplification. mRNA levels of target genes were normalized from  $\beta$ 2-microglobulin expression in each sample. Fluorescence was determined on an ABI PRISM 7500-sequence detection system (Applied Biosystems, Foster, CA). The calculation of relative expression levels was performed according to the methods of Schmittgen & Livak (2008) and plotted as fold change relative to the appropriate control condition.

**Table 1. Sybr green primers sequences**

<b>Target gene</b>	<b>Forward 5'-3'</b>	<b>Reverse 5'-3'</b>
<b>CART</b>	AAGTCCCCATGTGTGACGCT	TGGCCCCTTTCCTCACTG
<b>NPY</b>	TCCAGCCCTGAGACACTGATT	CACCACATGGAAGGGTCTTCA
<b>POMC</b>	ACGGAGAGCAACCTGCTGG	GCGAGAGGTCGAGTTTGCA

### 2.6.3. Bacteria analysis.

Metagenomic DNA was extracted from the cecal content using a QIAamp-DNA stool minikit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. qPCR for total bacteria, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Roseburia* spp., and *Bacteroides-Prevotella* spp. was performed as previously described (Everard et al., 2011).

#### 2.6.4. Immunohistochemistry and unbiased stereological counting of GFAP and Iba-1 positive cells.

After a 24h-period of fixation in a 4% paraformaldehyde solution, brains were sectioned frontally at a width of 40  $\mu\text{m}$  with a cryostat (Leica, Rueil Malmaison, France). Free-floating sections were processed with a standard immunohistochemical procedure. A one-in-six section was treated for immunoreactivity. Astrocytes and microglia were respectively identified in the arcuate nucleus (ArcN) and hippocampus by using a goat polyclonal GFAP antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA; 1/1000) followed by a biotinylated rabbit anti-goat antibody (Dako Glostrup, Denmark; 1/2000), and a rabbit polyclonal Iba-1 antibody (Wako, Neuss, Germany; 1/1000) followed by a biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector, Burlingam, USA; 1/2000).

The unbiased stereological sampling method based on optical dissector stereological probe CA1, CA3 and dentate gyrus (DG) (Madore et al., 2014). Stereological analysis was performed using an Olympus BX51 microscope with a motorized Z and X-Y stage encoders linked to a computer-assisted stereological system (Mercator digital imaging system, Explora Nova, La Rochelle, France). For each animal, ArcN, CA1, CA3 and DG boundaries were delimited at low magnification (x2.5) according to Franklin & Paxinos mouse brain atlas. ArcN, CA1, CA3 and DG boundaries were drawn on every sixth section and the first was randomly chosen. Each structure volume was calculated using the formula " $V_{(XX)} = \Sigma S td$ "; where " $\Sigma S$ " is the sum of surface areas ( $\mu\text{m}^2$ ), " $t$ " the average section thickness and " $d$ " the distance between the sections (Theoret et al., 1999). " $t$ " was estimated to 10 $\mu\text{m}$  after immunohistochemistry processing and guard zones of 2 $\mu\text{m}$  were used to ensure that section top and bottom were never included in the analysis. Eleven sections were used for each animal. From a random start position, a computer-generated sampling grid placed the counting frames that were used to count the cells/ $\text{mm}^2$ /animal for each brain region at a 40 $\times$  magnification. Microglia and astrocytes were counted in the whole slice thickness, only if more than half the cell was inside the two consecutive boundaries taken into account. Split cell counting error was corrected by using the Abercrombie formula (Abercrombie, 1946). To estimate the number of positive immunoreactive cells, we used:  $N = V_{(XX)} (\Sigma Q^- / \Sigma V_{(dis)})$ ; where  $N$  is the estimation of the number of positive immunoreactive cells,  $V$  the volume of each brain structure,  $\Sigma Q^-$  the number of cells counted in the frames, and  $\Sigma V_{(dis)}$  the total volume of the frames (Theoret et al., 1999).

#### 2.6.5. Assessment of microglia morphology.

Iba-1 immunoreactive microglia were visualized under the 100X oil lens [numerical aperture (NA), 1,25] using a Leica mcd microscope. Number of primary processes was assessed in CA1, DG and ArcN, as previously described (Madore et al., 2014). Three sections of a one-in-six series were used for each of these regions. Four microglia cells per section were used to estimate the number of primary process, giving a total of 12 cells/region of interest.

#### 2.6.6. Immunohistochemical detection of doublecortin-positive cells.

Neurogenesis was evaluated in the DG region by determining the number of immature neurons characterized by the endogenous marker doublecortin (DCX), a cytoplasmic protein transiently expressed in newborn neurons only (Brown et al., 2003). To assess DCX-immunoreactivity, 40- $\mu$ m sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK; 1/800), followed by a secondary biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector, Burlingam, USA; 1/200) and avidin-biotin peroxidase complex (Vector, Burlingam, USA; 1/1000). The presence of peroxidase was then revealed using diaminobenzidine (DAB) as a substrate according to the nickel-enhanced glucose oxidase method giving a black precipitate. The number of DCX-positive cells was estimated by using a modified version of the optical fractionator method with a systematic random sampling of every 6 sections along the rostro-caudal axis of the DG. On each section, immunoreactive cells in the granular and subgranular layers of the DG were counted. All results are expressed as the total number of cells in the whole DG. The fraction of DCX-immunoreactive new neurons with large vertical dendrites (mature new neurons) corresponding to a higher level of differentiation was also counted (Boitard et al., 2014).

### 2.7. Statistical Analysis

Experiments were conducted as a completely randomized design. Repeated Measures ANOVA were performed on data collected across several time points to assess main effects and interactions, and planned contrasts or Fisher's LSD *post-hoc* tests were used for punctual comparisons. A two-way ANOVA was used to evaluate genotype (*db/+* vs. *db/db*) and treatment (water vs. OFS) effects and *post-hoc* Student's t tests to look at specific comparisons when interactions between both factors were significant. Correlations and regression analysis were also conducted to look at relationships between variables of interest. All results are graphed as Mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### **3.1. Prebiotic (OFS) treatment increased gut levels of Bifidobacterium spp. in db/db mice**

No genotype differences were found between untreated *db/+* and *db/db* mice regarding total bacteria number or the abundance of *Lactobacillus* spp., *Roseburia* spp. and *Bacteroides-Prevotella* spp. populations, whatever the treatment (Table 2). On the contrary, both genotype ( $F_{(1,44)}= 14.7$ ;  $p<0.001$ ) and OFS treatment ( $F_{(1,44)}= 8.2$ ;  $p<0.001$ ) affected the abundance of *Bifidobacterium* spp., which was particularly increased in OFS-treated *db/db* mice (genotype x treatment:  $F_{(1,44)}= 4.0$ ;  $p=0.05$ ) compared to their controls (water vs.OFS:  $p<0.01$ ) or to *db/+* groups ( $p<0.001$ ). As expected, OFS treatment modified the gut microbiota composition in *db/db* mice, as previously shown in other rodent models of obesity (Cani et al., 2007; Everard et al 2011).

**Table 2. Effect of oligofructose supplementation on gut microbiota population**

Abundance (log bacteria/g cecal content)	<i>db/+</i>		<i>db/db</i>	
	Water	Oligofructose	Water	Oligofructose
Total bacteria	11.18 ± 0.15	11.28 ± 0.10	11.36 ± 0.16	11.28 ± 0.14
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.12 ± 0.45	7.77 ± 0.43	7.60 ± 0.23	8.01 ± 0.22
<i>Roseburia</i> spp.	7.57 ± 0.56	8.44 ± 0.22	8.55 ± 0.20	8.30 ± 0.33
<i>Bacteroides-Prevotella</i> spp.	9.37 ± 0.18	9.55 ± 0.11	9.57 ± 0.19	9.45 ± 0.32
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.78 ± 0.24	7.94 ± 0.17	8.12 ± 0.17	9.04 ± 0.18** ###

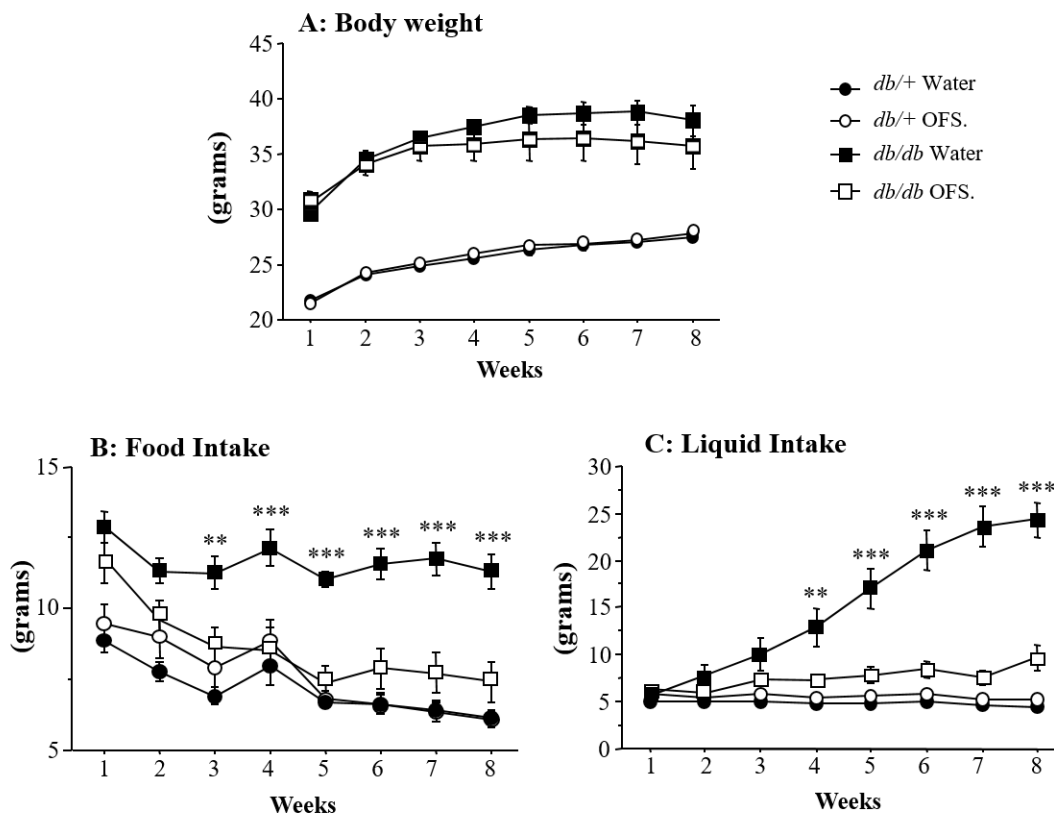
###:  $P<0.001$  for *db/+* vs. *db/db*

\*\* :  $P<0.01$  for *db/db* water vs. *db/db* oligofructose

#### **3.2. Prebiotic treatment improved eating behavior and glycemic dysregulations in db/db mice**

In agreement with their expected phenotype, *db/db* mice weighed significantly more than *db/+* mice during the entire experiment (genotype:  $F_{(1,49)}= 207.3$ ,  $p<0.001$ ; time:  $F_{(7,343)}= 54.3$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 1A). Although OFS treatment did not significantly impact body weight, *db/db* mice treated with OFS tended to progressively gain less weight over time than untreated *db/db* mice, whereas both *db/+* groups displayed similar body weight gain (genotype:  $F_{(1,343)}= 12.4$ ,  $p<0.001$ ; genotype x time:  $F_{(7,343)}= 2.2$ ,  $p<0.05$ ; data not shown). Consequently, OFS treatment abolished the difference of body weight gain found between control *db/+* and *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,175)}= 19.6$ ,  $p<0.001$ ; genotype x time:  $F_{(7,175)}= 3.4$ ,

$p < 0.01$ ). This was associated with a higher food (genotype:  $F_{(1,336)} = 36.4$ ,  $p < 0.001$ ; genotype x time:  $F_{(7,336)} = 2.2$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 1B) and liquid intake (genotype:  $F_{(1,343)} = 68.5$ ,  $p < 0.001$ ; genotype x time:  $F_{(7,343)} = 38.6$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 1C) in control *db/db* mice than in *db/+* mice. Interestingly, OFS treatment progressively reduced both food (treatment:  $F_{(1,336)} = 8.1$ ,  $p < 0.01$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,336)} = 14.8$ ,  $p < 0.01$ ) and liquid (treatment:  $F_{(1,343)} = 21.9$ ,  $p < 0.001$ ; genotype x treatment x time:  $F_{(7,343)} = 24.7$ ,  $p < 0.001$ ) intake, in particular in *db/db* mice. Indeed, OFS-treated *db/db* mice consumed significantly less food than their controls ( $p < 0.001$ ), whereas both *db/+* groups were not statistically different ( $p > 0.1$ ). Similarly, *db/db* mice treated with OFS showed a stable, close to normal liquid intake, whereas untreated *db/db* mice were the only ones drastically increasing their drinking over time (treatment x time:  $F_{(7,161)} = 37.6$ ,  $p < 0.001$ ).

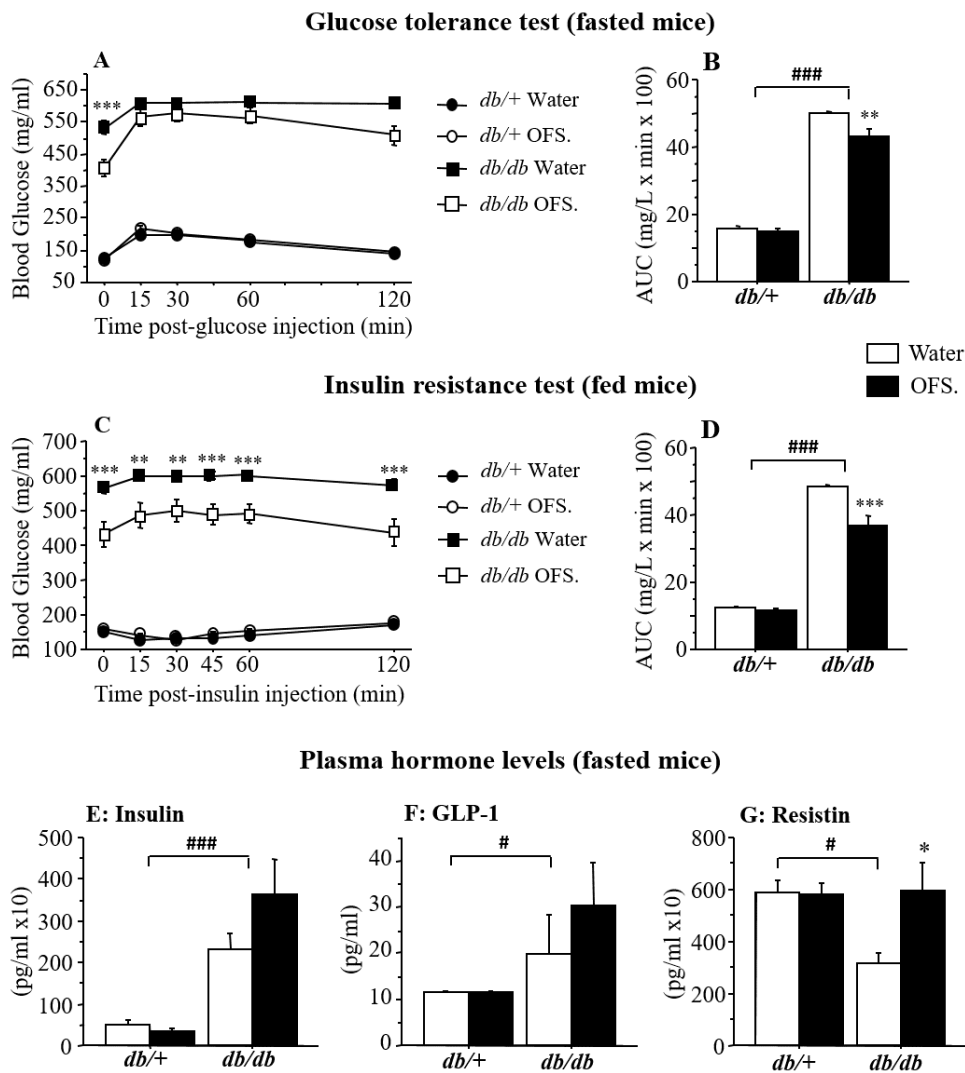


**Figure1:** Follow up weight, food intake and liquid intake (oligofructose: OFS and water). A). Blunted weight gain of supplemented *db/db* mice. B) Progressive decrease in food intake of supplemented *db/db* mice. C) Amount of OFS solution vs. water consumption in *db/db* mice and similar quantities of OFS intake by *db/db* and *db/+* groups (n=13-14/group. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  comparison of *db/db* group).

As OFS has been previously shown to improve glucose tolerance in several models of obesity and diabetes (Cani et al., 2006; Everard et al., 2011), and it improved excessive eating

behavior in *db/db* mice, we measured its impact on their glycemetic dysregulations. We therefore assessed basal blood glucose levels in both fasted and fed conditions, and during glucose tolerance and insulin resistance tests. As expected, *db/db* mice had higher basal fasted (genotype:  $F_{(1,50)}= 461.0$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2A) and fed (genotype:  $F_{(1,50)}= 305.1$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2C) blood glucose levels than *db/+* mice. OFS treatment significantly reduced these levels in both fasted (treatment:  $F_{(1,50)}= 12.5$ ,  $p<0.001$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,50)}= 17.1$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2A) and fed *db/db* mice (treatment:  $F_{(1,50)}= 13.2$ ,  $p<0.001$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,50)}= 9.8$ ,  $p<0.01$ ; Fig. 2C), which displayed in both conditions basal glucose levels still higher than *db/+* groups, but significantly lower than their non-treated counterparts ( $p<0.001$ ). Blood glucose levels rapidly increased after ip glucose injection in all treated mice, although the time-course of such changes depended on both genotype and OFS treatment (genotype:  $F_{(1,50)}= 896.9$   $p<0.001$ ; genotype x treatment x time:  $F_{(4,200)}= 8.9$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2A). Indeed, OFS treatment significantly improved glucose tolerance in *db/db* mice (treatment:  $F_{(1,96)}= 7.1$ ,  $p<0.05$ ), whereas it had no effect in *db/+* mice ( $p>0.1$ ). Of note, this improvement was likely underestimated as most control *db/db* mice displayed blood glucose levels higher than the highest point of the calibration curve (600 mg/ml). Additionally, these levels remained elevated during the entire glucose tolerance test in control *db/db* mice but started reducing 1h after glucose injection in OFS-treated *db/db* mice. Akin with these results, calculation of the area under the curve (AUC) confirmed that supplemented *db/db* mice had significantly higher glucose tolerance compared to their controls (genotype x treatment:  $F_{(1,50)}= 4.4$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 2B), while *db/+* mice were the same whether they were treated or not. Interestingly, similar results were obtained regarding insulin resistance that characterized *db/db* mice. All *db/db* mice maintained high blood glucose levels compared to *db/+* mice after being injected with insulin (genotype:  $F_{(1,50)}= 305.1$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2C). Moreover, blood glucose levels slightly decreased in *db/+* mice over the first minutes following insulin injection while they increased in *db/db* mice (genotype x time:  $F_{(5,250)}= 15.6$ ,  $p<0.001$ ). Treatment with OFS selectively reduced blood glucose levels in *db/db* mice but not *db/+* mice (treatment:  $F_{(1,50)}=13.2$ ,  $p<0.001$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,50)}= 9.8$ ,  $p<0.01$ ), whatever the time-point post-insulin challenge (no significant time effect or time by treatment interaction). These findings were confirmed by calculation of the AUC, which was significantly reduced after OFS treatment in *db/db* mice only (genotype x treatment:  $F_{(1,50)}= 13.4$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2D). Thus, OFS treatment improved glycemetic dysregulations displayed by *db/db* mice, although it did not significantly change plasma levels of insulin (Fig. 2E) and GLP-1 (Fig. 2F), which remained higher in

*db/db* than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,31)}= 36.0$ ,  $p<0.001$  and  $F_{(1,31)}= 5.2$ ,  $p<0.05$  respectively) regardless their treatment. On the contrary, resistin levels, which were lower in control *db/db* mice than in all other groups ( $p<0.05$ ; Fig. 2G), were normalized by OFS treatment (treatment:  $F_{(1,34)}= 3.7$ ,  $p=0.06$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,34)}= 3.9$ ,  $p<0.05$ ). Lastly, ghrelin and glucagon levels were very low and similar in all groups (data not shown). Improved dysregulated eating behavior and glycemic control in *db/db* mice were therefore associated with increased plasma resistin levels.



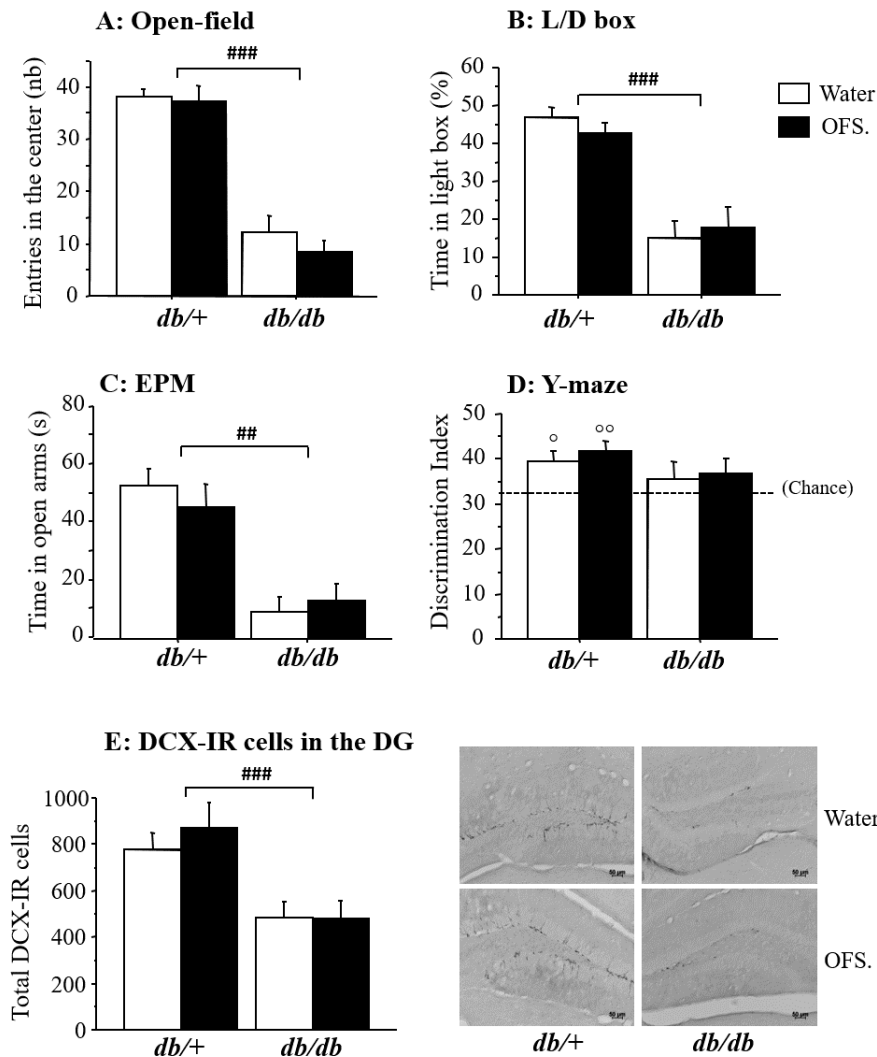
**Figure 2.** Assessment of glucose homeostasis and plasma hormones. A) Hyperglycemia during two hours after glucose challenge (2 g/kg, ip). B) Comparison of glucose tolerance (AUC) showing milder hyperglycemia for supplemented *db/db* mice. C) Glycemia during two hours after insulin injection (0.75IU/kg, ip). D) Comparison of insulin resistance (AUC) showing milder insulin resistance (n=13-14/group. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  comparison of *db/db* groups). E-G) Hormones measured showing genotype effect with *db/db* mice remaining higher in insulin and GLP-1 levels, whereas resistin is normalized by oligofructose (OFS) treatment in *db/db* mice (n=8-9/group. # $p<0.05$ ; ## $p<0.01$  genotype effects; \* $p<0.05$  comparison of *db/db* groups).

**3.3. Prebiotic treatment failed to improve anxiety-like behavior, spatial memory deficits and reduced hippocampal neurogenesis displayed by db/db mice**

We previously reported increased anxiety-like behavior and reduced spatial memory performances in *db/db* mice (Dinel et al., 2011; 2014). Based on mounting evidence illustrating the impact of gut microbiota on brain and behavior (Cryan & Dinan, 2012), we tested if OFS treatment could improve these behavioral alterations. As anticipated, *db/db* mice spent proportionally less time (genotype:  $F_{(1,49)}=12.8$ ,  $p<0.001$ ; data not shown) and visited less often the central area of the OF (genotype:  $F_{(1,49)}=185.2$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3A) or the lighted compartment of the L/D box (genotype:  $F_{(1,50)}=42.6$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3B), which are considered as more anxiogenic than the periphery or the dark compartment respectively. Similarly, *db/db* mice displayed less entries ( $F_{(1,48)}= 22.2$ ,  $p<0.001$ ; data not shown) and reduced time into the open arms of the EPM ( $F_{(1,45)}= 16.5$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3C) compared to *db/+* mice. These consistent data confirmed greater anxiety-like behaviors in *db/db* mice than in *db/+* mice since these behavioral alterations were independent of locomotor impairment, as previously shown (Dinel et al., 2011; 2014). For example, distance covered by *db/db* mice in the OF was reduced in the central area compared to *db/+* mice but increased at the periphery ( $p<0.01$ ; data not shown), suggesting that *db/db* mice avoided the central area. More importantly, chronic OFS treatment failed to reduce anxiety-like behavior as no significant effect of treatment was found whatever the genotype and the behavioral paradigm used (OF, EPM or L/D box).

Akin with these findings, both OFS-treated and non-treated *db/db* mice randomly explored the different arms of the Y-maze as revealed by an index of discrimination (calculated as the percent of time spent exploring the novel arm) equal to chance level (Fig. 3D). Importantly, these data likely reflect spatial memory deficits rather than motor, sensory or motivational disturbances since *db/db* mice were previously shown to preferentially explore the novel arm compared to familiar arms when tested with a short 2-min inter-trial interval (Dinel et al., 2011). On the contrary, discrimination index was significantly higher than chance level in both water ( $t=2.70$ ,  $p<0.05$ ) and OFS ( $t=3.21$ ,  $p<0.01$ ) *db/+* groups, meaning that they spent more time exploring the novel arm, which they recognized, than the familiar one.





**Figure 3.** Anxiety-like behavior and hippocampal-dependent spatial memory performances. A) Genotype main effect in entries to center of the open-field. B) Genotype main effect in time spent in lighted room of the light/dark box. C) Genotype main effect in time spent in anxiogenic arm of the Plus-maze. D) No better than chance mnemonic discrimination for *db/db* mice in the Y-maze ( $n=13-14/\text{group}$ ;  $^{\circ}p<0.05$ ;  $^{\circ\circ}p<0.01$  difference from chance level;  $^{\#}p<0.01$ ;  $^{\#\#}p<0.001$  genotype effects). E) Genotype main effect in DCX-positive cells in the DG of the hippocampus ( $n=6/\text{group}$ ;  $^{\#\#\#}p<0.001$  genotype effects).

As hippocampal neurogenesis was shown to play an important role in spatial memory (Boitard et al., 2012), we assessed whether it was impaired in *db/db* mice. Neurogenesis was evaluated by determining the number of immature neurons in the DG characterized by the endogenous marker DCX. Interestingly, spatial memory deficits were associated in *db/db* mice with a significant reduction in the number of DCX-positive cells (genotype:  $F_{(1,20)}=16.9$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3E) compared to *db/+* mice. A positive correlation, though marginally significant ( $r=0.58$ ;  $p=0.06$ ), was indeed found in *db/db* mice between this number and the time spent exploring the novel arm of the Y-maze. In agreement with the failure of OFS treatment in improving behavioral alterations displayed by *db/db* mice, no significant

treatment effect was found on the number of DCX-positive cells whatever the genotype. However, further exploring how treatment and this number were related to spatial memory performances with a regression analysis, we found that it was the combined effect of treatment and number of DCX-positive cells that predicted performances of *db/db* mice in this task, while treatment alone was not an effective predictor (table 3). Taken together, these results confirmed increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits in *db/db* mice, and although they did not show any detectable beneficial effect of OFS treatment on those measures, they suggest a link between the treatment, the number of DG neurons, and spatial memory performances in *db/db* mice.

**Table 3. Regression analysis for time spent in the new arm of the Y-maze in *db/db* mice**

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	p
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	40.273	36.513		1.103	0.299
Treatment	33.947	22.487	0.449	1.51	0.165
2 (Constant)	-51.532	39.918		-1.291	0.233
Treatment	41.357	16.378	0.548	2.525	0.036*
Nb. Neurons DG	0.16	0.052	0.663	3.057	0.016*

ANOVA for Model 1:  $F(1,9)= 2.28$   $p=0.17$ ,  $R^2=0.202$

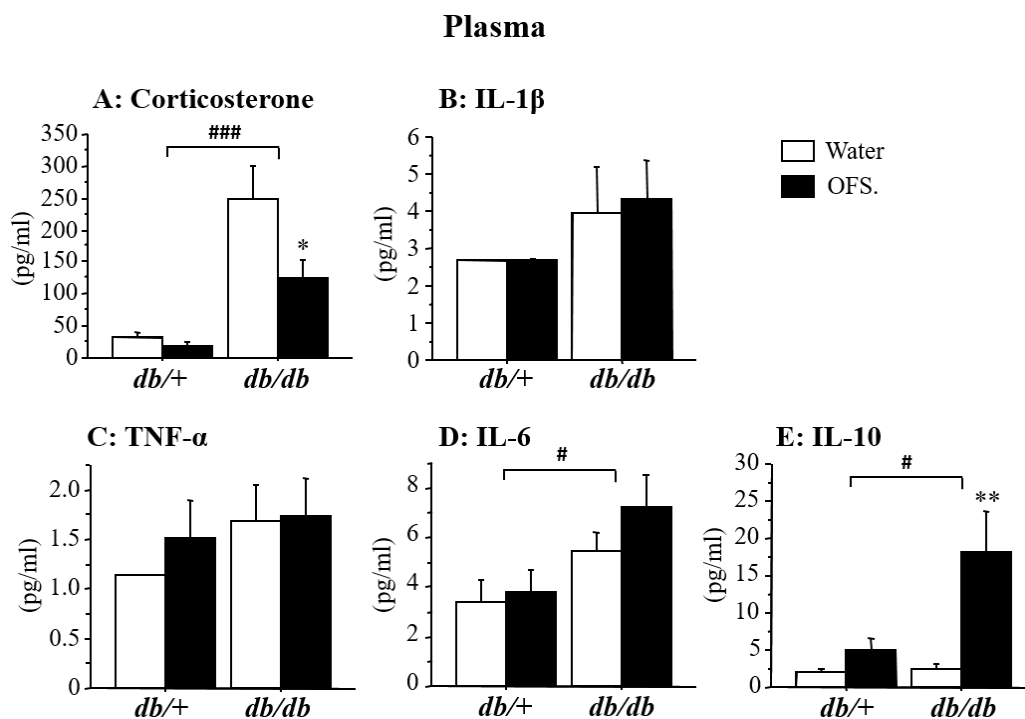
ANOVA for Model 2:  $F(2,8)= 6.87$   $p=0.018^*$ ,  $R^2=0.632$

### **3.4. Prebiotic treatment reduced corticosterone release and increased plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in *db/db* mice**

Among the main biological factors shown to be altered in *db/db* mice and able to act within the brain to modulate metabolic and/or behavioral reactivity, corticosterone and cytokines are likely candidates (Gregor & Hotamisligil 2011; Marques et al., 2009). We therefore determined whether OFS treatment could normalize over-activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and/or inflammatory disturbances displayed by *db/db* mice. As previously shown (Dinel et al., 2011; 2014), *db/db* mice displayed higher plasma corticosterone levels than *db/+* mice (genotype:  $F(1,47)= 37.3$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 4A). Interestingly, OFS treatment significantly reduced corticosterone concentrations in both genotypes (treatment:  $F(1,47)= 6.6$ ,  $p<0.05$ ) but this effect was particularly marked in *db/db* mice (genotype x treatment:  $F(1,47)= 4.5$ ,  $p<0.05$ ). Consequently, OFS-treated *db/db* mice

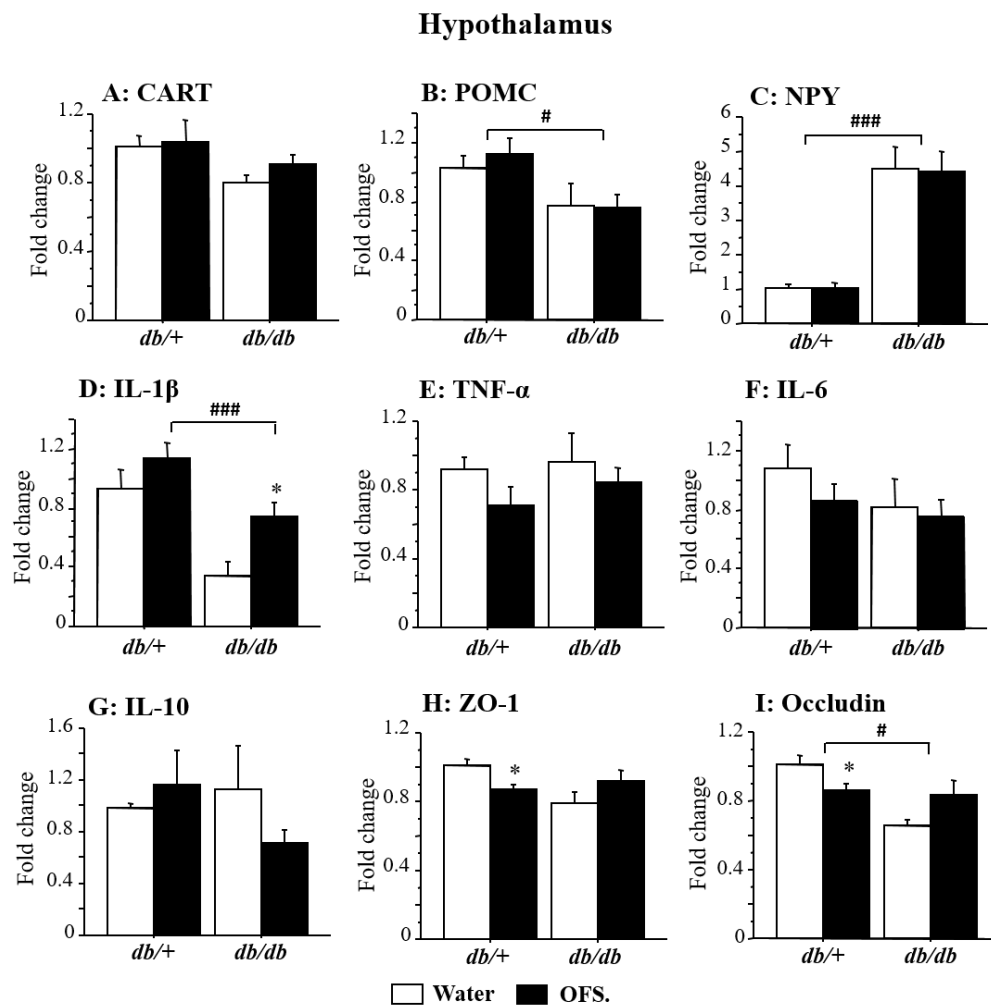
displayed plasma levels of corticosterone significantly lower than their untreated controls ( $p < 0.05$ ).

Regardless their treatment, *db/db* mice displayed similar plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  than *db/+* mice (Fig. 4B,C) and higher IL-6 levels (genotype:  $F_{(1,31)} = 7.8$ ,  $p < 0.01$ ; Fig. 4D), which appeared to be negatively correlated with the number of DCX-positive cells in the DG ( $r = -0.94$ ;  $p < 0.001$ ). Interestingly, OFS markedly increased plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (treatment:  $F_{(1,31)} = 11.8$ ,  $p < 0.01$ ; Fig. 4E), in particular in *db/db* mice (treatment x genotype:  $F_{(1,31)} = 5.6$ ,  $p < 0.05$ ). Chronic OFS treatment therefore reduced corticosterone release and stimulated anti-inflammatory mechanisms. The next step was then to measure its impact on brain function, in particular in the hypothalamus and hippocampus, two brain areas respectively involved in the control of energetic metabolism and behavior (Bannerman et al., 2004; Benarroch, 2010).



**Figure 4.** Assessment of corticosterone and main plasma cytokines in water or oligofructose (OFS) groups. A) Hypercorticism attenuated in supplemented *db/db* mice ( $n = 13-14$ /group). B-C) Inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  not significantly different across groups. D) Genotype effect on inflammatory cytokine IL-6. E) Anti-inflammatory cytokine IL-10 substantially increased in supplemented *db/db* ( $n = 8-9$ /group; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  genotype effects; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  comparison of *db/db* groups).

**3.5. Prebiotic treatment altered brain inflammation and blood brain barrier integrity**



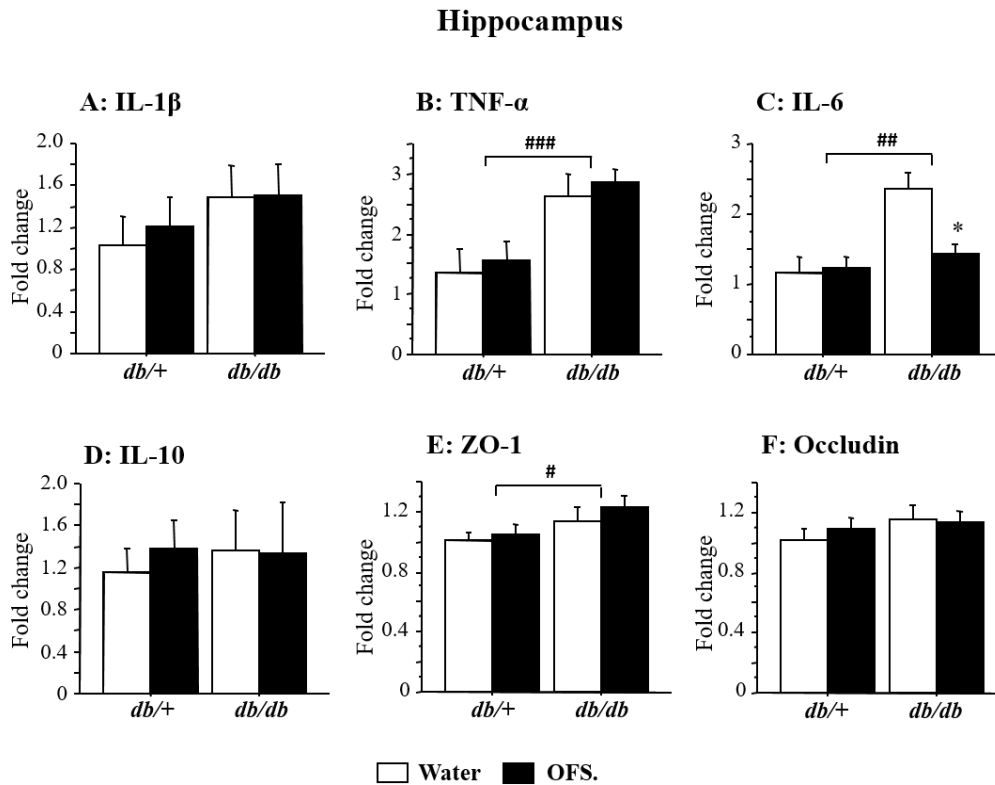
**Figure 5.** Assessment of hypothalamic mRNA expression of orexigenic or anorexigenic peptides, cytokines and tight-junction proteins. A-C) Genotype effect on some known anorexigenic (POMC) and orexigenic (NPY) peptides. D-G) IL-1 $\beta$  is reduced in *db/db* but restored in oligofructose (OFS)-supplemented group, while inflammatory (TNF- $\alpha$  and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines are not significantly different across groups. H-I) Tight-junction protein occludin is reduced in *db/db*, OFS significantly reduces mRNA expression of both ZO-1 and occludin in *db/+* mice (n=8-9/group; #*p*<0.05; ###*p*<0.001 genotype effects; \**p*<0.05 comparisons within *db/+* or *db/db* groups).

The hypothalamus is a key player in physiological homeostasis, in particular through the local expression of several key molecules, including orexigenic or anorexigenic peptides or cytokines, some of which already known to be altered in *db/db* mice (Dinel et al., 2011; Reaux-Le Goazigo et al., 2011). In agreement with their increased food intake, *db/db* mice displayed here reduced mRNA expression of the anorexigenic peptides CART (genotype:  $F_{(1,25)} = 4.0$ ,  $p = 0.057$ ; Fig. 5A) and POMC ( $F_{(1,23)} = 7.6$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 5B), together with

increased expression of the orexigenic peptide NPY ( $F_{(1,26)}= 67.5$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 5C). However, OFS treatment did not normalize the expression levels of these peptides. Both *db/+* and *db/db* mice also displayed similar hypothalamic TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 mRNA expression levels (Fig. 5E-G), independently of being or not treated with OFS, but they differed regarding the anorexigenic cytokine IL-1 $\beta$  (Fig. 5D). Indeed, reduced IL-1 $\beta$  mRNA expression displayed by control *db/db* mice compared to *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,20)}= 20.0$ ,  $p<0.001$ ) was normalized by OFS treatment ( $F_{(1,20)}= 7.6$ ,  $p<0.05$ ; water vs. OFS *db/db* mice:  $p<0.05$ ). Interestingly, the profile of cytokine expression was different in the hippocampus, in agreement with previously published data (Dinel et al., 2014). Whereas hippocampus IL-1 $\beta$  mRNA expression was similar in all groups regardless genotype and treatment (Fig. 6A), TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression was found up-regulated in *db/db* mice (genotype:  $F_{(1,22)}= 14.8$ ,  $p<0.001$ ;  $F_{(1,23)}= 11.1$ ,  $p<0.01$  respectively; Fig. 6B,C). Interestingly, IL-6 but not TNF- $\alpha$  expression was normalized by OFS in *db/db* mice (treatment:  $F_{(1,23)}= 4.2$ ,  $p=0.05$ ; genotype x treatment:  $F_{(1,23)}= 5.9$ ,  $p<0.05$ ), whereas it had no effect in *db/+* mice regardless the cytokine. Lastly, hippocampal expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was similar in all groups (Fig. 6D). Chronic OFS treatment therefore partly normalized cytokine expression in the hippocampus and hypothalamus, this effect selectively affecting however some particular cytokines depending on the brain area.

We then determined whether OFS acted by altering the density of microglia, the main cells releasing cytokines within the brain and recently shown to be influenced by the gut microbiota (Dinan & Cryan, 2016; Erny et al., 2015). No significant difference across groups was found in total density of microglia regardless the brain area (ArcN, CA1, CA3, DG), as revealed by detection of Iba-1 immunoreactivity (Fig. 7). However, a negative correlation was found in the DG of *db/db* mice between microglia density and the number of DCX-positive cells ( $r= -0.64$ ,  $p<0.05$ ), whereas this correlation did not reach significance in *db/+* mice ( $r= -0.54$ ,  $p=0.07$ ). Of note, detailed analysis of microglial morphology assessed by counting the number of primary processes displayed by microglia revealed no significant differences between both genotypes, but an overall significant reduction in microglial ramifications in the hippocampus of OFS-treated mice (treatment:  $F_{(1,20)}= 5.6$ ,  $p=0.01$ , data not shown). This effect was particularly affecting the CA1 area (treatment:  $F_{(1,20)}= 7.8$ ,  $p<0.05$ , data not shown). On the contrary, no significant genotype or treatment effect was found regarding microglial morphology in the ArcN. Since astrocytes also release a variety of neuromodulatory molecules, including pro-inflammatory cytokines (Ridet et al., 1997), we

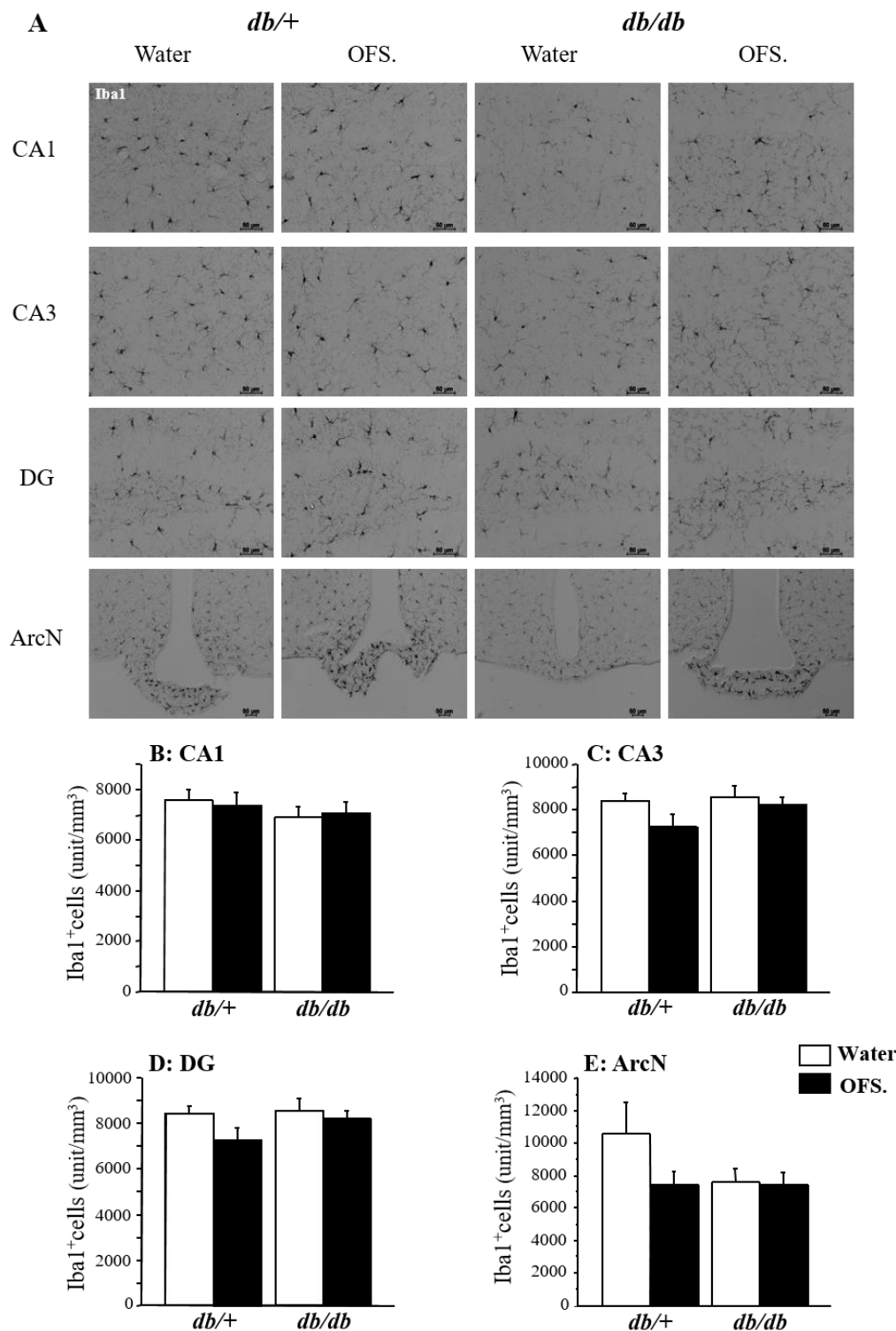
measured astrocyte density in the same brain areas as microglia density by assessing GFAP immunoreactivity. Both *db/+* and *db/db* mice displayed similar density of GFAP positive cells whatever their treatment in both the hypothalamus and hippocampus (Fig. 8). Taken together, these results suggest that OFS-induced alterations of brain cytokine expression were not linked to changes in microglia or astrocytes density.



**Figure 6.** Assessment of hippocampal mRNA expression of cytokines and tight-junction proteins. A-D) Genotype effects on inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 but no significant differences across groups in IL-1 $\beta$  or anti-inflammatory cytokine IL-10, oligofructose (OFS) supplementation rescues IL-6 expression. E-F) Tight-junction protein ZO-1 is increased in *db/db* but no differences across groups for occludin (n=8-9/group; # $p$ <0.05; ## $p$ <0.01; ### $p$ <0.001 genotype effects; \* $p$ <0.05 comparison *db/db* group).

Lastly, we assessed whether OFS acted at the brain level by improving BBB integrity, as reported regarding gut barrier (Cani et al., 2009). We therefore measured mRNA expression of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. Interestingly, ZO-1 (genotype:  $F_{(1,23)}=3.4$ ,  $p=0.07$ ; Fig. 5H) and occludin mRNA expression (genotype:  $F_{(1,26)}= 11.2$ ,  $p<0.01$ ; Fig. 5I) was reduced in the hypothalamus of *db/db* mice compared to *db/+* mice, in particular in untreated ones (*db/db* vs. *db/+* water:  $p<0.01$  and  $p<0.001$  for ZO-1 and occludin respectively). OFS treatment blunted this difference by normalizing both ZO-1 (genotype x treatment:  $F_{(1,23)}= 8.0$ ,  $p<0.01$ ) and occludin (genotype x treatment:  $F_{(1,26)}= 8.2$ ,  $p<0.01$ )

mRNA expression in treated *db/db* mice. Of note, OFS supplementation decreased ZO-1 and occludin mRNA expression in *db/+* mice compared to their non-supplemented controls ( $p < 0.05$ ). On the contrary, expression of ZO-1 was slightly higher in the hippocampus of



**Figure 7.** Assessment of Iba-1-positive cells in the different areas of the hippocampus and in the arcuate nucleus of the hypothalamus. A) Representative images of Iba-1 staining. B-E) Groups do not present differences in the density of Iba-1-positive cells in any of the regions ( $n=6$ /group).

*db/db* mice than *db/+* mice (genotype:  $F_{(1,24)} = 5.3$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 6E), independently of treatment, whereas hippocampal occludin mRNA expression was similar in all mice whatever their genotype or treatment (Fig. 6C). The impact of OFS on the expression of the tight junction proteins differed therefore according to the brain area.

#### **4. DISCUSSION**

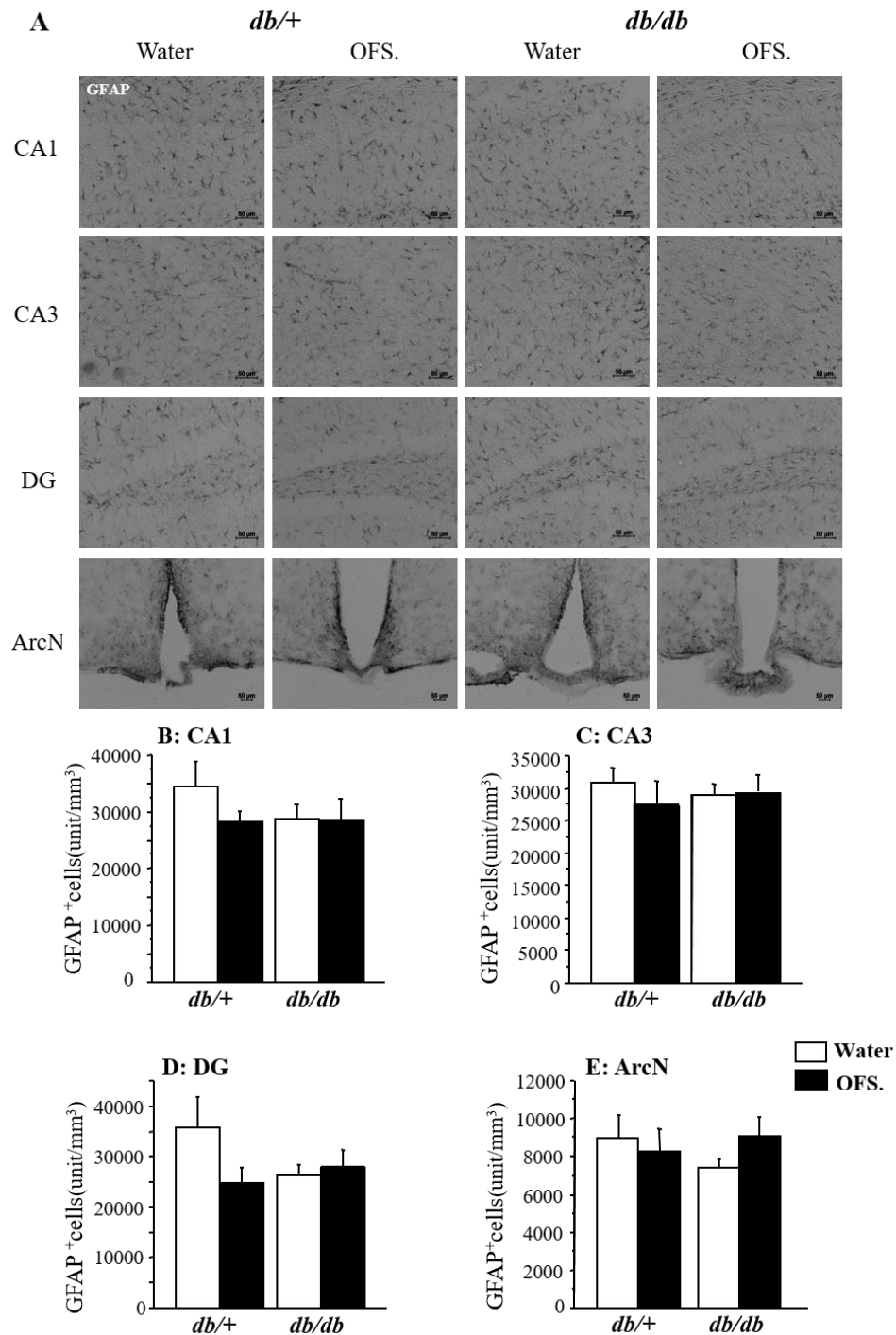
Significant lack of knowledge exists regarding the role potentially played by the gut microbiota in neuropsychiatric symptoms associated with obesity/MetS, although a better understanding of their pathophysiological mechanisms has wide ranging therapeutic implications (Castanon et al., 2015; Farooqui et al., 2012). The current study provides valuable findings relevant to this topic by directly assessing, for the first time, the effect of gut microbiota manipulation with a prebiotic not only on metabolic and behavioral alterations associated with the MetS, but also on their systemic and neurobiological correlates. Importantly, the consequences on both peripheral and brain inflammation was investigated as the inflammatory processes, which have been related with neuropsychiatric comorbidity in obesity (Castanon et al., 2014; Capuron et al., 2016), are key players in the gut-brain axis (Dinan & Cryan, 2016). We show that improvement of metabolic alterations following chronic OFS administration in *db/db* mice was associated with selective reduction of peripheral and central inflammation, which is however not accompanied by detectable improvement of anxiety-like behavior or spatial memory deficits.

Most preclinical studies investigating the contribution of the microbiota to obesity and related comorbidities have used diet-induced obesity models (Bruce-Keller et al., 2015; Cani et al., 2007; Kang et al., 2014; Magnusson et al., 2015; Pyndt-Jorgensen et al., 2014), although high-fat and/or high-sugar diet, which is able to directly influence the gut microbiota composition (Patterson et al., 2014; Turnbaugh et al., 2009), can also alter metabolic health by mechanisms independent from its effect on the microbiota (Lozano et al., 2016; Schwab et al., 2014). Moreover, unlike what has been done in the present study, the impact of the gut microbiota on central regulation of food intake is most of the time poorly considered. Here, we used the *db/db* mice, which progressively developed most of the metabolic alterations characterizing the MetS, including excessive food intake leading to obesity, insulin resistance and hyperglycemia, in agreement with previously published data (Dinel et al 2011; Everard et al 2014). Interestingly, treatment with OFS improved most of these features, as previously



reported in *ob/ob* obese mice (Everard et al., 2011) or in diet-induced obese rats (Cluny et al., 2015). Beyond direct changes in microbiota composition, multiple mechanisms have been proposed to explain this improvement, most of them involving circulating molecules able to regulate feeding behavior and glucose homeostasis, including glucagon, ghrelin, or GLP-1 (Delzenne et al., 2011; Everard et al., 2011). However, the fact that OFS did not affect the production of these molecules in *db/db* mice argues against their significant intervention in the present study. On the contrary, other factors also important for metabolic regulations and for which plasma levels were altered in *db/db* mice, including corticosterone and resistin (Ahima & Flier, 2000; Stepan et al., 2001), were however beneficially affected by OFS. Excess of systemic glucocorticoids has been shown to promote appetite, visceral fat accumulation and insulin resistance (de Guia & Herzig, 2015) whereas reduced glucocorticoid activation, resulting from ablation of the adrenal glands or prebiotic supplementation, is associated with improvement of high-fat diet-induced metabolic alterations (Kim et al., 2013; Perello et al., 2003). Resistin is an adipokine classically associated with insulin resistance and diabetes (Stepan et al., 2001). Akin with previously published data (Dinel et al., 2011; Ye et al., 2013; Xiang et al., 2013), *db/db* mice displayed here reduced plasma resistin levels compared to *db/+* mice. Moreover, OFS-induced improvement of glucose homeostasis and insulin resistance was associated with normalization of those levels. Interestingly, similar association was reported following treatment of *db/db* mice with the antidiabetic drug rosiglitazone (Ye et al., 2013), supporting therefore a potential role for resistin in the metabolic improvement induced by OFS in the present study. Of note, the bacterial lipopolysaccharide (LPS), which is elevated in plasma of obesity/MetS models due to increased gut leakiness (Brun et al., 2007; Cani et al., 2016), has been reported to decrease resistin expression in *db/db* mice (Xiang et al., 2013). Prebiotics are known to reduce gut barrier leakiness, including in *db/db* mice, by acting on expression/distribution of particular tight junction proteins such as ZO-1 and occludin (Cani et al., 2009). The changes in resistin levels we found could be thus linked to reduced endotoxemia. This should in turn contribute to reduce chronic peripheral inflammation that is classically presented as underlying the metabolic deregulation in obesity (Sanz & Moya-Perez, 2014; Tack et al., 2012). Increased anti-inflammatory cytokine IL-10 production displayed by prebiotic-treated *db/db* mice may similarly contribute to the improvement of their metabolic alterations, in agreement with previously published findings reporting a link between changes in gut microbiota

composition, reduced low-grade inflammatory state, and metabolic dysfunctions (Furet et al., 2010; Sokol et al., 2008).



**Figure 8.** Assessment of GFAP-positive cells in the different areas of the hippocampus and in the arcuate nucleus of the hypothalamus. A) Representative images of GFAP staining. B-E) Groups do not present differences in the density of GFAP-positive cells in any of the regions (n=6/group).

This study shows for the first time in *db/db* mice that beneficial effects of prebiotic treatment also extend to the brain, particularly to the hypothalamus that is involved in central regulation of energy homeostasis. This result fits with the changes in hypothalamic neuronal activation recently reported in prebiotic-treated mice (Anastasovska et al., 2012). Interestingly, by measuring the expression of tight junction proteins that ensure BBB integrity, we report data suggesting that reduced hypothalamic BBB integrity displayed by *db/db* mice was improved by OFS, as previously demonstrated for the gut barrier (Cani et al., 2009; Everard et al., 2011). Although no conclusion can be yet drawn about the potential link between this effect and changes of local cytokines expression, it is worth noting that OFS increased the mRNA expression of the anorexic cytokine IL-1 $\beta$  (Gautron & Layé, 2010), which was reduced in untreated *db/db* mice compared to *db/+* mice. On the contrary, it did not restore normal expression of the different hypothalamic neuropeptides (POMC, NPY) shown to be altered in *db/db* mice, despite its positive effect on food intake. These findings suggest that although likely tightly related, different mechanisms, which need to be deeply studied in the present context, underlie neuropeptides and IL-1 $\beta$  regulation in the hypothalamus. Of note, it has been suggested that the expression of those hypothalamic neuropeptides are regulated by body fat mass (Schele et al., 2013), and this would make sense here since both treated and untreated *db/db* mice displayed almost similar body weight. In addition, an inverse relationship has been reported between plasma corticosterone and IL-1 $\beta$  hypothalamic mRNA expression in a rat model of obesity (Wisse, 2004). Although further studies are required to determine whether OFS-induced normalization of plasma corticosterone levels observed in *db/db* mice is involved in the increased hypothalamic IL-1 $\beta$  expression, this assumption may nicely provide an additional way for corticosterone to participate to the beneficial effects of prebiotics on metabolic health.

Despite having beneficial effects on some of the metabolic and neurobiological alterations displayed by *db/db* mice, OFS did not seem to change their behavioral profile. However, this does not necessarily discard gut microbiota effects on behavior, as it is possible that such improvement may require a higher dosage or longer/sooner implementation of prebiotic treatment. Convincing evidence indeed indicates that the gut microbiota can impact behavior in diet-induced models of obesity (Bruce-Keller et al., 2015; Kang et al., 2014; Magnusson et al., 2015). It could be argued that post-natal interventions in *db/db* mice may not be able to improve behavioral alterations that are linked to the lack of leptin's actions through the developmental period. Although this hypothesis cannot be completely excluded

from the present data, it is worth mentioning that normalization of corticosterone circulating levels at adulthood do improve cognitive impairment in *db/db* mice (Stranahan et al., 2008). Here, spatial memory remained impaired in OFS-treated *db/db* mice despite their corticosterone levels being reduced, suggesting that this reduction was insufficient to allow behavioral improvement. Likewise, OFS improved glucose metabolism in *db/db* mice without reducing anxiety-like behavior, although an increased prevalence of anxiety disorders is classically reported in T2D (Castanon et al., 2015; Farooqui et al., 2012). This may suggest either that this improvement is not sufficient to impact behavior, or that emotional alterations are not directly linked to hyperglycemia in *db/db* mice. In support to this last hypothesis, exercise has been shown to reverse hyperglycemia in *db/db* mice, without reducing anxiety-like behavior (Stranahan et al., 2009).

Supporting further a role for the gut microbiota in the behavioral profile of *db/db* mice, we showed that prebiotic treatment impacted hippocampal neurobiological processes known to modulate behavior, particularly inflammation (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2015). In agreement with the recent literature reporting that the gut microbiota influences microglia maturation, morphology, and immunological function (Dinan & Cryan, 2016; Erny et al., 2015), OFS slightly reduced microglial ramifications in the hippocampus, which may reflect reduced microglial activation (Ransohoff & Perry, 2009). Microglial density in the DG of *db/db* mice was also inversely correlated with the number of DCX-positive cells that, together with OFS treatment, predicted performances in the Y-maze. Altogether, these data point to a link between the gut microbiota, microglial activation, hippocampal neurogenesis and behavioral alterations in *db/db* mice, although the underlying mechanisms still need to be identified. A potential player in this network could be IL-6 since its hippocampal mRNA expression was normalized by OFS in *db/db* mice, and it has been previously associated with hippocampal neurogenesis, mood, and cognition (for review see: Erta et al., 2012). Similar association was found here, although normalizing IL-6 mRNA expression did not result in detectable improvement of neurogenesis or behavior. It could be argued that changes in mRNA expression did not necessarily reflect in changes of functional protein levels, which then contribute to downstream neurobiological and behavioral modulations. This is however unlikely since correlations between brain mRNA expression of cytokines and corresponding protein levels have been already reported (van Dam et al., 1998), notably in *db/db* mice (Kumari et al., 2007). Moreover, we previously showed that modulating brain cytokine mRNA expression resulted in modulation of the activation of related signaling pathways and

behavioral responses (André et al., 2014; Dinel et al., 2011; 2014). Alternatively, improving cognition and emotional behavior in *db/db* mice may have required for OFS normalizing the expression of other factors which are well-known to contribute, together with IL-6, to the development of neurobehavioral alterations and are altered in *db/db* mice, particularly TNF- $\alpha$  (Abbott et al., 2015; Capuron et al., 2016). Lastly, several data including ours suggest that plasma IL-6, which was inversely correlated with hippocampal neurogenesis and not normalized by OFS, may be also important in that context (Sparkman et al., 2006; Weaver et al., 2002).

In conclusion, although more studies are needed to further decipher the complexity of the different findings reported in the present study, it constitutes a first important step towards a better understanding of the role of the gut-brain axis in the MetS, not only by extending the knowledge regarding metabolic alterations, but more importantly by addressing the issue of its role on associated neurobiological and behavioral alterations. Beyond that, this study also provides new and interesting findings about how prebiotics may act on the brain, particularly on neuroinflammation. Even though the prebiotic treatment did not clearly translate to behavioral improvements, we were still able to parse out some of the likely mediators in the complex interaction between the body's homeostatic super-systems. These findings contribute therefore to make the gut microbiota a promising nutritional and pharmacological target for the management of obesity and obesity-related disorders, including neuropsychiatric symptoms.

#### **Conflict of interest**

The authors declared that no competing interests exist.

#### **Contributors**

Conceptualization and experimental design: P.D.C., L.C., S.L., and N.C.; Investigation: L.F. de C., C.F., A.E., J.S., and N.C.; Data analysis: L.F.de C., C.F., J.S., and N.C.; Manuscript writing: L.F.de C., C.F., L.C., S.L., and N.C. All of the authors have read, revised and approved the final manuscript; Funding Acquisition: P.D.C., S.L., N.C.; Supervision: N.C.

**Acknowledgements:**

We thank Mathieu Cadet and Claudine Tridon for technical assistance and for taking care of the animals. Real-time PCR experiments were performed at the Genotyping and Sequencing Facility of Bordeaux. The oligofructose (Orafti®P95) was kindly provided by Beneo Orafti, (Tienen, Belgium). We thank Guillaume Ferreira for helpful and fruitful discussions.

**Funding body agreements and policies**

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and by the Région Aquitaine. L.F.de C. was supported by a NEURASMUS Program-Erasmus Mundus Master's Scholarship. C.F. was supported by a doctoral fellowship from the Région Aquitaine and the INRA (Département de Nutrition Humaine). P.D.C is a research associate at FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), Belgium. A.E. is a post-doctoral researcher at FRS-FNRS, Belgium. P.D.C is the recipient of grants from FRS-FNRS, the FRFS-WELBIO under grant: WELBIO-CR-2012S-02R, the Funds Baillet Latour. P.D.C. is a recipient of an ERC Starting Grant 2013 (Starting grant 336452-ENIGMO). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**5. REFERENCES**

- Abbott, R., Whear, R., Nikolaou, V., Bethel, A., Coon, J.T., Stein, K., Dickens, C., 2015. Tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitor therapy in chronic physical illness: A systematic review and meta-analysis of the effect on depression and anxiety. *Journal of Psychosomatic Research* 79, 175–184. doi:10.1016/j.jpsychores.2015.04.008
- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 94, 239–247. doi:10.1002/ar.1090940210
- Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Leptin. *Annual Review of Physiology* 62, 413–437. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.413
- Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamene, H., Ferrier, L., Houdeau, E., Fioramonti, J., Bueno, L., Theodorou, V., 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1885–1895. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.03.024

- Anastasovska, J., Arora, T., Sanchez Canon, G.J., Parkinson, J.R.C., Touhy, K., Gibson, G.R., Nadkarni, N.A., So, P.-W., Goldstone, A.P., Thomas, E.L., Hankir, M.K., Van Loo, J., Modi, N., Bell, J.D., Frost, G., 2012. Fermentable carbohydrate alters hypothalamic neuronal activity and protects against the obesogenic environment. *Obesity* 20, 1016–1023. doi:10.1038/oby.2012.6
- André, C., Dinel, A.-L., Ferreira, G., Layé, S., Castanon, N., 2014. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behavior and Immunity* 41, 10–21. doi:10.1016/j.bbi.2014.03.012
- André, C., O'Connor, J.C., Kelley, K.W., Lestage, J., Dantzer, R., Castanon, N., 2008. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroimmunology* 200, 90–99. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.011
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N.P., McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.-N., Pothuizen, H.H.J., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28, 273–283. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.03.004
- Benarroch, E.E., 2010. Neural control of feeding behavior Overview and clinical correlations. *Neurology* 74, 1643–1650. doi:10.1212/WNL.0b013e3181df0a3f
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., Verdu, E.F., Collins, S.M., 2011. The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology* 141, 599–609.e3. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.052
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., Ferreira, G., 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behavior and Immunity* 40, 9–17. doi:10.1016/j.bbi.2014.03.005
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Layé, S., Ferreira, G., 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22, 2095–2100. doi:10.1002/hipo.22032
- Bosch-Bouju, C., Larrieu, T., Linders, L., Manzoni, O.J., Layé, S., 2016. Endocannabinoid-Mediated Plasticity in Nucleus Accumbens Controls Vulnerability to Anxiety after Social Defeat Stress. *Cell Report* 16, 1237–1242. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.082

- Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G., 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology* 467, 1–10. doi:10.1002/cne.10874
- Bruce-Keller, A.J., Salbaum, J.M., Luo, M., Blanchard IV, E., Taylor, C.M., Welsh, D.A., Berthoud, H.-R., 2015. Obese-type Gut Microbiota Induce Neurobehavioral Changes in the Absence of Obesity. *Biological Psychiatry* 77, 607–615. doi:10.1016/j.biopsych.2014.07.012
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V.D., Buda, A., Pinzani, M., Palù, G., Martines, D., 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology* 292, G518–G525. doi:10.1152/ajpgi.00024.2006
- Cancello, R., Clément, K., 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 113, 1141–1147. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x
- Cani, P.D., Knauf, C., Iglesias, M.A., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., Burcelin, R., 2006. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55, 1484-90.
- Cani, P.D., Knauf, C. 2016. How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes. *Molecular Metabolism* 5, 743-52. doi: 10.1016/j.molmet.2016.05.011.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Delzenne, N.M., 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383. doi:10.1007/s00125-007-0791-0
- Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., Everard, A., 2012. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279–288. doi:10.4161/gmic.19625
- Cani, P.D., Plovier, H., Van Hul, M., Geurts, L., Delzenne, N.M., Druart, C., Everard, A. 2016. Endocannabinoids--at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nature Review Endocrinology* 12, 133-43. doi: 10.1038/nrendo.2015.211.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Wiele, T.V. de, Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. doi:10.1136/gut.2008.165886
- Capuron, L., Castanon, N., 2016. Role of inflammation in the development of neuropsychiatric symptom domains: evidence and mechanisms. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. In press.



- Capuron, L., Lasselin, J., Castanon, N., 2016. Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. *Neuropsychopharmacology*. In press, doi:10.1038/npp.2016.123
- Castanon, N., Lasselin, J., Capuron, L., 2014. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Frontiers in Endocrinology* 5, 74. doi:10.3389/fendo.2014.00074
- Castanon, N., Luheshi, G., Layé, S., 2015. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Frontiers in Neurosciences* 9, 229. doi:10.3389/fnins.2015.00229
- Cluny, N.L., Keenan, C.M., Reimer, R.A., Le Foll, B., Sharkey, K.A., 2015. Prevention of Diet-Induced Obesity Effects on Body Weight and Gut Microbiota in Mice Treated Chronically with 9-Tetrahydrocannabinol. *PLoS ONE* 10, e0144270. doi:10.1371/journal.pone.0144270
- Collins, S.M., Surette, M., Bercik, P., 2012. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Review Microbiology* 10, 735–742. doi:10.1038/nrmicro2876
- Crumevolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., Rabot, S., 2014. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42, 207–217. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.01.014
- Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Review Neuroscience* 13, 701–712. doi:10.1038/nrn3346
- D’Mello, C., Ronaghan, N., Zaheer, R., Dickey, M., Le, T., MacNaughton, W.K., Surrrette, M.G., Swain, M.G., 2015. Probiotics Improve Inflammation-Associated Sickness Behavior by Altering Communication between the Peripheral Immune System and the Brain. *Journal of Neuroscience* 35, 10821–10830. doi:10.1523/JNEUROSCI.0575-15.2015
- De Guia, R.M., Herzig, S., 2015. How Do Glucocorticoids Regulate Lipid Metabolism? *Adv. Exp. Med. Biol.* 872, 127–144. doi:10.1007/978-1-4939-2895-8\_6
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Cani, P.D., 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact* 10, S10. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S10
- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O’Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R.D., Cotter, P.D., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2015. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behavior and Immunity* 48, 165–173. doi:10.1016/j.bbi.2015.04.004
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2010. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170, 1179–1188. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.005

- Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2016. Microbes, Immunity, and Behavior: Psychoneuroimmunology Meets the Microbiome. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038/npp.2016.103
- Dinel, A.-L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., Castanon, N., 2011. Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *PLoS One* 6, e24325. doi: 10.1371/journal.pone.0024325.
- Dinel, A.-L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Layé, S., Castanon, N., 2014. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 40, 48–59. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.10.014
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S.A., 2014. Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 4158–4188. doi:10.3390/ijms15034158
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahkoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W.S., McCoy, K.D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., Prinz, M., 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience* 18, 965-77. doi: 10.1038/nn.4030.
- Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J., 2012. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International Journal of Biological Sciences* 8, 1254–1266. doi:10.7150/ijbs.4679
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Holle, A.V., François, P., Vos, W.M. de, Delzenne, N.M., Schrenzel, J., Cani, P.D., 2011. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. *Diabetes* 60, 2775–2786. doi:10.2337/db11-0227
- Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N.M., Cani, P.D., 2014. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio*. 5, e01011-14. doi: 10.1128/mBio.01011-14.
- Farooqui, A.A., Farooqui, T., Panza, F., Frisardi, V., 2012. Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 741–762. doi:10.1007/s00018-011-0840-1
- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouilliot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., Rizkalla, S., Clément, K., 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049–3057. doi:10.2337/db10-0253

- Gareau, M.G., 2014. Microbiota-Gut-Brain Axis and Cognitive Function, in: Lyte, M., Cryan, J.F. (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, pp. 357–371.
- Gautron, L., Layé, S., 2009. Neurobiology of inflammation-associated anorexia. *Frontiers in Neuroscience* 3, 59. doi:10.3389/neuro.23.003.2009
- Geurts, L., Lazarevic, V., Derrien, M., Everard, A., Van Roye, M., Knauf, C., Valet, P., Girard, M., Muccioli, G.G., François, P., de Vos, W.M., Schrenzel, J., Delzenne, N.M., Cani, P.D. 2011. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Frontiers in Microbiology* 2, 149. doi: 10.3389/fmicb.2011.00149.
- Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S., 2011. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* 29, 415–445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- Guillemot-Legris, O., Masquelier, J., Everard, A., Cani, P.D., Alhouayek, M., Muccioli, G.G., 2016. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J Neuroinflammation* 13, 206. doi: 10.1186/s12974-016-0666-8.
- Kang, S.S., Jeraldo, P.R., Kurti, A., Miller, M.E.B., Cook, M.D., Whitlock, K., Goldenfeld, N., Woods, J.A., White, B.A., Chia, N., Fryer, J.D., 2014. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener* 9, 36. doi:10.1186/1750-1326-9-36
- Kim, H., Bartley, G.E., Young, S.A., Seo, K.-H., Yokoyama, W., 2013. Altered hepatic gene expression profiles associated with improved fatty liver, insulin resistance, and intestinal permeability after hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) supplementation in diet-induced obese mice. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6404–6411. doi:10.1021/jf400545w
- Kootte, R.S., Vrieze, A., Holleman, F., Dallinga-Thie, G.M., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Groen, A.K., Hoekstra, J.B.L., Stroes, E.S., Nieuwdorp, M., 2012. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14, 112–120. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01483.x
- Kumari, R., Willing, L.B., Krady, J.K., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 2007. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 710–718. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600382
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023. doi:10.1038/4441022a
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., Jeandidier, N., Maillard, E., Marchioni, E., Sigrist, S., Dal, S., 2016. High-fructose and high-fat diet-induced

disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)* 13, 15. doi:10.1186/s12986-016-0074-1

Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J.-C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., Joffre, C., Layé, S., 2014. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behavior and Immunity* 41, 22–31. doi:10.1016/j.bbi.2014.03.021

Magnusson, K.R., Hauck, L., Jeffrey, B.M., Elias, V., Humphrey, A., Nath, R., Perrone, A., Bermudez, L.E., 2015. Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility. *Neuroscience* 300, 128–140. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.016

Mallappa, R.H., Rokana, N., Duary, R.K., Panwar, H., Batish, V.K., Grover, S., 2012. Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian J Endocrinol Metab* 16, 20–27. doi:10.4103/2230-8210.91178

Marques, A.H., Silverman, M.N., Sternberg, E.M., 2009. Glucocorticoid dysregulations and their clinical correlates. From receptors to therapeutics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1179, 1–18. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04987.x

Moloney, R.D., Desbonnet, L., Clarke, G., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2013. The microbiome: stress, health and disease. *Mamm Genome* 25, 49-74. doi:10.1007/s00335-013-9488-5

Nakamura, Y.K., Omaye, S.T., 2012. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: Mechanistic insights. *Nutr Metab (Lond)* 9, 60. doi:10.1186/1743-7075-9-60

Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J.A., 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility* 23, 255–e119. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x

O’Mahony, S.M., Felice, V.D., Nally, K., Savignac, H.M., Claesson, M.J., Scully, P., Woznicki, J., Hyland, N.P., Shanahan, F., Quigley, E.M., Marchesi, J.R., O’Toole, P.W., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2014. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience* 277, 885–901. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.054

Ochoa-Repáraz, J., Kasper, L.H., 2016. The Second Brain: Is the Gut Microbiota a Link Between Obesity and Central Nervous System Disorders? *Curr Obes Rep* 5, 51–64. doi:10.1007/s13679-016-0191-1

Patterson, E., Cryan, J.F., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Dinan, T.G., Stanton, C., 2014. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proceedings of the Nutrition Society* 73, 477–489. doi:10.1017/S0029665114001426

- Perelló, M., Castrogiovanni, D., Moreno, G., Gaillard, R.C., Spinedi, E., 2003. Neonatal hypothalamic androgenization in the female rat induces changes in peripheral insulin sensitivity and adiposity function at adulthood. *Neuro Endocrinol. Lett.* 24, 241–248.
- Petra, A.I., Panagiotidou, S., Hatzigelaki, E., Stewart, J.M., Conti, P., Theoharides, T.C., 2015. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clinical Therapeutics* 37, 984–995. doi:10.1016/j.clinthera.2015.04.002
- Pistell, P.J., Morrison, C.D., Gupta, S., Knight, A.G., Keller, J.N., Ingram, D.K., Bruce-Keller, A.J., 2010. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J. Neuroimmunol.* 219, 25–32. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.010
- Pyndt Jørgensen, B., Winther, G., Kihl, P., Nielsen, D.S., Wegener, G., Hansen, A.K., Sørensen, D.B., 2015. Dietary magnesium deficiency affects gut microbiota and anxiety-like behaviour in C57BL/6N mice. *Acta Neuropsychiatrica* 27, 307–311. doi:10.1017/neu.2015.10
- Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology* 27, 119–145. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528
- Reaux-Le Goazigo, A., Bodineau, L., De Mota, N., Jeandel, L., Chartrel, N., Knauf, C., Raad, C., Valet, P., Llorens-Cortes, C., 2011. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic  $\alpha$ -MSH release. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E955–966. doi:10.1152/ajpendo.00090.2011
- Richard, E.M., Helbling, J.-C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.-P., Mormède, P., Moisan, M.-P., 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151, 649–659. doi:10.1210/en.2009-0862
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- Roberts, R.O., Geda, Y.E., Knopman, D.S., Cha, R.H., Boeve, B.F., Ivnik, R.J., Pankratz, V.S., Tangalos, E.G., Petersen, R.C., 2010. Metabolic syndrome, inflammation, and nonamnestic mild cognitive impairment in older persons: a population-based study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24, 11–18. doi:10.1097/WAD.0b013e3181a4485c
- Sanz, Y., Moya-Pérez, A., 2014. Microbiota, Inflammation and Obesity, in: Lyte, M., Cryan, J.F. (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York, pp. 291–317.
- Savignac, H.M., Couch, Y., Stratford, M., Bannerman, D.M., Tzortzis, G., Anthony, D.C., Burnet, P.W.J., (2016). Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and

cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor and IL1- $\beta$  levels in male mice. *Brain Behavior and Immunity* 52, 120-31. doi: 10.1016/j.bbi.2015.10.007

Schéle, E., Grahemo, L., Anesten, F., Hallén, A., Bäckhed, F., Jansson, J.-O., 2013. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the Obesity-Suppressing Neuropeptides Proglucagon (Gcg) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in the Central Nervous System. *Endocrinology* 154, 3643–3651. doi:10.1210/en.2012-2151

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73

Schwab, U., Lauritzen, L., Tholstrup, T., Haldorssoni, T., Riserus, U., Uusitupa, M., Becker, W., 2014. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res* 58. doi:10.3402/fnr.v58.25145

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16731–16736. doi:10.1073/pnas.0804812105

Sparkman, N.L., Buchanan, J.B., Heyen, J.R.R., Chen, J., Beverly, J.L., Johnson, R.W., 2006. Interleukin-6 Facilitates Lipopolysaccharide-Induced Disruption in Working Memory and Expression of Other Proinflammatory Cytokines in Hippocampal Neuronal Cell Layers. *J.Neurosci.* 26, 10709–10716. doi:10.1523/JNEUROSCI.3376-06.2006

Stammberger, I., Bube, A., Durchfeld-Meyer, B., Donaubaue, H., Troschau, G., 2002. Evaluation of the Carcinogenic Potential of Insulin Glargine (LANTUS) in Rats and Mice. *International Journal of Toxicology* 21, 171–179. doi:10.1080/10915810290096306

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312. doi:10.1038/35053000

Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Cutler, R.G., Lee, K., Egan, J.M., Mattson, M.P., 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nature Neuroscience* 11, 309–317. doi:10.1038/nn2055

- Stranahan, A.M., Lee, K., Martin, B., Maudsley, S., Golden, E., Cutler, R.G., Mattson, M.P., 2009. Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* 19, 951–961. doi:10.1002/hipo.20577
- Tack, C.J., Stienstra, R., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., 2012. Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunol Rev* 249, 239–252. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01145.x
- Tarr, A.J., Galley, J.D., Fisher, S.E., Chichlowski, M., Berg, B.M., Bailey, M.T., 2015. The prebiotics 3'Sialyllactose and 6'Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut-brain axis. *Brain Behavior and Immunity* 50, 166–177. doi:10.1016/j.bbi.2015.06.025
- Théoret, H., Boire, D., Herbin, M., Ptitto, M., 1999. Stereological evaluation of substantia nigra cell number in normal and hemispherectomized monkeys. *Brain Research* 835, 354–359.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 1, 6ra14. doi: 10.1126/scitranslmed.3000322.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–131. doi:10.1038/nature05414
- Van Dam, A.M., Poole, S., Schultzberg, M., Zavala, F., Tilders, F.J., 1998. Effects of peripheral administration of LPS on the expression of immunoreactive interleukin-1 alpha, beta, and receptor antagonist in rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 128–138.
- Weaver, J.D., Huang, M.-H., Albert, M., Harris, T., Rowe, J.W., Seeman, T.E., 2002. Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology* 59, 371–378.
- Wisse, B.E., 2004. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *JASN* 15, 2792–2800. doi:10.1097/01.ASN.0000141966.69934.21
- Wulsin, L.R., Singal, B.M., 2003. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronarydisease? A systematic quantitative review. *Psychosom Med* 65, 201–210.
- Xiang, X., An, W., Jiang, C., Zhao, J., Wang, X., Sun, G., Li, Y., Zhang, W., 2013. Lipopolysaccharide inhibits the expression of resistin in adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 51, 287–299. doi:10.1530/JME-13-0117
- Ye, H., Zhang, H.J., Xu, A., Hoo, R.L.C., 2013. Resistin production from adipose tissue is decreased in db/db obese mice, and is reversed by rosiglitazone. *PLoS ONE* 8, e65543. doi:10.1371/journal.pone.0065543





## **DISCUSSION GENERALE**



## **I. Synthèse des principaux résultats**

L'obésité est une pathologie associée à des altérations métaboliques et inflammatoires et constitue un facteur de risque important de développer des comorbidités telles qu'un diabète de type 2. De plus, la prévalence de troubles de l'humeur et de la cognition est élevée chez les sujets obèses. Ces troubles neuropsychiatriques compliquent la prise en charge de l'obésité, contribuent à son aggravation et peuvent à terme favoriser le développement des comorbidités associées. Diminuer le développement de ces troubles pourrait donc permettre d'améliorer la santé et la qualité de vie des individus obèses. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été de déterminer quels sont les mécanismes impliqués dans les troubles émotionnels et cognitifs associés à l'obésité, afin d'identifier de potentielles cibles permettant, à terme, de développer des stratégies préventives et/ou thérapeutiques. Certains mécanismes ont déjà été identifiés en ce qui concerne la mise en place des altérations cognitives associées à l'obésité. Par exemple, une diminution de l'IL-1 $\beta$  dans l'hippocampe améliore les performances mnésiques (Erion et al., 2014). De même la plasticité synaptique et la mémoire spatiale sont améliorées par une diminution des taux de corticostérone plasmatique ou par l'inhibition de l'activité des GR dans l'hippocampe (Stranahan et al., 2008; Wosiski-Kuhn et al., 2014). Au contraire, les mécanismes impliqués dans la régulation des altérations émotionnelles associées à l'obésité restent encore à déterminer. Afin de répondre à cette question, nous avons dans un premier temps évalué si l'inflammation, en particulier au niveau de l'hippocampe, contribuait au développement des altérations émotionnelles associées à l'obésité dans le modèle murin *db/db* (**chapitre 1**). Dans un second temps, nous avons utilisé des approches nutritionnelles basées d'une part sur l'enrichissement du régime en AGPI n-3 et antioxydants et d'autre part sur l'administration d'un prébiotique. Ces approches avaient pour but de cibler certains des mécanismes potentiellement impliqués dans le développement des troubles de l'humeur et de la cognition chez ces souris (**chapitres 2 et 3**). Ce deuxième objectif nous a permis non seulement d'évaluer l'effet de ce type d'approches sur les altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité, mais également d'étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans leurs effets, et aider ainsi, à terme, au développement de nouvelles stratégies d'interventions préventives et/ou thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons montré que des stratégies visant à diminuer l'inflammation, telles qu'une restriction alimentaire ou l'administration de molécules anti-

inflammatoires, diminuaient les comportements de type anxieux chez les souris obèses *db/db*. De façon intéressante, ces améliorations comportementales étaient associées à une diminution sélective de l'expression génique du TNF- $\alpha$  hippocampique, suggérant un rôle de cette cytokine inflammatoire dans la régulation des comportements de type anxieux associés à l'obésité. Nous avons ensuite confirmé ce rôle causal du TNF- $\alpha$  grâce à une approche pharmacologique permettant de bloquer le TNF- $\alpha$  cérébral par une administration chronique d'étanercept i.c.v. En effet, cette inhibition du TNF- $\alpha$  cérébral diminuait les comportements de type anxieux chez les souris *db/db*. Nous avons enfin montré que cette amélioration comportementale impliquait probablement une diminution de l'activité spontanée des neurones glutamatergiques dans l'hippocampe ventral, connu pour participer à la régulation des réponses émotionnelles. Ainsi, nous avons mis en évidence un rôle causal du TNF- $\alpha$  dans la régulation des altérations émotionnelles associées à l'obésité, impliquant des changements de la transmission synaptique dans l'hippocampe ventral.

Dans un second temps, nous avons évalué l'impact d'un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants sur les altérations métaboliques, émotionnelles et cognitives associées à l'obésité, et sur les mécanismes biologiques et neurobiologiques potentiellement impliqués dans ces troubles. Nous avons choisi d'utiliser ces nutriments puisqu'ils sont connus pour améliorer les altérations comportementales dans différents contextes associés à des troubles neuropsychiatriques, comme le vieillissement ou la maladie d'Alzheimer. Nous avons montré que la consommation de ce régime pendant 13 semaines restaurait les performances de mémoire spatiale des souris *db/db* dans le test de la piscine de Morris. De plus, cette amélioration de la cognition était associée à des changements de la composition des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA. Ces récepteurs étant fortement impliqués dans la régulation de la PLT, qui sous-tend la mise en place des processus mnésiques, ces résultats suggèrent donc que la combinaison d'AGPI n-3 et d'antioxydants pourrait améliorer la plasticité synaptique, améliorant ainsi les performances mnésiques.

## **II. Rôle de l'inflammation dans les altérations émotionnelles associées à l'obésité**

Comme nous l'avons vu, déterminer le rôle de l'inflammation dans la mise en place des altérations émotionnelles associées à l'obésité et en identifier les mécanismes

intermédiaires était une des questions clés de ce travail de thèse. Pour y répondre, il nous fallait dans un premier temps compléter la caractérisation de notre modèle d'étude, afin de préciser en particulier la nature des altérations émotionnelles et inflammatoires.

**A. Altérations émotionnelles associées à l'obésité**

Au cours de cette thèse, nous avons confirmé l'existence d'une association entre troubles de l'humeur et obésité. En particulier, nous avons mis en évidence des comportements de type anxieux chez la souris *db/db* (**chapitres 1, 2 et 3**). Un lien entre obésité et anxiété a été démontré dans de nombreuses études, chez le sujet obèse, comme dans des modèles animaux d'obésité (Anderson et al., 2007; Gariépy et al., 2010; Giusti and Panchaud, 2007). De façon intéressante, les troubles de l'humeur sont réversibles puisque des patients obèses ayant subi une chirurgie bariatrique rapportent une diminution de leurs symptômes anxieux et dépressifs un à deux ans après l'intervention (Andersen et al., 2010). L'anxiété étant difficile à évaluer chez l'animal, des tests modélisant certains symptômes de l'anxiété ont été développés. Parmi ces tests, nous avons choisi d'utiliser les tests de champ ouvert (« open field »), du labyrinthe en croix surélevé et de la boîte claire/obscur. Ces tests ont été validés pharmacologiquement puisque des composés anxiolytiques diminuent les comportements de type anxieux dans ces paradigmes expérimentaux. De plus, des études précédemment réalisées au laboratoire ont mis en évidence des comportements de type anxieux chez les souris *db/db* dans les tests de champ ouvert et du labyrinthe en croix surélevé (Dinel et al., 2011). Nous avons donc confirmé le développement de ces comportements dans ces deux tests dans nos trois études (**chapitre 1, 2 et 3**). De plus, nous avons montré que les souris *db/db* présentaient également des comportements de type anxieux dans le test de la boîte claire/obscur (**chapitre 2 et 3**). Ces données sont en accord avec des études précédentes qui montrent que des modèles animaux d'obésité génétique ou induite par un régime hypercalorique et/ou hyperlipidique ont également des comportements de type anxieux augmentés en comparaison à leurs animaux témoins (Andre et al., 2014; Finger et al., 2010; Greenman et al., 2013; Krishna et al., 2015). Au cours de cette thèse, nous n'avons pas étudié les comportements de type dépressif, puisqu'il avait été précédemment montré au laboratoire que les souris *db/db* ne présentent pas plus de comportements de type dépressif que les souris *db/+* en conditions basales (Dinel et al., 2011, 2014). D'autres laboratoires ont en revanche décrit la mise en place de ce type de comportements chez les souris *db/db* (Guo and Lu, 2014; Sharma et al., 2010), mais dans des conditions plus stressantes que les nôtres ce

qui suggère que les comportements de type dépressif sont peut-être plus difficiles à mettre en évidence que les comportements de type anxieux. Ainsi, il est possible qu'ils soient plus sensibles à un stress, mais cette hypothèse n'a jamais été directement testée chez la souris *db/db*. Il a en revanche été montré au laboratoire que des souris obèses, suite à la consommation d'une diète hypercalorique, développent plus de comportements de type anxieux que leurs souris témoins en absence de toute stimulation, mais plus de comportements de type dépressif qu'après exposition à un stress immun (Andre et al., 2014). De plus, il est important de garder à l'esprit que les comportements de types anxieux et dépressif mesurés chez l'animal modélisent des symptômes retrouvés dans différentes pathologies neuropsychiatriques, mais ne modélisent en aucun cas des pathologies dans leur ensemble (Capuron and Castanon, 2016).

Les altérations comportementales mesurées chez les souris *db/db* ou dans les autres modèles d'obésité correspondent à certaines dimensions de symptômes neuropsychiatriques fréquemment observés chez les individus obèses dont la prise en charge chez les sujets obèses est importante. Pour cela, la compréhension des mécanismes impliqués est capitale. Parmi ces mécanismes potentiels, nous nous sommes intéressés à l'inflammation. Notre laboratoire a en effet été l'un des premiers à montrer que l'obésité était associée à une inflammation chronique à bas bruit, non seulement au niveau systémique, mais également dans le cerveau, notamment dans des structures impliquées dans la régulation des émotions et de la cognition. Afin d'évaluer le rôle de l'inflammation dans les troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité, nous avons tout d'abord complété la caractérisation du profil inflammatoire des souris *db/db* à la périphérie et dans le cerveau dans nos différentes études.

### **B. Inflammation et obésité**

Il est désormais bien établi que les formes d'obésité sévères sont associées chez l'homme à un état inflammatoire chronique à bas bruit caractérisé par la présence de facteurs inflammatoires au sein de la circulation sanguine et du tissu adipeux, ainsi que par l'existence d'une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux (Cancello and Clement, 2006). Dans nos études, nous n'avons pas toujours mis en évidence cette inflammation systémique chez les souris *db/db*. En effet, nos souris présentaient soit des concentrations de cytokines inflammatoires indétectables (**chapitre 2**), soit une faible élévation des concentrations plasmatiques d'IL-6 (**chapitre 1**) ou d'IL-1 $\beta$  (**chapitre 3**). Cette variabilité est également observable dans les études précédentes réalisées au laboratoire (Dinel et al., 2011, 2014). Les

différentes mesures d'inflammation périphérique réalisées au cours de cette thèse ont été obtenues grâce à un dosage multiplex, qui contrairement à la technique ELISA, permet d'analyser les concentrations des différentes cytokines à partir d'un seul échantillon de plasma. Suivant le protocole, une dilution du plasma a été réalisée avant le dosage. Or, la plupart des résultats obtenus lors des dosages annonçaient des valeurs inférieures aux limites de détection du kit, ce qui rend indétectable une potentielle différence entre les souris *db/+* et *db/db*. Il serait donc pertinent de réaliser ces dosages sans cette étape de dilution ou de doser indépendamment chaque cytokine grâce à la technique de dosage ELISA, qui pourrait être plus sensible que la technique multiplex même si elle nécessite de plus grands volumes d'échantillons. Des mesures des niveaux de cytokines pourraient également être réalisées au sein du tissu adipeux puisque chez les sujets obèses, le tissu adipeux participe à la mise en place de l'inflammation à bas bruit. L'absence d'inflammation à bas bruit au niveau plasmatique en conditions basales n'est pas propre aux souris *db/db*, puisqu'elle n'est pas non plus détectable dans des modèles d'obésité induite par un régime hypercalorique (Andre et al., 2014). Dans ces modèles, les altérations du système immunitaire en périphérie sont plus généralement caractérisés par une production de cytokines inflammatoires exacerbée en réponse à un stimulus immun tel qu'une injection de LPS (Andre et al., 2014; Diné et al., 2014). Cependant, les souris *db/db* présentent l'avantage d'être caractérisées par une inflammation centrale en absence de toute stimulation, ce qui n'est pas toujours le cas des modèles d'obésité induite par un régime hypercalorique.

Il est désormais bien établi que l'inflammation périphérique, qui caractérise l'obésité, est associée à une augmentation de l'inflammation au niveau cérébral, notamment dans l'hypothalamus, structure clé dans la régulation de la prise alimentaire (Andre et al., 2014; Cai and Liu, 2012; De Souza et al., 2005; Ernst et al., 2009; Gao et al., 2014; Maric et al., 2014; Pohl et al., 2009; Zhang et al., 2008). Dans le **chapitre 3** de cette thèse, nous avons montré que l'expression génique des cytokines pro- et anti-inflammatoires mesurée dans l'hypothalamus n'était pas modifiée dans nos conditions, hormis pour l'IL-1 $\beta$  dont l'expression de l'ARNm est diminuée chez les souris *db/db*. De façon intéressante, l'IL-1 $\beta$  possède des propriétés anorexigènes (Gautron and Laye, 2009; McCarthy et al., 1985). La diminution de l'expression de l'IL-1 $\beta$  pourrait donc participer à l'hyperphagie observée chez les souris *db/db*. En accord avec cette hypothèse, l'étude réalisée dans le **chapitre 3** de cette

thèse montre que la restauration de l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus est associée à une baisse de l'hyperphagie.

Il est maintenant clairement démontré que la neuroinflammation associée à l'obésité affecte d'autres structures, notamment les structures impliquées dans la régulation des émotions et de la cognition telles que l'hippocampe (Capuron et al., 2016; Castanon et al., 2014; Castanon et al., 2015). Dans les différentes études réalisées au cours de cette thèse, nous avons en effet mis en évidence en particulier une augmentation de l'expression génique de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe des souris *db/db* en comparaison aux souris *db/+* (**chapitre 1, 2 et 3**). Ces résultats confirment ceux d'études précédentes qui montrent une augmentation de l'expression génique et des niveaux protéiques des cytokines inflammatoires dans l'hippocampe de ces souris (Dinel et al., 2011, 2014; Erion et al., 2014). Pour la première fois, nous avons également montré que l'activation des voies MAPK p38 et p44/42 (associées au TNF- $\alpha$  et à l'IL-1 $\beta$ ) et de la voie STAT3 (associée à l'IL-6 et à l'IL-10) était augmentée dans l'hippocampe des souris *db/db* en comparaison aux souris *db/+* (**chapitre 2**). Nous avons également montré que l'expression accrue des cytokines pro- et anti-inflammatoires et la sur-activation des voies qui leur sont couplées ne sont pas associées à une modification de la densité des cellules microgliales et des astrocytes dans l'hippocampe (**chapitre 3**). Cependant, des différences de densité des cellules microgliales et des astrocytes ne reflètent pas nécessairement des variations de leur niveau d'activation ou des modifications fonctionnelles (de Haas et al., 2008). Des différences d'activation pourraient en revanche être observées en mesurant des marqueurs spécifiques tels que CD68, CD11b et CD45 pour la microglie (Ponomarev et al., 2005) et la vimentine et la nestine pour les astrocytes (Liberto et al., 2004). L'augmentation de l'expression de cytokines dans l'hippocampe peut être la conséquence de l'augmentation de la production de cytokines inflammatoires périphériques (Capuron and Miller, 2011), mais nous montrons dans nos études que l'inflammation centrale n'est pas seulement régulée par les cytokines provenant de la périphérie (**chapitre 3**). En effet, le profil inflammatoire dans l'hippocampe et l'hypothalamus des souris *db/db* ne reflète pas celui observé à la périphérie. Par exemple, l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  est augmentée dans l'hippocampe des souris *db/db* alors que la concentration de cette cytokine n'est pas augmentée dans le plasma des souris *db/db*. De plus, l'augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-10 ne s'accompagne pas de variations de l'expression cérébrale d'IL-10. Il est intéressant de s'interroger sur le rôle de l'insuline dans la régulation



de l'inflammation cérébrale. En effet, la production de cytokines et l'activation des voies de signalisation qui y sont associées peuvent être modulées par l'activation de la voie de l'insuline dans le cerveau. Par exemple, la protéine GSK3 $\beta$  induit l'activation de la voie STAT3 dans les astrocytes et les cellules microgliales *in vitro* (Beurel and Jope, 2008). De plus, l'inhibition de GSK3 $\beta$  induite par l'insuline stimule la production d'IL-10 et diminue la synthèse d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes (Martin et al., 2005). La résistance à l'insuline dans le cerveau des souris *db/db* pourrait ainsi contribuer à l'augmentation des taux de cytokines inflammatoires observée dans l'hippocampe de ces souris.

Ainsi, les comportements de type anxieux mesurés chez les souris *db/db* sont associés, comme les troubles de l'humeur chez les patients obèses, à une inflammation chronique à bas bruit, notamment dans l'hippocampe. Il serait important d'évaluer par quels mécanismes cette inflammation hippocampique est mise en place, puisqu'elle ne semble pas être liée à l'intensité de l'inflammation périphérique. De même, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'inflammation dans l'hypothalamus, ce qui suggère que les mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'inflammation au niveau central ne sont pas les mêmes d'une structure cérébrale à l'autre.

### **C. Rôle du TNF- $\alpha$ hippocampique dans les comportements de type anxieux associés à l'obésité**

Afin de répondre à notre premier objectif, qui était d'évaluer le rôle de l'inflammation dans les altérations émotionnelles associées à l'obésité chez les souris *db/db*, nous avons mis en place des stratégies permettant de diminuer l'inflammation chez ces souris. De façon intéressante, nous avons montré que des stratégies anti-inflammatoires, comme une restriction alimentaire ou l'administration d'ibuprofène, diminuaient spécifiquement l'expression du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe des souris *db/db*, ainsi que les comportements de type anxieux, suggérant un rôle particulier de cette cytokine dans la mise en place des troubles de l'humeur associés à l'obésité (**chapitre 1**). Cette hypothèse était renforcée par nos deux études utilisant des approches nutritionnelles (**chapitres 2 et 3**), qui, à l'inverse, n'améliorent ni les comportements de type anxieux, ni les niveaux d'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons bloqué le TNF- $\alpha$  cérébral grâce à l'administration d'éta nercept, un récepteur leurre du TNF- $\alpha$ . Cette expérience a effectivement permis de diminuer les comportements de type anxieux chez les souris *db/db*, confirmant que les niveaux élevés de TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe participent à la mise en place de ces

comportements. De façon similaire, un rôle du TNF- $\alpha$  a précédemment été décrit dans la mise en place des comportements de type anxieux dans un modèle murin de sclérose en plaque (les souris EAE) (Haji et al., 2012). L'administration d'éta nercept par voie i.c.v. diminue en effet dans ce modèle les comportements de type anxieux, alors qu'à l'inverse, l'administration de TNF- $\alpha$  par voie i.c.v. est suffisante pour induire des comportements de type anxieux chez des souris témoins (Haji et al., 2012). Nos résultats sont également en accord avec des études montrant que l'induction de comportements de type dépressif et anxieux par un stimulus immunitaire, dépend de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  (Goshen et al., 2008; Lacosta et al., 1999a; Merali et al., 2003; O'Connor et al., 2009c). Il pourrait être intéressant d'étudier dans notre modèle si l'administration de TNF- $\alpha$  à des souris *db/+* permet d'induire des comportements similaires, les souris *db/+* et *db/db* n'ayant pas le même fond génétique que les souris C57BL/6 utilisées dans l'étude de Haji et collaborateurs. Enfin, nos résultats sont aussi en accord avec des données cliniques qui rapportent chez des patients atteints de psoriasis ou de polyarthrite rhumatoïde et traités avec un inhibiteur du TNF- $\alpha$  une amélioration significative de leurs symptômes dépressifs et anxieux associés à la maladie et de leur bien-être général suite à la prise du traitement (Fleming et al., 2015; Kekow et al., 2011; Uguz et al., 2009).

Après avoir mis en évidence le rôle causal du TNF- $\alpha$  hippocampique dans la mise en place des comportements de type anxieux associés à l'obésité chez la souris *db/db*, nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués dans cet effet du TNF- $\alpha$ . L'étude de Haji et collaborateurs réalisée chez les souris EAE reliant l'effet du TNF- $\alpha$  sur les comportements de type anxieux à des modifications de la transmission glutamatergique (Haji et al., 2012). En accord avec cette étude, nous avons montré que l'administration d'éta nercept *ex-vivo* améliorait la transmission synaptique dans l'hippocampe ventral des souris *db/db*. En effet, comme c'est le cas dans l'étude de Haji et collaborateurs, l'inhibition du TNF- $\alpha$  diminue le « *decay time* », c'est-à-dire le temps que met le courant post-synaptique exciteur miniature (mEPSC) à revenir au niveau de base, à partir du moment où il a atteint son pic maximum. De plus, l'inhibition du TNF- $\alpha$  diminue également la fréquence et l'amplitude des mEPSCs. Ceci suggère la mise en place de modifications structurelles et/ou fonctionnelles aux niveaux pré et/ou post-synaptiques dans l'hippocampe ventral des souris *db/db* (Wierenga et al., 2006). Ces données sont en accord avec des études réalisées dans des modèles de pathologies inflammatoires dans lesquels les altérations émotionnelles sont associées à une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs dans des structures participant à la régulation

de l'humeur. Par exemple, les comportements de type anxieux mesurés dans un modèle animal de douleur chronique sont associés à une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs dans l'amygdale (Wang et al., 2015). De façon similaire, la fréquence et l'amplitude des mEPSCs sont augmentées dans un modèle murin de syndrome du côlon irritable (Liu et al., 2015), également caractérisé par des altérations émotionnelles (Zhang et al., 2014a). Il peut paraître surprenant que dans notre étude, l'etanercept n'ait pas altéré le profil des mEPSCs dans l'hippocampe des souris *db/+*. Il est possible que le TNF- $\alpha$  n'ait un impact sur la transmission synaptique glutamatergique que dans des situations dans lesquelles son expression est élevée au niveau cérébral. Il a été décrit que le TNF- $\alpha$  module la transmission synaptique dans différentes structures dont le striatum et le cortex (Haji et al., 2012). Nous avons choisi d'étudier l'impact de l'inhibition du TNF- $\alpha$  sur les propriétés électrophysiologiques des neurones dans l'hippocampe ventral puisque cette structure est connue pour son rôle dans la régulation des réponses émotionnelles (Bannerman et al., 2002; Bannerman et al., 2003; Zhang et al., 2014b). De plus, la neuroinflammation chez les souris *db/db* n'est pas bien caractérisée dans les autres structures participant à la régulation des émotions telles que l'amygdale ou le striatum, alors que notre laboratoire est un des pionniers dans la caractérisation de l'inflammation hippocampique chez ces souris (Dinel et al., 2011, 2014) (**chapitre 1, 2 et 3**). Enfin, l'expression des ARNm du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe est corrélée à l'intensité des comportements de type anxieux, alors que ce n'était pas le cas dans le cortex préfrontal (**chapitre 1**).

---

En conclusion, nous avons pour la première fois mis en évidence un rôle causal du TNF- $\alpha$  dans les comportements de type anxieux associés à l'obésité. Nous avons également montré que cet effet comportemental implique probablement des altérations de la transmission synaptique glutamatergique dans l'hippocampe ventral. Cependant, plus d'études sont nécessaires afin de comprendre plus précisément les mécanismes intermédiaires. Ainsi, le TNF- $\alpha$  pourrait représenter une cible de choix dans le développement de stratégies thérapeutiques permettant de réduire la forte prévalence de troubles de l'humeur chez les individus obèses. Il est également possible, qu'au-delà de l'obésité, le TNF- $\alpha$  soit également mis en jeu dans d'autres pathologies associées à des symptômes neuropsychiatriques. Par exemple, de nombreuses données montrent que l'inflammation est également une composante importante dans les troubles bipolaires, les troubles anxieux, la schizophrénie, le déclin

cognitif ou les maladies neurodégénératives (Barbosa et al., 2014; Hoge et al., 2009; Lee et al., 2009; Potvin et al., 2008; Solmi et al., 2015). Ainsi, l'inflammation pourrait jouer un rôle dans le développement de dimensions de symptômes présents dans l'ensemble de ces pathologies plutôt que dans l'étiologie de chaque maladie individuellement (Capuron and Castanon, 2016). En accord avec cette hypothèse, il a été suggéré que l'activation de l'IDO pourrait jouer un rôle dans le développement de troubles émotionnels et cognitifs en agissant sur les systèmes glutamatergiques et sérotoninergiques (Capuron and Castanon, 2016; Dantzer et al., 2014). En parallèle, l'activation de la GTP-CH1 par les cytokines participerait plutôt à la mise en place des symptômes neurovégétatifs et motivationnels associés à l'inflammation en altérant la synthèse de dopamine. Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer l'impact de l'inhibition du TNF- $\alpha$  hippocampique sur l'activation respective de ces enzymes et sur leur implication dans les effets comportementaux observés.

### **III. Approches nutritionnelles et altérations métaboliques et comportementales associées à l'obésité**

Le deuxième objectif de cette thèse visait à évaluer l'impact de nutriments d'intérêt, non seulement sur les altérations métaboliques et comportementales des souris *db/db*, mais également sur les mécanismes biologiques et neurobiologiques qui leurs sont associés et qui peuvent potentiellement sous-tendre la mise en place de ces altérations. Dans une première étude, les souris ont été nourries avec un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants (**chapitre 2**). Ces nutriments sont connus pour améliorer le profil métabolique des individus obèses, mais également pour diminuer les troubles de l'humeur et/ou de la cognition dans des contextes associés à des altérations neuropsychiatriques, tels que le vieillissement et la maladie d'Alzheimer. De plus, ils peuvent agir sur différents systèmes biologiques et neurobiologiques potentiellement impliqués dans le développement de ces troubles, en particulier le système immunitaire et la plasticité neuronale. Enfin, dans notre dernière étude, nous avons évalué l'effet de modifications de la composition du microbiote intestinal induites par un prébiotique, l'OFS, sur les altérations métaboliques et comportementales des souris *db/db* et sur les mécanismes pouvant être impliqués dans le développement de ces troubles (**chapitre 3**). En effet, il a été décrit que des modifications du microbiote intestinal par des prébiotiques ou des probiotiques pouvaient modifier le profil métabolique et comportemental

des individus qui les consomment. Cependant, leurs effets dans le contexte de l'obésité et les mécanismes pathophysiologiques impliqués sont encore mal connus.

### **A. Altérations métaboliques associées à l'obésité**

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'obésité est fréquemment associée à un ensemble de troubles métaboliques dont une insulino-résistance, une hyperglycémie à jeun et une hypertriglycéridémie. Dans les études des **chapitres 2 et 3**, nous avons confirmé le développement de ces altérations métaboliques chez les souris *db/db* (Dinel et al., 2011; Everard et al., 2014). Tout au long des expériences réalisées, elles ont un poids corporel et une prise alimentaire largement augmentés en comparaison aux souris *db/+*. De plus, dès les premières semaines d'expérience (soit dès l'âge de 6-7 semaines), les souris *db/db* augmentent leur consommation d'eau en comparaison aux souris *db/+*. Cette augmentation est progressive et continue tout au long de l'expérience. Elle correspond au développement d'une polydipsie, un des symptômes du diabète de type 2 chez l'Homme. Bien que ces résultats ne soient pas décrits dans cette thèse, nous avons également pu mesurer la répartition de la masse corporelle chez les souris *db/db* grâce à une technique de résonance magnétique nucléaire. La masse grasse des souris est largement augmentée chez les souris *db/db* en comparaison aux souris *db/+*. En effet, dès l'âge de 5 semaines, des souris *db/db* nourries avec un régime standard sont constituées d'environ 55 % de masse grasse alors que cette valeur est d'environ 15 % pour les souris *db/+*. Nous avons également confirmé la mise en place d'altérations du métabolisme du glucose chez les souris *db/db* (Everard et al., 2014). En effet, les souris *db/db* présentent une hyperglycémie, dans des conditions de jeûne, mais également lorsqu'elles sont nourries *ad libitum*. De plus, ces souris ont une tolérance au glucose diminuée et une résistance à l'insuline augmentée en comparaison aux souris minces. Le foie étant important dans le métabolisme du glucose, nous y avons mesuré l'expression de gènes participant à la régulation de la glycémie. Nous avons ainsi montré que les dérégulations glycémiques étaient associées à une augmentation de l'expression des ARNm du facteur de transcription PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*), du transporteur du glucose GLUT2 et de G6P (glucose-6-phosphatase), qui est l'enzyme catalysant la dernière étape de la néoglucogenèse.

Au niveau plasmatique, nous avons mesuré les niveaux de plusieurs adipokines, c'est-à-dire des protéines libérées dans la circulation sanguine par les adipocytes et capables d'avoir une action systémique. Les niveaux d'adiponectine sont diminués dans le plasma des souris

*db/db*, en accord avec ce qui a été montré précédemment chez des sujets obèses. Ces niveaux réduits d'adiponectine dans un contexte d'obésité peuvent être expliqués par le fait que sa synthèse est régulée négativement par les glucocorticoïdes et par le TNF- $\alpha$  dont les niveaux sont élevés chez les patients obèses (Stefan and Stumvoll, 2002). Les niveaux plasmatiques de résistine sont également diminués chez les souris *db/db* en comparaison aux souris *db/+*. La résistine est classiquement associée à l'insulino-résistance et au diabète de type 2 (Steppan et al., 2001). Nos données sont en accord avec des études précédentes montrant une diminution des niveaux de résistine chez les souris *db/db* (Dinel et al., 2011; Xiang et al., 2013; Ye et al., 2013). Enfin, les niveaux d'insuline et de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) sont élevés dans le plasma des souris *db/db*, ce qui est en accord avec de nombreuses études réalisées chez des sujets obèses ou dans des modèles animaux d'obésité (Burcelin and Gourdy, 2016; Dinel et al., 2011; Stanley et al., 2005). Nous avons également confirmé que les taux de triglycérides dans le plasma des souris *db/db* étaient élevés en comparaison aux souris *db/+* (Hall et al., 2014; Kjørholt et al., 2005).

Puisque la prise alimentaire est régulée au niveau central, principalement dans l'hypothalamus, nous avons mesuré l'expression génique des neuropeptides participant à cette régulation (**chapitre 3**). Ainsi, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des ARNm des peptides anorexigènes CART et POMC et une augmentation de l'expression génique du neuropeptide orexigène NPY dans l'hypothalamus des souris *db/db*, en comparaison aux souris *db/+*. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la leptine diminue l'expression du peptide NPY et active les neurones CART/POMC. Puisque le récepteur de la leptine n'est pas fonctionnel chez les souris *db/db*, cela explique que l'expression de ces différents peptides soit altérée.

Pour la première fois à notre connaissance, nous avons mesuré les teneurs en AGPI dans le plasma et dans cerveau des souris *db/db* (**chapitre 2**). Nous avons montré que les niveaux plasmatiques et cérébraux d'AGPI n-3 (notamment d'EPA et de DHA) sont plus élevés chez les souris *db/db* que chez les souris *db/+*. Il serait intéressant de mesurer les concentrations plasmatiques des médiateurs lipidiques dérivés des AGPI tels que les lipoxines et les résolvines. La conversion des AGPI n-3 en dérivés lipidiques pourrait en effet être altérée chez les souris *db/db*, malgré leurs taux élevés d'AGPI n-3. Or, il a été décrit que ces médiateurs lipidiques dérivés des AGPI n-3 possèdent des propriétés anti-inflammatoires et participent à la résolution de l'inflammation dans des contextes d'inflammation élevée

(Calder, 2013; Serhan, 2014; Serhan et al., 2008; Serhan et al., 2002). En particulier, une étude réalisée au laboratoire montre que les résolvines D1 et E1, dérivées respectivement du DHA et de l'EPA, inhibent la production de cytokines inflammatoires induite par le LPS et modulent le phénotype des cellules microgliales *in vitro* (Rey et al., 2016).

En conclusion, nous avons confirmé la mise en place d'un ensemble d'altérations métaboliques associées à l'obésité chez la souris *db/db*, qui correspondent à celles observées chez l'Homme. La prise en charge de ces comorbidités est importante puisqu'elles contribuent à l'aggravation de l'obésité et que certaines d'entre elles, comme l'insulino-résistance, peuvent favoriser le développement d'altérations neuropsychiatriques chez les sujets obèses. Nous avons donc évalué l'impact des deux approches nutritionnelles basées sur l'administration d'AGPI n-3 et d'antioxydants d'une part et de prébiotiques d'autre part sur ces altérations métaboliques et sur les mécanismes potentiels qui les sous-tendent.

**B. Approches nutritionnelles, altérations métaboliques et mécanismes biologiques associés**

Nous avons mis en évidence une diminution de l'hyperphagie chez les souris *db/db* consommant de l'OFS (**chapitre 3**). Bien que cette diminution de la prise alimentaire ne soit pas associée à une perte de poids significative, les souris *db/db* qui consomment le prébiotique ont tout de même tendance à prendre moins de poids que celles qui sont non supplémentées. La consommation chronique d'OFS diminue également la consommation hydrique des souris *db/db*. Ces améliorations métaboliques sont associées à des améliorations de la régulation glycémique. Nous avons en effet montré que l'OFS diminue l'hyperglycémie à jeun et post-prandiale, ainsi que la résistance à l'insuline. Ce traitement améliore également la tolérance au glucose chez les souris *db/db*. Parmi les mécanismes pouvant participer à ces améliorations métaboliques, il est possible que la corticostérone, dont les taux plasmatiques sont réduits par l'OFS, ait un rôle à jouer. En effet, il a été décrit que des taux élevés de GC peuvent avoir un effet anorexigène et favoriser l'accumulation de tissu adipeux et l'insulino-résistance (de Guia and Herzig, 2015). Au contraire, la réduction de l'activation des GR induite par l'administration de prébiotiques améliore le métabolisme dans un modèle murin d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique (Kim et al., 2013). Nous avons également montré que l'OFS restaure les niveaux plasmatiques de résistine. Ces données sont en accord avec une étude dans laquelle l'administration de rosiglitazone, un traitement anti-diabétique, améliore les taux de résistine chez les souris *db/db* et leurs altérations

métaboliques (Ye et al., 2013). Enfin, l'OFS augmente les taux d'IL-10 dans le plasma des souris *db/db*. Ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire de l'OFS, ce qui est en accord avec les études montrant un lien entre composition du microbiote intestinal, inflammation systémique et profil métabolique (Furet et al., 2010; Sokol et al., 2008). Les améliorations métaboliques induites par l'OFS chez les souris *db/db* sont également associées à des modifications au niveau de l'hypothalamus, qui a un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, l'expression génique de la cytokine anorexigène IL-1 $\beta$  est améliorée par l'OFS dans l'hypothalamus des souris *db/db*. Une relation inverse entre les taux de corticostérone plasmatique et l'expression hypothalamique de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  a été décrite dans un modèle d'obésité chez le rat (Wisse et al., 2004). De même, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle si la corticostérone plasmatique régule l'expression de l'IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus et quels seraient les mécanismes potentiels impliqués dans cette relation. Ces données renforcent, quoi qu'il en soit, l'idée que la corticostérone périphérique puisse être une cible dans la régulation du métabolisme chez les sujets obèses. Nous avons également montré que l'amélioration de la prise alimentaire par l'OFS chez les souris *db/db* n'est pas associée à une modulation de l'expression génique des neuropeptides NPY, POMC et CART dans l'hypothalamus. Cependant, une étude précédente suggère que l'expression de ces neuropeptides soit régulée par la quantité de masse grasse de l'organisme (Schele et al., 2013). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'OFS sur la répartition de la masse corporelle chez les souris obèses. Les souris *db/db* traitées avec de l'OFS ayant un poids corporel similaire à celle des souris *db/db* témoins, il est possible que l'OFS ne modifie pas la proportion de masse grasse chez ces souris. Ces résultats suggèrent que différents mécanismes indépendants participent à la régulation de la prise alimentaire. Mieux comprendre ces mécanismes dans le contexte de l'obésité est important, puisque cela pourrait permettre de mettre en place de nouvelles stratégies visant à réguler la prise alimentaire chez les sujets obèses.

Bien que les effets soient plus modestes que pour l'OFS, nous avons montré que la consommation chronique d'AGPI n-3 et d'antioxydants diminuait à la fois la glycémie postprandiale et la sensibilité à l'insuline, en particulier chez les souris *db/db* (**chapitre 2**). Ces résultats sont en accord avec des études dans lesquelles une supplémentation en AGPI n-3, sous forme du précurseur ALA ou *via* l'administration d'EPA et de DHA, améliore le contrôle de la glycémie chez des patients atteints d'un diabète de type 2. Plus spécifiquement, les AGPI n-3 améliorent la sécrétion et la sensibilité à l'insuline (Bhaswant et al., 2015; Fedor



and Kelley, 2009; Flachs et al., 2014; Kasbi-Chadli et al., 2014). De plus, le régime administré augmente également la quantité d' $\alpha$ -tocophérol dans le plasma, qui est connu pour son effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline (Alcala et al., 2015; Gray et al., 2011; Kim et al., 2013). Il est donc possible que ce soit la combinaison des AGPI n-3 et de l' $\alpha$ -tocophérol qui améliore la résistance à l'insuline. Il est difficile de conclure quant à l'implication du CoQ10 dans ces effets puisque la variabilité des résultats obtenus ne permet pas de mettre en évidence un potentiel impact du régime enrichi sur les niveaux plasmatiques de CoQ10. La résistance à l'insuline peut refléter une diminution de l'action de l'insuline au niveau du foie où a lieu la néoglucogénèse, le stockage de glycogène et la libération du glucose dans la circulation. Il est donc possible que le régime enrichi améliore la régulation glycémique au niveau hépatique. Nous avons en effet montré que le régime enrichi en AGPI n-3/antioxydants diminue l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  dans le foie des souris *db/db*. Ces résultats sont en accord avec une étude qui montre que l'administration d' $\alpha$ -tocopherol dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hyperlipidique diminue à la fois la résistance à l'insuline et l'expression hépatique de l'ARNm de PPAR $\gamma$  (Kim et al., 2013). De plus, des revues récentes proposent PPAR $\gamma$  comme une cible dans le traitement de l'insulino-résistance chez les individus atteints de diabète de type 2 (Chigurupati et al., 2015; Choi et al., 2014; Matsuda et al., 2014; Stump et al., 2015). D'après ces résultats, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'OFS (**chapitre 3**) sur les altérations hépatiques des souris *db/db* puisqu'il est possible que l'OFS agisse non seulement au niveau de l'hypothalamus pour réguler la prise alimentaire, mais également au niveau du foie pour améliorer le métabolisme du glucose.

L'ensemble de ces résultats montrent donc qu'une modification chronique du régime alimentaire permet d'améliorer le profil métabolique des souris *db/db*. Cependant, il est nécessaire de poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans ces effets, puisqu'ils semblent être multiples. Dans un second temps, nous avons caractérisé l'impact des deux régimes utilisés dans les **chapitres 2 et 3** sur les altérations comportementales associées à l'obésité.

### **C. Altérations cognitives associées à l'obésité**

Comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe II.A de cette introduction, les souris *db/db* présentent des comportements de type anxieux dans les différents tests comportementaux que nous avons utilisé, mais également des altérations de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe. Nous avons montré dans un premier temps que ces

souris présentent des troubles de la mémoire à court terme, évaluée dans le test du labyrinthe en Y. En effet, les souris *db/db* ne se rappellent pas quel est le bras nouveau dans ce test, puisque le temps passé dans ce bras n'est pas différent du hasard (33 %) alors que les souris *db/+* passent plus de temps dans le bras nouveau lors de la phase de rétention (**chapitre 3**). Ces résultats sont ainsi en accord avec ceux précédemment obtenus au laboratoire et par d'autres équipes, qui montrent que les souris *db/db* présentent des déficits cognitifs dans ce test (Dinel et al., 2011; Erion et al., 2014; Zhao et al., 2012). Une autre version du test du labyrinthe en Y a également été utilisée pour tester la mémoire spatiale chez les souris *db/db*. Dans cette version, les animaux peuvent explorer librement les trois bras du dispositif. Les entrées successives dans chacun de ces bras sont définies comme alternance spontanée et reflète la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe. Comme dans la version que nous avons utilisée, les souris *db/db* présentent des déficits mnésiques dans ce test (Sharma et al., 2010).

Dans le test de la piscine de Morris, nous avons mis en évidence chez les souris *db/db* des altérations de la mémoire spatiale, mais pas de l'apprentissage (**chapitre 2**). Nos résultats concernant les performances cognitives lors de la phase d'apprentissage sont en désaccord avec d'autres études réalisées chez les souris *db/db*, qui montrent au contraire des déficits d'apprentissage chez ces souris. Cependant, il est important de souligner certaines différences majeures entre le protocole que nous avons utilisé, qui a été validé au laboratoire (Bensalem et al., 2016), et les protocoles utilisés dans ces études. En effet, dans les études rapportant un déficit d'apprentissage (Stranahan et al., 2008; Stranahan et al., 2009; Zhao et al., 2011), les animaux ne sont soumis à aucune phase d'habituation. Or, cette phase est importante puisqu'elle permet de s'affranchir du stress auquel les animaux sont soumis lorsqu'ils ne sont pas habitués à l'eau et à la nage. Ce stress pourrait vraisemblablement influencer les performances lors de la phase d'apprentissage. En accord avec cette hypothèse, il a été décrit que les performances d'apprentissage spatial dans le test de la piscine de Morris étaient améliorées lorsque les animaux étaient habitués à la manipulation par l'expérimentateur ou étaient soumis à des phases d'habituation avant l'apprentissage (Holscher, 1999). De plus, le stress diminue les performances d'apprentissage dans cette tâche chez la souris (Park et al., 2015; Shang et al., 2016). A notre connaissance, la réponse comportementale des souris *db/db* à l'exposition au stress n'a pas été mesurée, mais il est possible que le stress induit par le nouvel environnement et la nage altère l'apprentissage des souris *db/db* si elles n'ont pas été soumises à une habituation préalable. Par ailleurs, certaines études ne montrent que le temps

mis par les souris avant d'atteindre la plateforme (Zheng et al., 2016). Or, la vitesse de nage des souris *db/db* est diminuée d'environ 50 % en comparaison aux souris *db/+* (Zhao et al., 2012). Il est donc important de mesurer la distance parcourue avant d'atteindre la plateforme, comme nous l'avons fait dans notre étude. Nous avons également décrit des altérations de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez les souris *db/db*, pendant la phase de rétention réalisée 72 h après la fin de l'apprentissage. Pendant cette phase, les souris *db/db* nagent de façon aléatoire dans la piscine alors que les souris *db/+* passent plus de temps dans le quadrant dans lequel la plateforme se trouvait pendant la phase d'apprentissage. Ces résultats confirment et renforcent ceux de nombreuses études précédentes rapportant des altérations de mémoire spatiale à long terme dans ce test chez les souris *db/db* (Stranahan et al., 2008; Zhao et al., 2011; Zhao et al., 2012; Zheng et al., 2016). En effet, les capacités d'apprentissage des souris *db/db* étant diminuées dans ces études, les souris n'atteignent pas les mêmes performances à la fin de la phase d'apprentissage, ce qui constitue un biais pour évaluer les performances mnésiques lors du test de rétention, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions expérimentales.

Ainsi, nous avons confirmé la mise en place de comportements de type anxieux et d'altérations de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez les souris *db/db*. Nous avons donc évalué si les deux approches nutritionnelles utilisées dans les **chapitres 2 et 3** amélioreraient ces altérations comportementales et quels mécanismes participaient à ces éventuelles améliorations comportementales.

### **D. Approches nutritionnelles, altérations comportementales et mécanismes neurobiologiques associés**

Dans un premier temps, nous avons montré qu'une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 et antioxydants ou en OFS n'avait pas d'impact sur les comportements de type anxieux chez les souris *db/db*. Les nutriments que nous avons choisis dans ces études sont capables d'améliorer les troubles de l'humeur, en particulier chez des patients dépressifs et dans des modèles animaux d'altérations émotionnelles. Par exemple, nous avons mis en évidence au laboratoire qu'une supplémentation nutritionnelle en EPA et DHA diminue les comportements de type anxieux induits par un stress chronique de défaite sociale (Larrieu et al., 2014). De plus, des altérations du microbiote intestinal ont été associées à l'induction ou à la diminution de symptômes anxieux et/ou dépressifs. Cependant, il est important de noter que les études réalisées au cours de cette thèse sont les premières à évaluer l'impact de ces

nutriments sur les altérations émotionnelles dans un contexte d'obésité. Ces résultats sont toutefois en accord avec l'étude réalisée dans le **chapitre 1** dans laquelle nous avons mis en évidence un rôle du TNF- $\alpha$  hippocampique dans le développement des comportements de type anxieux chez les souris *db/db*. En effet, l'OFS et le régime AGPI n-3/antioxydants n'améliorent pas l'expression génique du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe des souris *db/db*. Ainsi, ces données confirment indirectement qu'une diminution des taux de TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe est nécessaire à l'amélioration des comportements de type anxieux associés à l'obésité.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence une amélioration de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez les souris *db/db* ayant consommé le régime AGPI n-3/antioxydants pendant 10 semaines. Ce résultat confirme que les AGPI n-3 et les antioxydants sont capables d'améliorer la mémoire spatiale dans des contextes d'altérations cognitives. En effet, une supplémentation en EPA et DHA améliore la mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris chez des souris âgées (Labrousse et al., 2012). Un régime enrichi en polyphénols issus de raisin et de myrtille améliore également les performances mnésiques dans ce test chez des souris âgées (Bensalem et al., 2016). De plus, l'administration de CoQ10 associé à de l' $\alpha$ -tocophérol améliore les performances cognitives des souris dans le test du labyrinthe en T, alors que la consommation de CoQ10 ou d' $\alpha$ -tocophérol seuls n'a pas d'impact sur la cognition (McDonald et al., 2005).

De façon intéressante, nous avons montré que l'amélioration de la mémoire spatiale induite par le régime enrichi chez les souris *db/db* était associée à des changements de la composition des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA. Ces deux sous-types de récepteurs participent à la régulation de la PLT (Luscher and Malenka, 2012; Makino et al., 2011; Paoletti et al., 2013) dans l'hippocampe et donc à la mise en place des processus mnésiques (Bannerman et al., 2014; Tsien et al., 1996). Nos résultats, qui montrent que l'expression de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA est diminuée dans l'hippocampe des souris *db/db*, sont en accord avec des études réalisées chez des souris (Sasaki-Hamada et al., 2015) et des rats obèses (Grillo et al., 2011; Kollen et al., 2010). L'impact du régime enrichi sur la composition des récepteurs AMPA et NMDA est également en accord avec d'autres études montrant que la composition de ces récepteurs est modulée par les AGPI n-3 dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Calon et al., 2005) et par des antioxydants comme l'épicatéchine chez des souris saines (Schroeter et al., 2007). Notre étude est

cependant la première à montrer qu'un tel régime peut modifier la composition des récepteurs glutamatergiques dans un contexte d'obésité. L'impact du régime enrichi sur la composition des récepteurs AMPA et NMDA pourrait impliquer des modifications de la localisation des sous-unités qui les composent. En effet, les AGPI n-3, notamment le DHA, modifient la fluidité membranaire et la localisation cellulaire des récepteurs membranaires (De Smedt-Peyrusse et al., 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer, grâce à des extractions de synaptosomes, la composition des récepteurs AMPA et NMDA aux niveaux synaptique et extra-synaptique. Nos résultats suggèrent un rôle de la plasticité à long terme dans les effets bénéfiques du régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants sur la mémoire spatiale chez les souris *db/db*. Des études précédentes ont mis en évidence des altérations de la PLT dans l'hippocampe de ces souris (Erion et al., 2014; Li et al., 2002; Stranahan et al., 2008). De plus, les niveaux de PLT peuvent être améliorés par la consommation de régimes enrichis en EPA et DHA (Delpech et al., 2015b) ou en polyphénols (Wang et al., 2011). Des mesures de la PLT doivent donc être réalisées dans l'hippocampe de ces souris pour confirmer cette hypothèse.

Nous avons également montré que la régulation du métabolisme du glucose se fait par des mécanismes différents à la périphérie et dans le cerveau. Alors que le régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants diminue sensiblement la résistance à l'insuline à la périphérie, il n'a pas d'impact sur l'insulino-résistance dans l'hippocampe. En effet, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline est altérée dans l'hippocampe des souris *db/db*, quel que soit le régime. En effet, l'insuline n'induit pas l'activation de son récepteur dans l'hippocampe chez ces souris (Dey et al., 2014). En conditions normales, l'activation de ce récepteur induit notamment des phosphorylations inhibitrices sur des résidus sérines d'IRS1, participant à une boucle de régulation négative permettant la terminaison de l'action de l'insuline (Gual et al., 2005). L'insensibilité du récepteur à l'insuline chez les souris *db/db* ne permet pas la mise en place de cette régulation négative. Une étude a en effet mis en évidence une sur-activation de la voie de l'insuline observée par l'augmentation de la phosphorylation d'Akt et de GSK3 $\beta$  dans le cortex et l'hippocampe des souris *db/db* en comparaison à des souris témoins (Clodfelder-Miller et al., 2005). De nombreuses données convergent pour montrer que le développement d'une résistance à l'insuline dans l'hippocampe participe à la mise en place d'altérations cognitives dans des contextes d'obésité (Grillo et al., 2015; Spolcova et al., 2014; Wu et al., 2015), mais également chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Biessels and Reagan, 2015; Yarchoan and Arnold, 2014). Cependant, nos données suggèrent

que différents mécanismes participent au développement de ces altérations cognitives, puisque l'amélioration de la mémoire spatiale que nous avons montrée est indépendante d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans l'hippocampe.

Nos résultats suggèrent que la neurogenèse n'est pas impliquée dans les effets bénéfiques du régime AGPI n-3/antioxydants sur la mémoire. Cependant, bien que l'administration d'OFS n'ait pas d'impact non plus sur la neurogenèse, nous avons montré dans le **chapitre 3** que le nombre de néoneurones dans l'hippocampe est inversement corrélé à la densité de cellules microgliales et que cette relation prédit les performances mnésiques dans le test du labyrinthe en Y. De plus, l'administration chronique d'OFS diminue sensiblement les ramifications des cellules microgliales dans l'hippocampe, ce qui peut refléter une diminution de l'activation microgliale (Ransohoff and Perry, 2009). Même s'ils doivent être complétés, ces résultats suggèrent ainsi un lien complexe entre composition du microbiote intestinal, activation microgliale, neurogenèse hippocampe et altérations mnésiques chez les souris *db/db*. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes sous-tendant cette relation, puisqu'elle pourrait représenter une cible de choix dans le développement de stratégies permettant de réduire les altérations cognitives chez les sujets obèses.

D'autres mécanismes ont été mis en évidence dans la régulation de la cognition dans des modèles animaux d'obésité. Par exemple, les altérations de la mémoire spatiale des souris *db/db* peuvent être améliorées par une diminution de l'activité des GC (Stranahan et al., 2008). Cependant, l'administration d'AGPI n-3 et d'antioxydants améliore la mémoire spatiale des souris *db/db*, mais cette amélioration n'est pas associée à une diminution de la concentration de corticostérone dans le plasma, ni à une diminution de l'activation des GR dans l'hippocampe. A l'inverse, l'administration chronique d'OFS réduit les taux de corticostérone plasmatique, mais n'améliore pas la cognition. De même, une diminution des taux d'IL-1 $\beta$  dans l'hippocampe diminue les déficits cognitifs chez la souris *db/db* (Erion et al., 2014). Cependant, nous avons montré que l'activation des voies de signalisation MAPK p44/42 et p38 qui sont associées à cette cytokine n'est pas réduite par le régime enrichi, alors qu'il améliore la mémoire spatiale des souris *db/db*.

De façon surprenante, nous avons montré que le régime enrichi en AGPI n-3/antioxydants diminuait les performances mnésiques dans le test de la piscine de Morris chez les souris témoins *db/+*. On peut poser l'hypothèse qu'une supplémentation nutritionnelle

pourrait être délétère chez des sujets sains n'ayant pas de déficits cognitifs et n'ayant donc à priori pas besoin d'un apport supplémentaire en ces nutriments. En effet, une étude a montré que la consommation chronique d'un régime contenant une dose élevée de CoQ10 diminue les performances mnésiques dans le test de la piscine de Morris, alors qu'une dose plus faible de CoQ10 n'a pas d'impact sur la mémoire. De la même manière, une autre étude a montré un effet dose/réponse de l'administration du polyphénol épicatechine sur la mémoire spatiale dans ce même test. En effet, les souris ayant reçu une forte dose d'épicatechine ne se souviennent pas de l'emplacement de la plateforme pendant la phase de rétention. De plus, des études convergent vers l'idée que certains antioxydants comme la vitamine C ou l' $\alpha$ -tocopherol peuvent avoir des propriétés pro-oxydantes et ainsi augmenter la peroxydation des lipides et l'inflammation (Kondakci et al., 2013), en particulier lorsqu'ils sont ingérés en grandes quantités (Carocho and Ferreira, 2013).

---

Pour conclure, l'ensemble de ces données met en évidence la complexité des mécanismes qui sont impliqués dans le développement des altérations cognitives associées à l'obésité. Nos approches nutritionnelles suggèrent cependant qu'une combinaison d'AGPI n-3 et d'antioxydants pourrait être utilisée comme une stratégie non pharmacologique permettant de prévenir et/ou de réduire les troubles mnésiques associées à l'obésité. Nos résultats suggèrent également que les interventions modulant la plasticité synaptique pourraient être des stratégies prometteuses pour réduire ces altérations chez les individus obèses. Enfin, les manipulations du microbiote intestinal induites par des prébiotiques semblent mettre en évidence un lien entre microbiote intestinal, neurogenèse, inflammation et performances cognitives, ce qui suggère que de nouveaux mécanismes doivent encore être mis en évidence dans la régulation de la cognition chez les sujets obèses.

#### **IV. Conclusion générale et perspectives**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence le rôle clé du TNF- $\alpha$  hippocampique dans le développement de troubles de l'humeur associés à l'obésité. Nous avons pu montrer que l'inhibition du TNF- $\alpha$  cérébral améliore les comportements de type anxieux en diminuant l'activité spontanée des neurones glutamatergiques dans l'hippocampe

ventral. Ainsi, le TNF- $\alpha$  constitue une cible de choix dans le développement de stratégies visant à diminuer les troubles de l'humeur chez les individus obèses. Il sera toutefois nécessaire de mieux caractériser par quels mécanismes le TNF- $\alpha$  module la transmission synaptique dans l'hippocampe ventral. Cette cytokine est notamment capable d'interférer avec la production d'insuline et son action dans ses tissus cibles, en inhibant l'activation de sa voie de signalisation. La présence d'insulino-résistance dans des structures impliquées dans la régulation des émotions comme l'hippocampe suggère que l'insuline pourrait être un des intermédiaires par lesquels le TNF- $\alpha$  induit le développement de troubles de l'humeur dans le contexte de l'obésité. Afin de tester cette hypothèse, nous allons évaluer si l'inhibition du TNF- $\alpha$  diminue la résistance à l'insuline dans l'hippocampe des souris *db/db*. Cette perspective permettra de mieux comprendre le rôle du TNF- $\alpha$  dans les troubles de l'humeur associés à l'obésité et d'identifier de nouvelles cibles permettant de diminuer les altérations émotionnelles dans ce contexte. De plus, bien que l'hippocampe ventral soit important dans la mise en place de troubles émotionnelles, la régulation de l'humeur implique bien évidemment d'autres structures (amygdale, cortex préfrontal...) et il serait donc important d'établir un lien entre l'effet du TNF- $\alpha$  dans l'hippocampe ventral et les mécanismes mis en jeu dans ces structures.

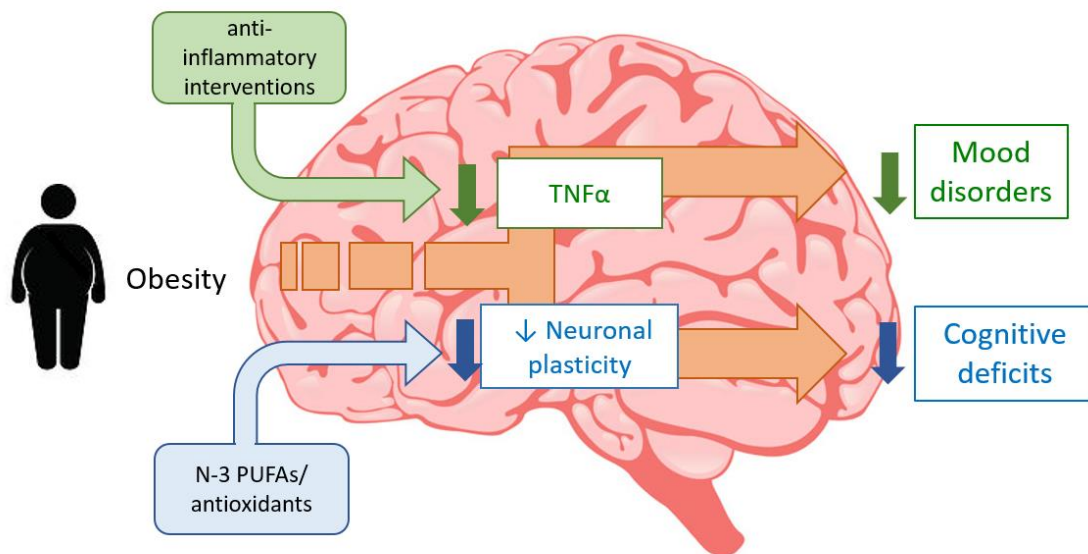
Dans un second temps, nous avons montré que la mise en place de stratégies nutritionnelles pouvait améliorer les altérations métaboliques et cognitives associées à l'obésité. En effet, des traitements permettant de modifier le microbiote intestinal, comme certains prébiotiques, pourraient être mis en place chez les individus obèses, puisque l'administration de prébiotiques chez la souris obèse *db/db* améliore les altérations métaboliques. De plus, la consommation d'un régime enrichi en AGPI n-3 et antioxydants améliore les performances mnésiques chez les souris obèses *via* des mécanismes impliquant probablement une amélioration de la plasticité synaptique dans l'hippocampe.

Il est important de mentionner que les travaux réalisés au cours de cette thèse contribuent à montrer que la régulation des émotions et de la cognition est sous-tendue par des mécanismes différents (Fig. 24). En effet, alors que l'inflammation semble être un mécanisme majeur dans la régulation des troubles de l'humeur, les résultats obtenus dans cette thèse ne plaident en revanche pas pour son implication dans l'amélioration de la cognition induite par les AGPI n-3 et par les antioxydants chez les souris *db/db*. On ne peut toutefois pas totalement exclure un rôle potentiel de l'inflammation dans les effets du régime enrichi, puisque son



impact n'a pas été évalué sur l'ensemble des cytokines (IL-4, IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc.) et des voies de signalisation qui leurs sont associées (I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, JNK, STAT1/2, etc.). Toutefois, il semble que la prise en charge des troubles neuropsychiatriques chez les sujets obèses doive prendre en compte les différents mécanismes participant à ces altérations comportementales afin d'améliorer à la fois l'humeur et la cognition chez ces patients.

En conclusion, les données obtenues au cours de cette thèse nous ont permis de mettre en évidence que l'inflammation, et plus spécifiquement le TNF- $\alpha$ , pouvait être une cible importante dans le développement de stratégies thérapeutiques visant à diminuer les troubles de l'humeur associées à l'inflammation, en particulier chez les sujets obèses. De plus, nous avons montré que des interventions nutritionnelles pouvaient constituer un traitement non pharmacologique permettant de réduire le développement de troubles métaboliques et/ou neuropsychiatriques, non seulement chez les patients obèses, mais également chez des patients atteints d'autres pathologies associées à des altérations neuropsychiatriques.



**Figure 24 : Différents mécanismes sont impliqués dans la régulation des altérations émotionnelles et cognitives associées à l'obésité / Different mechanisms are involved in the emotional and cognitive alterations associated with obesity**

## **V- General conclusion and perspectives**

In this thesis, we have first highlighted a main role of brain TNF- $\alpha$  in the development of mood disorders associated with obesity. We showed that inhibiting brain TNF- $\alpha$  improves anxiety-like behaviors in *db/db* mice through decreased spontaneous activity of glutamatergic

neurons in the ventral hippocampus. Hence, our results point to TNF- $\alpha$  as an important player in the development of mood disorders in obese patients. However, it will be necessary to understand how TNF- $\alpha$  modulates synaptic transmission within the ventral hippocampus. Among other potential mechanisms, this cytokine is able to interfere with insulin production and action in its target tissues, by inhibiting intracellular insulin signaling pathway. The insulin resistance reported in brain structures involved in mood regulation in *db/db* mice, such as the hippocampus, suggests that insulin may be a potential mediator of TNF- $\alpha$ -induced mood symptoms in obese patients. We will test this hypothesis by assessing if TNF- $\alpha$  inhibition decreases hippocampal insulin resistance in *db/db* mice. This should lead to a better knowledge of the role of TNF- $\alpha$  in mood disorders associated with obesity, and to identify new potential targets for improving mood alterations in this context. Moreover, although ventral hippocampus is a main structure in the development of emotional alterations, mood regulation also relies on other brain areas such as the amygdala and prefrontal cortex. Hence, it will be important to assess the link between TNF- $\alpha$  effect in the ventral hippocampus and its potential impact on the other brain areas of interest.

Secondly, we reported a potential beneficial effect of nutritional intervention on metabolic and cognitive alterations associated with obesity. Indeed, manipulating the gut microbiota with nutritional approaches, such as prebiotic administration, could be used in obese subjects, since it improved metabolic alterations in *db/db* mice. Moreover, n-3 PUFAs/antioxidants chronic consumption improved memory performances in *db/db* mice through mechanisms likely involving improved synaptic plasticity within the hippocampus.

It is important to note that this work contributes to show that different mechanisms respectively underlie mood and cognition (Fig. 24). Indeed, whereas inflammation seems to be a main player in the regulation of mood, the data obtained during this thesis suggest that it is unlikely involved in n-3 PUFAs/antioxidants-induced cognitive improvements in *db/db* mice. We cannot however totally exclude a role of inflammatory processes in these effects since the impact of n-3 PUFAs/antioxidant supplementation has not been assessed on other cytokines (IL-4, IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc.) and associated signaling pathways (I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, JNK, STAT1/2, etc.). Although some issues remain opened, this work highlights the necessity of carefully taking into account the different mechanisms respectively underlying mood and cognitive alterations associated with obesity in order to improve the management of these neuropsychiatric symptoms.

To conclude, this work contributes to show that inflammation, especially TNF- $\alpha$ , could be a promising target in the development of therapeutic strategies aiming at decreasing mood symptoms associated with inflammation, particularly in obese patients. Moreover, nutritional interventions may represent a non-pharmacological strategy to decrease metabolic and/or neuropsychiatric alterations, not only in obese patients, but also in other conditions associated with neuropsychiatric disorders.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



**A**

- Abelson, J.L., and Curtis, G.C. (1996). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in panic disorder. 24-hour secretion of corticotropin and cortisol. *Arch Gen Psychiatry* 53, 323-331.
- Agudelo, L.Z., Femenia, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Goiny, M., Martinez-Redondo, V., Correia, J.C., Izadi, M., Bhat, M., Schuppe-Koistinen, I., *et al.* (2014). Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159, 33-45.
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., and Tompkins, T. (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol Motil* 26, 510-520.
- Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Alcala, M., Sanchez-Vera, I., Sevillano, J., Herrero, L., Serra, D., Ramos, M.P., and Viana, M. (2015). Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 23, 1598-1606.
- Alexander, K.S., Wu, H.Q., Schwarcz, R., and Bruno, J.P. (2012). Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: normalization by the  $\alpha$ 7 positive modulator galantamine. *Psychopharmacology (Berl)* 220, 627-637.
- Allison, D.J., and Ditor, D.S. (2014). The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target. *J Neuroinflammation* 11, 151.
- Alosco, M.L., and Gunstad, J. (2014). The negative effects of obesity and poor glycemic control on cognitive function: a proposed model for possible mechanisms. *Curr Diab Rep* 14, 495.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
- Andersen, J.R., Aasprang, A., Bergsholm, P., Sletteskog, N., Vage, V., and Natvig, G.K. (2010). Anxiety and depression in association with morbid obesity: changes with improved physical health after duodenal switch. *Health Qual Life Outcomes* 8, 52.
- Anderson, S.E., Cohen, P., Naumova, E.N., Jacques, P.F., and Must, A. (2007). Adolescent obesity and risk for subsequent major depressive disorder and anxiety disorder: prospective evidence. *Psychosom Med* 69, 740-747.
- Andre, C., Dinel, A.L., Ferreira, G., Laye, S., and Castanon, N. (2014). Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun*.
- Andre, C., O'Connor, J.C., Kelley, K.W., Lestage, J., Dantzer, R., and Castanon, N. (2008). Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 200, 90-99.
- Anhe, F.F., Pilon, G., Roy, D., Desjardins, Y., Levy, E., and Marette, A. (2016). Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? *Gut Microbes* 7, 146-153.
- Anhe, F.F., Roy, D., Pilon, G., Dudonne, S., Matamoros, S., Varin, T.V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E., *et al.* (2015a). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64, 872-883.

- Anhe, F.F., Varin, T.V., Le Barz, M., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, D., and Marette, A. (2015b). Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr Obes Rep* 4, 389-400.
- Aniszewska, A., Chlodzinska, N., Bartkowska, K., Winnicka, M.M., Turlejski, K., and Djavadian, R.L. (2015). The expression of interleukin-6 and its receptor in various brain regions and their roles in exploratory behavior and stress responses. *J Neuroimmunol* 284, 1-9.
- Antalis, C.J., Stevens, L.J., Campbell, M., Pazdro, R., Ericson, K., and Burgess, J.R. (2006). Omega-3 fatty acid status in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 299-308.
- Apovian, C.M. (2016). Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 22, s176-185.
- Appleton, K.M., Rogers, P.J., and Ness, A.R. (2010). Updated systematic review and meta-analysis of the effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on depressed mood. *Am J Clin Nutr* 91, 757-770.
- Asakawa, A., Inui, A., Inui, T., Katsuura, G., Fujino, M.A., and Kasuga, M. (2003). Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. *J Diabetes Complications* 17, 105-107.
- Auvinen, H.E., Romijn, J.A., Biermasz, N.R., Pijl, H., Havekes, L.M., Smit, J.W., Rensen, P.C., and Pereira, A.M. (2012). The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. *J Endocrinol* 214, 191-197.

## B

- Badolato, R., Wang, J.M., Murphy, W.J., Lloyd, A.R., Michiel, D.F., Bausserman, L.L., Kelvin, D.J., and Oppenheim, J.J. (1994). Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 180, 203-209.
- Balasingam, V., and Yong, V.W. (1996). Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci* 16, 2945-2955.
- Banasr, M., Soumier, A., Hery, M., Mocaer, E., and Daszuta, A. (2006). Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59, 1087-1096.
- Bannerman, D.M., Deacon, R.M., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., and Rawlins, J.N. (2002). Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116, 884-901.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B.K., Feldon, J., and Rawlins, J.N. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139, 197-213.
- Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N., Monyer, H., and Seeburg, P.H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 15, 181-192.
- Barbosa, I.G., Bauer, M.E., Machado-Vieira, R., and Teixeira, A.L. (2014). Cytokines in bipolar disorder: paving the way for neuroprogression. *Neural Plast* 2014, 360481.
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80.
- Bayramgurler, D., Karson, A., Ozer, C., and Utkan, T. (2013). Effects of long-term etanercept treatment on anxiety- and depression-like neurobehaviors in rats. *Physiol Behav* 119, 145-148.
- Bazinet, R.P., and Laye, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 771-785.
- Belchior, T., Paschoal, V.A., Magdalon, J., Chimin, P., Farias, T.M., Chaves-Filho, A.B., Gorjao, R., St-Pierre, P., Miyamoto, S., Kang, J.X., *et al.* (2015). Omega-3 fatty acids protect from diet-induced



- obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent actions. *Mol Nutr Food Res* 59, 957-967.
- Bellavance, M.A., and Rivest, S. (2014). The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front Immunol* 5, 136.
- Bendelac, A., Bonneville, M., and Kearney, J.F. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1, 177-186.
- Benito-Leon, J., Mitchell, A.J., Hernandez-Gallego, J., and Bermejo-Pareja, F. (2013). Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: a population-based cross-sectional study (NEDICES). *Eur J Neurol* 20, 899-906, e876-897.
- Benn, T., Kim, B., Park, Y.K., Wegner, C.J., Harness, E., Nam, T.G., Kim, D.O., Lee, J.S., and Lee, J.Y. (2014). Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem*.
- Bensalem, J., Servant, L., Alfos, S., Gaudout, D., Laye, S., Pallet, V., and Lafenetre, P. (2016). Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. *Front Behav Neurosci* 10, 9.
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3-8.
- Beurel, E., and Jope, R.S. (2008). Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 283, 21934-21944.
- Bhaswant, M., Poudyal, H., and Brown, L. (2015). Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 26, 571-584.
- Biessels, G.J., and Reagan, L.P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 16, 660-671.
- Birch, A.M. (2014). The contribution of astrocytes to Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 42, 1316-1320.
- Bischof, G.N., and Park, D.C. (2015). Obesity and Aging: Consequences for Cognition, Brain Structure, and Brain Function. *Psychosom Med*.
- Bizon, J.L., Helm, K.A., Han, J.S., Chun, H.J., Pucilowska, J., Lund, P.K., and Gallagher, M. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur J Neurosci* 14, 1739-1751.
- Bjorntorp, P. (1991). Adipose tissue distribution and function. *International journal of obesity* 15 Suppl 2, 67-81.
- Blackburn, G. (1995). Effect of degree of weight loss on health benefits. *Obes Res* 3 Suppl 2, 211s-216s.
- Blazquez, E., Velazquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J.M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 161.
- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Blouin, K., Boivin, A., and Tchernof, A. (2008). Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108, 272-280.
- Boado, R.J., Golden, P.L., Levin, N., and Pardridge, W.M. (1998). Up-regulation of blood-brain barrier short-form leptin receptor gene products in rats fed a high fat diet. *J Neurochem* 71, 1761-1764.

- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., and Ferreira, G. (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun*.
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Laye, S., and Ferreira, G. (2012). Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22, 2095-2100.
- Boitard, C., Maroun, M., Tantot, F., Cavaroc, A., Sauvant, J., Marchand, A., Laye, S., Capuron, L., Darnaudery, M., Castanon, N., *et al.* (2015). Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. *J Neurosci* 35, 4092-4103.
- Bomholt, S.F., Harbuz, M.S., Blackburn-Munro, G., and Blackburn-Munro, R.E. (2004). Involvement and role of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) stress axis in animal models of chronic pain and inflammation. *Stress* 7, 1-14.
- Born, J., Ditschuneit, I., Schreiber, M., Dodt, C., and Fehm, H.L. (1995). Effects of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *Eur J Endocrinol* 132, 705-711.
- Bornstein, S.R., and Rutkowski, H. (2002). The adrenal hormone metabolism in the immune/inflammatory reaction. *Endocr Res* 28, 719-728.
- Boscaro, M., Paoletta, A., Scarpa, E., Barzon, L., Fusaro, P., Fallo, F., and Sonino, N. (1998). Age-related changes in glucocorticoid fast feedback inhibition of adrenocorticotropin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1380-1383.
- Boukouvalas, G., Antoniou, K., Papalexi, E., and Kitraki, E. (2008). Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* 153, 373-382.
- Bozzatello, P., Brignolo, E., De Grandi, E., and Bellino, S. (2016). Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Psychiatric Disorders: A Review of Literature Data. *J Clin Med* 5.
- Braida, D., Sacerdote, P., Panerai, A.E., Bianchi, M., Aloisi, A.M., Iosue, S., and Sala, M. (2004). Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav Brain Res* 153, 423-429.
- Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L., and Charney, D.S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157, 115-118.
- Bruce-Keller, A.J., Salbaum, J.M., Luo, M., Blanchard, E.t., Taylor, C.M., Welsh, D.A., and Berthoud, H.R. (2015). Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry* 77, 607-615.
- Brunault, P., Jacobi, D., Miknius, V., Bourbao-Tournois, C., Hutten, N., Gaillard, P., Couet, C., Camus, V., and Ballon, N. (2012). High preoperative depression, phobic anxiety, and binge eating scores and low medium-term weight loss in sleeve gastrectomy obese patients: a preliminary cohort study. *Psychosomatics* 53, 363-370.
- Buckman, L.B., Hasty, A.H., Flaherty, D.K., Buckman, C.T., Thompson, M.M., Matlock, B.K., Weller, K., and Ellacott, K.L. (2014). Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* 35, 33-42.
- Burcelin, R., and Gourdy, P. (2016). Harnessing glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the pharmacological treatment of overweight and obesity. *Obes Rev*.
- Burda, J.E., Bernstein, A.M., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275 Pt 3, 305-315.

**C**

- Cai, D., and Liu, T. (2012). Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF-kappaB. *Aging (Albany NY)* 4, 98-115.
- Calder, P.C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83, 1505S-1519S.
- Calder, P.C. (2013). n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc* 72, 326-336.
- Calle, M.C., and Fernandez, M.L. (2012). Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 38, 183-191.
- Calon, F., Lim, G.P., Morihara, T., Yang, F., Ubeda, O., Salem, N., Jr., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2005). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 22, 617-626.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., and MacQueen, G.M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 161, 598-607.
- Canello, R., and Clement, K. (2006). Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113, 1141-1147.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., *et al.* (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481.
- Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2007). Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 729-734.
- Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 15, 1546-1558.
- Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., and Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279-288.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., *et al.* (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091-1103.
- Capuron, L., and Castanon, N. (2016). Role of Inflammation in the Development of Neuropsychiatric Symptom Domains: Evidence and Mechanisms. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Capuron, L., and Dantzer, R. (2003). Cytokines and depression: the need for a new paradigm. *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1, S119-124.
- Capuron, L., Lasselin, J., and Castanon, N. (2016). Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. *Neuropsychopharmacology*.
- Capuron, L., and Miller, A.H. (2011). Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 130, 226-238.

- Carey, M., Small, H., Yoong, S.L., Boyes, A., Bisquera, A., and Sanson-Fisher, R. (2014). Prevalence of comorbid depression and obesity in general practice: a cross-sectional survey. *Br J Gen Pract* 64, e122-127.
- Carney, R.M., Freedland, K.E., Miller, G.E., and Jaffe, A.S. (2002). Depression as a risk factor for cardiac mortality and morbidity: a review of potential mechanisms. *J Psychosom Res* 53, 897-902.
- Carocho, M., and Ferreira, I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51, 15-25.
- Carpenter, K.M., Hasin, D.S., Allison, D.B., and Faith, M.S. (2000). Relationships between obesity and DSM-IV major depressive disorder, suicide ideation, and suicide attempts: results from a general population study. *Am J Public Health* 90, 251-257.
- Castanon, N., Lasselin, J., and Capuron, L. (2014). Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 74.
- Castanon, N., Luheshi, G., and Laye, S. (2015). Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci* 9, 229.
- Castonguay, T.W., Dallman, M.F., and Stern, J.S. (1986). Some metabolic and behavioral effects of adrenalectomy on obese Zucker rats. *Am J Physiol* 251, R923-933.
- Cavaillon, J.M., and Haeffner-Cavaillon, N. (1993). [Cytokines and inflammation]. *Rev Prat* 43, 547-552.
- Chabry, J., Nicolas, S., Cazareth, J., Murriss, E., Guyon, A., Glaichenhaus, N., Heurteaux, C., and Petit-Paitel, A. (2015). Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. *Brain Behav Immun*.
- Chalut-Carpentier, A., Pataky, Z., Golay, A., and Bobbioni-Harsch, E. (2015). Involvement of dietary Fatty acids in multiple biological and psychological functions, in morbidly obese subjects. *Obes Surg* 25, 1031-1038.
- Chess, A.C., Landers, A.M., and Bucci, D.J. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behav Brain Res* 201, 325-331.
- Chigurupati, S., Dhanaraj, S.A., and Balakumar, P. (2015). A step ahead of PPARgamma full agonists to PPARgamma partial agonists: therapeutic perspectives in the management of diabetic insulin resistance. *Eur J Pharmacol* 755, 50-57.
- Choi, H.N., Kang, M.J., Lee, S.J., and Kim, J.I. (2014). Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Nutr Res Pract* 8, 544-549.
- Chun, O.K., Chung, S.J., Claycombe, K.J., and Song, W.O. (2008). Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J Nutr* 138, 753-760.
- Clayton, N.S., and Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272-274.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Jr., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., *et al.* (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.
- Cline, B.H., Costa-Nunes, J.P., Cespuglio, R., Markova, N., Santos, A.I., Bukhman, Y.V., Kubatiev, A., Steinbusch, H.W., Lesch, K.P., and Strekalova, T. (2015). Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression. *Front Behav Neurosci* 9, 37.

- Cline, B.H., Steinbusch, H.W., Malin, D., Revishchin, A.V., Pavlova, G.V., Cespuglio, R., and Strekalova, T. (2012). The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. *BMC Neurosci* 13, 110.
- Clodfelder-Miller, B., De Sarno, P., Zmijewska, A.A., Song, L., and Jope, R.S. (2005). Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 280, 39723-39731.
- Coll, A.P., and Loraine Tung, Y.C. (2009). Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 300, 147-151.
- Collin, M., Hakansson-Ovesjo, M.L., Misane, I., Ogren, S.O., and Meister, B. (2000). Decreased 5-HT transporter mRNA in neurons of the dorsal raphe nucleus and behavioral depression in the obese leptin-deficient ob/ob mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 81, 51-61.
- Collins, S.M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 10, 735-742.
- Considine, R.V. (2001). Regulation of leptin production. *Rev Endocr Metab Disord* 2, 357-363.
- Cota, D., Proulx, K., and Seeley, R.J. (2007). The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132, 2158-2168.
- Couper, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180, 5771-5777.
- Cray, C. (2012). Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci* 105, 113-150.
- Crupi, R., and Cuzzocrea, S. (2016). Neuroinflammation and immunity: a new pharmacological target in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13, 701-712.
- Cryan, J.F., and Slattery, D.A. (2007). Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20, 1-7.

## D

- D'Mello, C., Le, T., and Swain, M.G. (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor $\alpha$  signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* 29, 2089-2102.
- da Silva Dias, I.C., Carabelli, B., Ishii, D.K., de Moraes, H., de Carvalho, M.C., Rizzo de Souza, L.E., Zanata, S.M., Brandao, M.L., Cunha, T.M., Ferraz, A.C., *et al.* (2015). Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. *Mol Neurobiol*.
- Dahlgren, J., Nilsson, C., Jennische, E., Ho, H.P., Eriksson, E., Niklasson, A., Bjorntorp, P., Albertsson Wikland, K., and Holmang, A. (2001). Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E326-334.
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933, 222-234.
- Dantzer, R. (2006). Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin* 24, 441-460.
- Dantzer, R., Heijnen, C.J., Kavelaars, A., Laye, S., and Capuron, L. (2014). The neuroimmune basis of fatigue. *Trends Neurosci* 37, 39-46.

- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9, 46-56.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Lawson, M.A., and Kelley, K.W. (2011). Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology* 36, 426-436.
- Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., and Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460, 563-572.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24, 488-522.
- de Guia, R.M., and Herzig, S. (2015). How Do Glucocorticoids Regulate Lipid Metabolism? *Adv Exp Med Biol* 872, 127-144.
- de Haas, A.H., Boddeke, H.W., and Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56, 888-894.
- De Smedt-Peyrusse, V., Sargueil, F., Moranis, A., Harizi, H., Mongrand, S., and 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.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199.
- Del Rio, D., Morales, L., Ruiz-Gayo, M., and Del Olmo, N. (2016). Effect of high-fat diets on mood and learning performance in adolescent mice. *Behav Brain Res* 311, 167-172.
- Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G.F., and Gold, L.H. (2000). Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* 73, 31-48.
- Delpech, J.C., Madore, C., Joffre, C., Aubert, A., Kang, J.X., Nadjar, A., and Laye, S. (2015a). Transgenic increase in n-3/n-6 fatty acid ratio protects against cognitive deficits induced by an immune challenge through decrease of neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 40, 525-536.
- Delpech, J.C., Thomazeau, A., Madore, C., Bosch-Bouju, C., Larrieu, T., Lacabanne, C., Remus-Borel, J., Aubert, A., Joffre, C., Nadjar, A., *et al.* (2015b). Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment. *Neuropsychopharmacology*.
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Backhed, F., and Cani, P.D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol* 7, 639-646.
- Derijk, R.H., and de Kloet, E.R. (2008). Corticosteroid receptor polymorphisms: determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol* 583, 303-311.
- Despres, J.P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887.
- Devore, E.E., Kang, J.H., Stampfer, M.J., and Grodstein, F. (2013). The association of antioxidants and cognition in the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 177, 33-41.
- Dey, A., Hao, S., Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., and Stranahan, A.M. (2014). Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. *J Neuroimmunol*.
- Di Filippo, M., Chiasserini, D., Gardoni, F., Viviani, B., Tozzi, A., Giampa, C., Costa, C., Tantucci, M., Zianni, E., Boraso, M., *et al.* (2013). Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Dis* 52, 229-236.

- Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2012). Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1369-1378.
- Dinareello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., and Castanon, N. (2011). Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One* 6, e24325.
- Dinel, A.L., Andre, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laye, S., and Castanon, N. (2014). Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 40, 48-59.
- Dixon, J.B., Dixon, M.E., and O'Brien, P.E. (2003). Depression in association with severe obesity: changes with weight loss. *Arch Intern Med* 163, 2058-2065.
- Donath, M.Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov* 13, 465-476.
- Drever, B.D., Riedel, G., and Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 221, 505-514.
- Duclos, M., Gatta, B., Corcuff, J.B., Rashedi, M., Pehourcq, F., and Roger, P. (2001). Fat distribution in obese women is associated with subtle alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and sensitivity to glucocorticoids. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 447-454.

## E

- Ebihara, K., Ogawa, Y., Katsuura, G., Numata, Y., Masuzaki, H., Satoh, N., Tamaki, M., Yoshioka, T., Hayase, M., Matsuoka, N., *et al.* (1999). Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 48, 2028-2033.
- Elias, M.F., Elias, P.K., Sullivan, L.M., Wolf, P.A., and D'Agostino, R.B. (2005). Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiol Aging* 26 *Suppl 1*, 11-16.
- Engler, H., Benson, S., Wegner, A., Spreitzer, I., Schedlowski, M., and Elsenbruch, S. (2016). Men and women differ in inflammatory and neuroendocrine responses to endotoxin but not in the severity of sickness symptoms. *Brain Behav Immun* 52, 18-26.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., and Ab Wahab, M.S. (2014). Modulation of gut microbiota in the management of metabolic disorders: the prospects and challenges. *Int J Mol Sci* 15, 4158-4188.
- Erion, J.R., Wosiski-Kuhn, M., Dey, A., Hao, S., Davis, C.L., Pollock, N.K., and Stranahan, A.M. (2014). Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 34, 2618-2631.
- Ernst, M.B., Wunderlich, C.M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S.B., Kleinridders, A., Husch, A., Munzberg, H., Hampel, B., *et al.* (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci* 29, 11582-11593.
- Esmaily, H., Sahebkar, A., Iranshahi, M., Ganjali, S., Mohammadi, A., Ferns, G., and Ghayour-Mobarhan, M. (2015). An investigation of the effects of curcumin on anxiety and depression in obese individuals: A randomized controlled trial. *Chin J Integr Med*.
- Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2014). *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic db/db Mice. *MBio* 5.

Everson-Rose, S.A., Lewis, T.T., Karavolos, K., Dugan, S.A., Wesley, D., and Powell, L.H. (2009). Depressive symptoms and increased visceral fat in middle-aged women. *Psychosom Med* 71, 410-416.

**F**

Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., *et al.* (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110, 1093-1103.

Farrar, W.L., Kilian, P.L., Ruff, M.R., Hill, J.M., and Pert, C.B. (1987). Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol* 139, 459-463.

Fedor, D., and Kelley, D.S. (2009). Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 138-146.

Finger, B.C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2010). Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. *Psychopharmacology (Berl)* 210, 559-568.

Finkelstein, J.A., Chance, W.T., and Fischer, J.E. (1982). Brain serotonergic activity and plasma amino acid levels in genetically obese Zucker rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17, 939-944.

Flachs, P., Rossmeisl, M., and Kopecky, J. (2014). The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res* 63 Suppl 1, S93-118.

Fleming, P., Roubille, C., Richer, V., Starnino, T., McCourt, C., McFarlane, A., Siu, S., Kraft, J., Lynde, C., Pope, J.E., *et al.* (2015). Effect of biologics on depressive symptoms in patients with psoriasis: a systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29, 1063-1070.

Fontani, G., Corradeschi, F., Felici, A., Alfatti, F., Migliorini, S., and Lodi, L. (2005). Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 35, 691-699.

Forsythe, L.K., Wallace, J.M., and Livingstone, M.B. (2008). Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev* 21, 117-133.

Fourrier, C., Castanon, C., and Laye, S. (2015a). Les troubles de l'humeur associés à l'obésité et au diabète de type 2 : rôle de la neuroinflammation. *Diabète et Obésité* 10, 180-184.

Fourrier, C., Castanon, N., and Laye, S. (2015b). Rôle de l'inflammation dans la dépression associée au diabète. *Nutrition et Endocrinologie* 13, 34-36.

Francis, H., and Stevenson, R. (2013). The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* 63, 119-128.

Freire, M.O., and Van Dyke, T.E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000 63, 149-164.

Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K.W., Dantzer, R., and Castanon, N. (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516-531.

Fried, S.K., Ricci, M.R., Russell, C.D., and Laferrere, B. (2000). Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 130, 3127S-3131S.

Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.



Frodl, T., Schaub, A., Banac, S., Charypar, M., Jager, M., Kummler, P., Bottlender, R., Zetsche, T., Born, C., Leinsinger, G., *et al.* (2006). Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. *J Psychiatry Neurosci* 31, 316-323.

Fu, X.Y., Li, H.Y., Jiang, Q.S., Cui, T., Jiang, X.H., Zhou, Q.X., and Qiu, H.M. (2016). Infliximab ameliorating depression-like behavior through inhibiting the activation of the IDO-HAAO pathway mediated by tumor necrosis factor-alpha in a rat model. *Neuroreport* 27, 953-959.

Furet, J.P., Kong, L.C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.L., Mariat, D., Corthier, G., Dore, J., Henegar, C., *et al.* (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049-3057.

Furtado, M., and Katzman, M.A. (2015a). Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res.*

Furtado, M., and Katzman, M.A. (2015b). Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Res* 229, 37-48.

## G

Ganjali, S., Sahebkar, A., Mahdipour, E., Jamialahmadi, K., Torabi, S., Akhlaghi, S., Ferns, G., Parizadeh, S.M., and Ghayour-Mobarhan, M. (2014). Investigation of the effects of curcumin on serum cytokines in obese individuals: a randomized controlled trial. *ScientificWorldJournal* 2014, 898361.

Gao, Y., Ottaway, N., Schriever, S.C., Legutko, B., Garcia-Caceres, C., de la Fuente, E., Mergen, C., Bour, S., Thaler, J.P., Seeley, R.J., *et al.* (2014). Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* 62, 17-25.

Gareau, M.G. (2016). Cognitive Function and the Microbiome. *International review of neurobiology* 131, 227-246.

Garipey, G., Nitka, D., and Schmitz, N. (2010). The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)* 34, 407-419.

Gautron, L., and Laye, S. (2009). Neurobiology of inflammation-associated anorexia. *Front Neurosci* 3, 59.

Ghasemi, R., Dargahi, L., Haeri, A., Moosavi, M., Mohamed, Z., and Ahmadiani, A. (2013a). Brain insulin dysregulation: implication for neurological and neuropsychiatric disorders. *Mol Neurobiol* 47, 1045-1065.

Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., and Ahmadiani, A. (2013b). Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol* 47, 145-171.

Gillies, C.L., Abrams, K.R., Lambert, P.C., Cooper, N.J., Sutton, A.J., Hsu, R.T., and Khunti, K. (2007). Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 334, 299.

Giusti, V., and Panchaud, M. (2007). [Psychological profile of obese patients]. *Rev Med Suisse* 3, 846-849.

Goldbart, A.D., Row, B.W., Kheirandish-Gozal, L., Cheng, Y., Brittan, K.R., and Gozal, D. (2006). High fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia. *Brain Res* 1090, 190-196.

Goldstein, D.J. (1992). Beneficial health effects of modest weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 397-415.

- Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Roullet, P., and Rampon, C. (2010). Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171, 769-778.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ben-Menachem-Zidon, O., Licht, T., Weidenfeld, J., Ben-Hur, T., and Yirmiya, R. (2008). Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 13, 717-728.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalzstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., and Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32, 1106-1115.
- Gray, B., Swick, J., and Ronnenberg, A.G. (2011). Vitamin E and adiponectin: proposed mechanism for vitamin E-induced improvement in insulin sensitivity. *Nutr Rev* 69, 155-161.
- Greenman, Y., Kuperman, Y., Drori, Y., Asa, S.L., Navon, I., Forkosh, O., Gil, S., Stern, N., and Chen, A. (2013). Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol* 27, 1091-1102.
- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Evans, A.N., Macht, V.A., Wilson, S.P., Scott, K.A., Sakai, R.R., Mott, D.D., and Reagan, L.P. (2011). Obesity/hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. *Physiol Behav* 104, 235-241.
- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Lawrence, R.C., Wrihten, S.A., Green, A.J., Wilson, S.P., Sakai, R.R., Kelly, S.J., Wilson, M.A., Mott, D.D., *et al.* (2015). Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes* 64, 3927-3936.
- Grosso, G., Micek, A., Marventano, S., Castellano, S., Mistretta, A., Pajak, A., and Galvano, F. (2016). Dietary n-3 PUFA, fish consumption and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Affect Disord* 205, 269-281.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109.
- Gulaj, E., Pawlak, K., Bien, B., and Pawlak, D. (2010). Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Advances in medical sciences* 55, 204-211.
- Gunstad, J., Strain, G., Devlin, M.J., Wing, R., Cohen, R.A., Paul, R.H., Crosby, R.D., and Mitchell, J.E. (2011). Improved memory function 12 weeks after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis* 7, 465-472.
- Guo, M., and Lu, X.Y. (2014). Leptin receptor deficiency confers resistance to behavioral effects of fluoxetine and desipramine via separable substrates. *Transl Psychiatry* 4, e486.
- Gupta, D., Radhakrishnan, M., and Kurhe, Y. (2014). Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metab Brain Dis* 29, 737-746.

## H

- Haji, N., Mandolesi, G., Gentile, A., Sacchetti, L., Fresegna, D., Rossi, S., Musella, A., Sepman, H., Motta, C., Studer, V., *et al.* (2012). TNF-alpha-mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 237, 296-303.
- Hall, M.E., Maready, M.W., Hall, J.E., and Stec, D.E. (2014). Rescue of cardiac leptin receptors in db/db mice prevents myocardial triglyceride accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307, E316-325.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8.

- Hansen, D., Dendale, P., Beelen, M., Jonkers, R.A., Mullens, A., Corluy, L., Meeusen, R., and van Loon, L.J. (2010). Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol* 109, 397-404.
- Heilbronn, L.K., and Campbell, L.V. (2008). Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 14, 1225-1230.
- Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11, 523-532.
- Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Dixon, R.M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J.A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., *et al.* (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568-1575.
- Heyser, C.J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I.L., and Gold, L.H. (1997). Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1500-1505.
- Heyward, F.D., Walton, R.G., Carle, M.S., Coleman, M.A., Garvey, W.T., and Sweatt, J.D. (2012). Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 98, 25-32.
- Higami, Y., Barger, J.L., Page, G.P., Allison, D.B., Smith, S.R., Prolla, T.A., and Weindruch, R. (2006). Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J Nutr* 136, 343-352.
- Hillenbrand, A., Weiss, M., Knippschild, U., Wolf, A.M., and Huber-Lang, M. (2012). Sepsis-Induced Adipokine Change with regard to Insulin Resistance. *Int J Inflam* 2012, 972368.
- Hodes, G.E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., and Russo, S.J. (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci* 18, 1386-1393.
- Hoge, E.A., Brandstetter, K., Moshier, S., Pollack, M.H., Wong, K.K., and Simon, N.M. (2009). Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 26, 447-455.
- Holman, R.T. (1998). The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr* 128, 427S-433S.
- Holsboer, F., and Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17, 187-205.
- Holscher, C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 100, 225-235.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Huang, H.J., Chen, Y.H., Liang, K.C., Jheng, Y.S., Jhao, J.J., Su, M.T., Lee-Chen, G.J., and Hsieh-Li, H.M. (2012). Exendin-4 protected against cognitive dysfunction in hyperglycemic mice receiving an intrahippocampal lipopolysaccharide injection. *PLoS One* 7, e39656.
- Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16, 448-457.

**I**

- Irwin, M.R., and Cole, S.W. (2011). Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nat Rev Immunol* 11, 625-632.

Issa, A.M., Rowe, W., Gauthier, S., and Meaney, M.J. (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* *10*, 3247-3254.

## **J**

Jaacks, L.M., Siegel, K.R., Gujral, U.P., and Narayan, K.M. (2016). Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* *30*, 331-343.

Jackson, P.A., Deary, M.E., Reay, J.L., Scholey, A.B., and Kennedy, D.O. (2012). No effect of 12 weeks' supplementation with 1 g DHA-rich or EPA-rich fish oil on cognitive function or mood in healthy young adults aged 18-35 years. *Br J Nutr* *107*, 1232-1243.

Jaffard, R., and Jeantet, Y. (1981). Posttraining changes in excitability of the commissural path-CA1 pyramidal cell synapse in the hippocampus of mice. *Brain Res* *220*, 167-172.

Jaffard, R., Vouimba, R.M., Marighetto, A., and Garcia, R. (1996). Long-term potentiation and long-term depression in the lateral septum in spatial working and reference memory. *J Physiol Paris* *90*, 339-341.

Jamalan, M., Rezazadeh, M., Zeinali, M., and Ghaffari, M.A. (2015). Effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol supplementations on serum leptin, tumor necrosis factor alpha, and serum amyloid A levels in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Avicenna J Phytomed* *5*, 531-539.

James, M.J., Gibson, R.A., and Cleland, L.G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* *71*, 343S-348S.

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *54 Pt 1*, 1-13.

Janeway, C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* *13*, 11-16.

Jastroch, M., Morin, S., Tschop, M.H., and Yi, C.X. (2014). The hypothalamic neural-glia network and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* *28*, 661-671.

Jaworowska, A., Blackham, T., Davies, I.G., and Stevenson, L. (2013). Nutritional challenges and health implications of takeaway and fast food. *Nutr Rev* *71*, 310-318.

Jayatissa, M.N., Bisgaard, C., Tingstrom, A., Papp, M., and Wiborg, O. (2006). Hippocampal cytotogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* *31*, 2395-2404.

Jeon, B.T., Heo, R.W., Jeong, E.A., Yi, C.O., Lee, J.Y., Kim, K.E., Kim, H., and Roh, G.S. (2016). Effects of caloric restriction on O-GlcNAcylation, Ca<sup>2+</sup> signaling, and learning impairment in the hippocampus of ob/ob mice. *Neurobiol Aging* *44*, 127-137.

Jeon, B.T., Jeong, E.A., Shin, H.J., Lee, Y., Lee, D.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., and Roh, G.S. (2012). Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* *61*, 1444-1454.

Jia, N., Han, K., Kong, J.J., Zhang, X.M., Sha, S., Ren, G.R., and Cao, Y.P. (2013). (-)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates spatial memory impairment in APP/PS1 mice by restoring IRS-1 signaling defects in the hippocampus. *Mol Cell Biochem* *380*, 211-218.

Jin, L., Burguera, B.G., Couce, M.E., Scheithauer, B.W., Lamsan, J., Eberhardt, N.L., Kulig, E., and Lloyd, R.V. (1999). Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* *84*, 2903-2911.

Jodar, L., and Kaneto, H. (1995). Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn J Pharmacol* *68*, 359-387.

Joffre, C., Nadjar, A., Lebbadi, M., Calon, F., and Laye, S. (2014). n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 91, 1-20.

## K

Kallen, V.L., Tulen, J.H., Utens, E.M., Treffers, P.D., De Jong, F.H., and Ferdinand, R.F. (2008). Associations between HPA axis functioning and level of anxiety in children and adolescents with an anxiety disorder. *Depress Anxiety* 25, 131-141.

Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Bohn, S.K., Sandvik, L., and Blomhoff, R. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* 137, 1951-1954.

Karr, J.E., Alexander, J.E., and Winningham, R.G. (2011). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: a review. *Nutr Neurosci* 14, 216-225.

Karr, J.E., Grindstaff, T.R., and Alexander, J.E. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition in a college-aged population. *Exp Clin Psychopharmacol* 20, 236-242.

Kasbi-Chadli, F., Boquien, C.Y., Simard, G., Ulmann, L., Mimouni, V., Leray, V., Meynier, A., Ferchaud-Roucher, V., Champ, M., Nguyen, P., *et al.* (2014). Maternal supplementation with n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during perinatal period alleviates the metabolic syndrome disturbances in adult hamster pups fed a high-fat diet after weaning. *J Nutr Biochem* 25, 726-733.

Kekow, J., Moots, R., Khandker, R., Melin, J., Freundlich, B., and Singh, A. (2011). Improvements in patient-reported outcomes, symptoms of depression and anxiety, and their association with clinical remission among patients with moderate-to-severe active early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 50, 401-409.

Keller-Wood, M.E., and Dallman, M.F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.

Kempermann, G., Brandon, E.P., and Gage, F.H. (1998). Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current biology : CB* 8, 939-942.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.

Kennedy, D.O., Jackson, P.A., Elliott, J.M., Scholey, A.B., Robertson, B.C., Greer, J., Tiplady, B., Buchanan, T., and Haskell, C.F. (2009). Cognitive and mood effects of 8 weeks' supplementation with 400 mg or 1000 mg of the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) in healthy children aged 10-12 years. *Nutr Neurosci* 12, 48-56.

Kesse-Guyot, E., Fezeu, L., Andreeva, V.A., Touvier, M., Scalbert, A., Hercberg, S., and Galan, P. (2012). Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with cognitive function measured 13 years later. *J Nutr* 142, 76-83.

Kiecolt-Glaser, J.K., Belury, M.A., Andridge, R., Malarkey, W.B., and Glaser, R. (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 25, 1725-1734.

Kim, B., Sullivan, K.A., Backus, C., and Feldman, E.L. (2011). Cortical neurons develop insulin resistance and blunted Akt signaling: a potential mechanism contributing to enhanced ischemic injury in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 14, 1829-1839.

Kim, D.Y., Kim, J., Ham, H.J., and Choue, R. (2013). Effects of d-alpha-tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model. *Nutr Res Pract* 7, 481-487.

- Kim, H., Kang, H., Heo, R.W., Jeon, B.T., Yi, C.O., Shin, H.J., Kim, J., Jeong, S.Y., Kwak, W., Kim, W.H., *et al.* (2016). Caloric restriction improves diabetes-induced cognitive deficits by attenuating neurogranin-associated calcium signaling in high-fat diet-fed mice. *J Cereb Blood Flow Metab* *36*, 1098-1110.
- Kim, Y.J., Kim, H.J., No, J.K., Chung, H.Y., and Fernandes, G. (2006). Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sci* *78*, 2523-2532.
- Kinzl, J.F., Schrattenecker, M., Traweger, C., Mattesich, M., Fiala, M., and Biebl, W. (2006). Psychosocial predictors of weight loss after bariatric surgery. *Obes Surg* *16*, 1609-1614.
- Kivimaki, M., Lawlor, D.A., Singh-Manoux, A., Batty, G.D., Ferrie, J.E., Shipley, M.J., Nabi, H., Sabia, S., Marmot, M.G., and Jokela, M. (2009). Common mental disorder and obesity: insight from four repeat measures over 19 years: prospective Whitehall II cohort study. *Bmj* *339*, b3765.
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., and Moser, M.B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10825-10830.
- Kjorholt, C., Akerfeldt, M.C., Biden, T.J., and Laybutt, D.R. (2005). Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* *54*, 2755-2763.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., *et al.* (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4318-4323.
- Kobayashi, N., Machida, T., Takahashi, T., Takatsu, H., Shinkai, T., Abe, K., and Urano, S. (2009). Elevation by oxidative stress and aging of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats and its prevention by vitamin e. *J Clin Biochem Nutr* *45*, 207-213.
- Kollen, M., Stephan, A., Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Sinet, P.M., Alliot, J., Billard, J.M., Epelbaum, J., Dutar, P., and Jouvenceau, A. (2010). Preserved memory capacities in aged Lou/C/Jall rats. *Neurobiol Aging* *31*, 129-142.
- Kondakci, E., Ozyurek, M., Guclu, K., and Apak, R. (2013). Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. *Talanta* *115*, 583-589.
- Kootte, R.S., Vrieze, A., Holleman, F., Dallinga-Thie, G.M., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Groen, A.K., Hoekstra, J.B., Stoes, E.S., and Nieuwdorp, M. (2012). The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* *14*, 112-120.
- Krishna, S., Keralapurath, M.M., Lin, Z., Wagner, J.J., de La Serre, C.B., Harn, D.A., and Filipov, N.M. (2015). Neurochemical and electrophysiological deficits in the ventral hippocampus and selective behavioral alterations caused by high-fat diet in female C57BL/6 mice. *Neuroscience* *297*, 170-181.
- Kumari, R., Willing, L.B., Krady, J.K., Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (2007). Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* *27*, 710-718.
- Kurhe, Y., and Mahesh, R. (2015). Ondansetron attenuates co-morbid depression and anxiety associated with obesity by inhibiting the biochemical alterations and improving serotonergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* *136*, 107-116.

**L**

- Labrousse, V.F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudery, M., Ferreira, G., Amedee, T., and Laye, S. (2009). Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice. *PLoS One* 4, e6006.
- Labrousse, V.F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S., Bretillon, L., and Laye, S. (2012). Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7, e36861.
- Lacosta, S., Merali, Z., and Anisman, H. (1999a). Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res* 818, 291-303.
- Lacosta, S., Merali, Z., and Anisman, H. (1999b). Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. *Behav Neurosci* 113, 1030-1041.
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V.F., Bretillon, L., Matute, C., *et al.* (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14, 345-350.
- Lakhan, S.E., and Kirchgessner, A. (2013). The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J* 12, 114.
- Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., Glasow, A., and Kratzsch, J. (2001). Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 982-988.
- Lann, D., and LeRoith, D. (2007). Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am* 91, 1063-1077, viii.
- Larrieu, T., Hilal, M.L., Fourrier, C., De Smedt-Peyrusse, V., Sans, N., Capuron, L., and Laye, S. (2014). Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl Psychiatry* 4, e437.
- Lasselín, J., and Capuron, L. (2014). Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation* 21, 95-101.
- Lasselín, J., Laye, S., Barreau, J.B., Rivet, A., Dulucq, M.J., Gin, H., and Capuron, L. (2012). Fatigue and cognitive symptoms in patients with diabetes: relationship with disease phenotype and insulin treatment. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1468-1478.
- Lasselín, J., Magne, E., Beau, C., Ledaguenel, P., Dexpert, S., Aubert, A., Laye, S., and Capuron, L. (2014). Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E53-61.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., and Michaelsen, K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1-94.
- Laye, S., Gheusi, G., Cremona, S., Combe, C., Kelley, K., Dantzer, R., and Parnet, P. (2000). Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R93-98.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S., *et al.* (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541-546.
- Ledochowski, M., Murr, C., Widner, B., and Fuchs, D. (1999). Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 282, 115-123.

- Lee, K.S., Chung, J.H., Choi, T.K., Suh, S.Y., Oh, B.H., and Hong, C.H. (2009). Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28, 281-287.
- Lee, S.Y., Hwang, Y.K., Yun, H.S., and Han, J.S. (2012). Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. *Brain Res* 1478, 48-54.
- Levant, B., Ozias, M.K., Davis, P.F., Winter, M., Russell, K.L., Carlson, S.E., Reed, G.A., and McCarson, K.E. (2008). Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: Interactions with reproductive status in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1279-1292.
- Ley, R.E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Current opinion in gastroenterology* 26, 5-11.
- Li, J.J., and Chen, X.J. (2003). Simvastatin inhibits interleukin-6 release in human monocytes stimulated by C-reactive protein and lipopolysaccharide. *Coron Artery Dis* 14, 329-334.
- Li, S., Zhao, J.H., Luan, J., Luben, R.N., Rodwell, S.A., Khaw, K.T., Ong, K.K., Wareham, N.J., and Loos, R.J. (2010). Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 91, 184-190.
- Li, X.L., Aou, S., Oomura, Y., Hori, N., Fukunaga, K., and Hori, T. (2002). Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113, 607-615.
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., and Levison, S.W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89, 1092-1100.
- Lin, P.Y., Huang, S.Y., and Su, K.P. (2010). A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry* 68, 140-147.
- Liu, S.B., Zhang, M.M., Cheng, L.F., Shi, J., Lu, J.S., and Zhuo, M. (2015). Long-term upregulation of cortical glutamatergic AMPA receptors in a mouse model of chronic visceral pain. *Mol Brain* 8, 76.
- Liu, Y., Fu, X., Lan, N., Li, S., Zhang, J., Wang, S., Li, C., Shang, Y., and Huang, T. (2014). Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav Brain Res*.
- Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Fuster-Matanzo, A., Hernandez, F., Rabano, A., and Avila, J. (2014). Peripherally triggered and GSK-3beta-driven brain inflammation differentially skew adult hippocampal neurogenesis, behavioral pattern separation and microglial activation in response to ibuprofen. *Transl Psychiatry* 4, e463.
- Lu, J., Wu, D.M., Zheng, Y.L., Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z.F., and Shan, Q. (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I $\kappa$ B kinase beta/nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun* 25, 1658-1667.
- Luppino, F.S., de Wit, L.M., Bouvy, P.F., Stijnen, T., Cuijpers, P., Penninx, B.W., and Zitman, F.G. (2010). Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry* 67, 220-229.
- Luscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

## M

- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., and Cummings, J.H. (2006). Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 701-714.
- Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J.C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., Joffre, C., and Laye, S. (2014). Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav Immun* 41, 22-31.



- Makhija, K., and Karunakaran, S. (2013). The role of inflammatory cytokines on the aetiopathogenesis of depression. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry* *47*, 828-839.
- Makino, Y., Johnson, R.C., Yu, Y., Takamiya, K., and Haganir, R.L. (2011). Enhanced synaptic plasticity in mice with phosphomimetic mutation of the GluA1 AMPA receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 8450-8455.
- Malendowicz, L.K., Rucinski, M., Belloni, A.S., Ziolkowska, A., and Nussdorfer, G.G. (2007). Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol* *263*, 63-102.
- Mallappa, R.H., Rokana, N., Duary, R.K., Panwar, H., Batish, V.K., and Grover, S. (2012). Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian J Endocrinol Metab* *16*, 20-27.
- Manns, M., Leske, O., Gottfried, S., Bichler, Z., Lafenetre, P., Wahle, P., and Heumann, R. (2011). Role of neuronal ras activity in adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Front Neurosci* *5*, 18.
- Manosso, L.M., Neis, V.B., Moretti, M., Daufenbach, J.F., Freitas, A.E., Colla, A.R., and Rodrigues, A.L. (2013). Antidepressant-like effect of alpha-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF-alpha. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* *46*, 48-57.
- Marais, L., van Rensburg, S.J., van Zyl, J.M., Stein, D.J., and Daniels, W.M. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* *61*, 106-112.
- Maric, T., Woodside, B., and Luheshi, G.N. (2014). The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain Behav Immun* *36*, 35-45.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., and Watkins, J.B., 3rd (2003). Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem* *14*, 288-294.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R.S., and Michalek, S.M. (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* *6*, 777-784.
- Matsuda, H., Nakamura, S., and Yoshikawa, M. (2014). Search for new type of PPARgamma agonist-like anti-diabetic compounds from medicinal plants. *Biol Pharm Bull* *37*, 884-891.
- Mazzeschi, C., Pazzagli, C., Buratta, L., Reboldi, G.P., Battistini, D., Piana, N., Pippi, R., Fatone, C., and De Feo, P. (2012). Mutual interactions between depression/quality of life and adherence to a multidisciplinary lifestyle intervention in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* *97*, E2261-2265.
- McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C., *et al.* (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* *49*, 868-913.
- McCarthy, D.O., Kluger, M.J., and Vander, A.J. (1985). Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? *Am J Clin Nutr* *42*, 1179-1182.
- McDonald, R.J., Devan, B.D., and Hong, N.S. (2004). Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiol Learn Mem* *82*, 333-346.
- McDonald, S.R., Sohal, R.S., and Forster, M.J. (2005). Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med* *38*, 729-736.
- McEwen, B.S. (2005). Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism* *54*, 20-23.
- McEwen, B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* *87*, 873-904.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol Behav* *51*, 753-766.

- McNamara, R.K., Able, J., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Eliassen, J.C., Alfieri, D., Weber, W., Jarvis, K., DelBello, M.P., *et al.* (2010). Docosahexaenoic acid supplementation increases prefrontal cortex activation during sustained attention in healthy boys: a placebo-controlled, dose-ranging, functional magnetic resonance imaging study. *Am J Clin Nutr* 91, 1060-1067.
- McNamara, R.K., Hahn, C.G., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Stanford, K.E., and Richtand, N.M. (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.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 41, 36-48.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Merali, Z., Brennan, K., Brau, P., and Anisman, H. (2003). Dissociating anorexia and anhedonia elicited by interleukin-1beta: antidepressant and gender effects on responding for "free chow" and "earned" sucrose intake. *Psychopharmacology (Berl)* 165, 413-418.
- Miller, A.A., and Spencer, S.J. (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*.
- Mizoguchi, K., Ikeda, R., Shoji, H., Tanaka, Y., Maruyama, W., and Tabira, T. (2009). Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159, 259-270.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22, 240-273, Table of Contents.
- Mold, C., Gewurz, H., and Du Clos, T.W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* 42, 23-30.
- Moloney, R.D., Desbonnet, L., Clarke, G., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). The microbiome: stress, health and disease. *Mamm Genome* 25, 49-74.
- Molteni, R., Barnard, R.J., Ying, Z., Roberts, C.K., and Gomez-Pinilla, F. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112, 803-814.
- Molteni, R., Wu, A., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R.J., and Gomez-Pinilla, F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 123, 429-440.
- Monshouwer, M., and Witkamp, R.F. (2000). Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response: a mini-review. *Vet Q* 22, 17-20.
- Mooney, R.A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L.M., Shang, Y., and Furlanetto, R.W. (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276, 25889-25893.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Moranis, A., Delpech, J.C., De Smedt-Peyrusse, V., Aubert, A., Guesnet, P., Lavielle, M., Joffre, C., and Laye, S. (2012). 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* 26, 721-731.
- Moreau, M., Andre, C., O'Connor, J.C., Dumich, S.A., Woods, J.A., Kelley, K.W., Dantzer, R., Lestage, J., and Castanon, N. (2008). Inoculation of *Bacillus Calmette-Guerin* to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain Behav Immun* 22, 1087-1095.

- Mormede, P., Courvoisier, H., Ramos, A., Marissal-Arvy, N., Ousova, O., Desautels, C., Duclos, M., Chaouloff, F., and Moisan, M.P. (2002). Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27, 563-583.
- Morris, R.G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23, 2829-2846.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295.
- Mueller, K., Sacher, J., Arelin, K., Holiga, S., Kratzsch, J., Villringer, A., and Schroeter, M.L. (2012a). Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Transl Psychiatry* 2, e200.
- Mueller, S.G., Laxer, K.D., Scanlon, C., Garcia, P., McMullen, W.J., Loring, D.W., Meador, K.J., and Weiner, M.W. (2012b). Different structural correlates for verbal memory impairment in temporal lobe epilepsy with and without mesial temporal lobe sclerosis. *Hum Brain Mapp* 33, 489-499.
- Murabito, J.M., Massaro, J.M., Clifford, B., Hoffmann, U., and Fox, C.S. (2013). Depressive symptoms are associated with visceral adiposity in a community-based sample of middle-aged women and men. *Obesity (Silver Spring)* 21, 1713-1719.
- Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., and Fuchs, D. (2002). Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab* 3, 175-187.

**N**

- Naeser, P. (1973). Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol ob). *Diabetologia* 9, 376-379.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., *et al.* (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188-201.
- Narayan, K.M., Boyle, J.P., Thompson, T.J., Gregg, E.W., and Williamson, D.F. (2007). Effect of BMI on lifetime risk for diabetes in the U.S. *Diabetes Care* 30, 1562-1566.
- Nelson, T.E., Olde Engberink, A., Hernandez, R., Puro, A., Huitron-Resendiz, S., Hao, C., De Graan, P.N., and Gruol, D.L. (2012). Altered synaptic transmission in the hippocampus of transgenic mice with enhanced central nervous systems expression of interleukin-6. *Brain Behav Immun* 26, 959-971.
- Nemeroff, C.B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry* 1, 336-342.
- Neufeld, K.A., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J.A. (2011). Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol* 4, 492-494.
- Nichols, G.A., Schroeder, E.B., Karter, A.J., Gregg, E.W., Desai, J., Lawrence, J.M., O'Connor, P.J., Xu, S., Newton, K.M., Raebel, M.A., *et al.* (2015). Trends in diabetes incidence among 7 million insured adults, 2006-2011: the SUPREME-DM project. *Am J Epidemiol* 181, 32-39.
- Nicolas, S., Veyssiere, J., Gandin, C., Zsurger, N., Pietri, M., Heurteaux, C., Glaichenhaus, N., Petit-Paitel, A., and Chabry, J. (2015). Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. *Psychoneuroendocrinology* 57, 72-83.
- Nigatu, Y.T., Reijneveld, S.A., de Jonge, P., van Rossum, E., and Bultmann, U. (2016). The Combined Effects of Obesity, Abdominal Obesity and Major Depression/Anxiety on Health-Related Quality of Life: the LifeLines Cohort Study. *PLoS One* 11, e0148871.

Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., and Eriksson, P.S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39, 569-578.

Norden, D.M., Devine, R., Bicer, S., Jing, R., Reiser, P.J., Wold, L.E., Godbout, J.P., and McCarthy, D.O. (2015). Fluoxetine prevents the development of depressive-like behavior in a mouse model of cancer related fatigue. *Physiol Behav* 140, 230-235.

## O

O'Connor, J.C., Andre, C., Wang, Y., Lawson, M.A., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009a). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci* 29, 4200-4209.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Briley, E.M., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Herkenham, M., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (2009b). Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *J Immunol* 182, 3202-3212.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009c). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14, 511-522.

Oppert, J.M., and Charreire, H. (2012). The importance of the food and physical activity environments. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 73, 113-121.

Oxenkrug, G., Tucker, K.L., Requentina, P., and Summergrad, P. (2011). Neopterin, a Marker of Interferon-Gamma-Inducible Inflammation, Correlates with Pyridoxal-5'-Phosphate, Waist Circumference, HDL-Cholesterol, Insulin Resistance and Mortality Risk in Adult Boston Community Dwellers of Puerto Rican Origin. *American journal of neuroprotection and neuroregeneration* 3, 48-52.

## P

Panickar, K.S., and Jang, S. (2013). Dietary and plant polyphenols exert neuroprotective effects and improve cognitive function in cerebral ischemia. *Recent Pat Food Nutr Agric* 5, 128-143.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.

Pariante, C.M. (2006). The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol* 20, 79-84.

Pariante, C.M., and Lightman, S.L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31, 464-468.

Pariante, C.M., and Miller, A.H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49, 391-404.

Park, H.S., Park, J.Y., and Yu, R. (2005). Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 69, 29-35.

Park, M., Kim, C.H., Jo, S., Kim, E.J., Rhim, H., Lee, C.J., Kim, J.J., and Cho, J. (2015). Chronic Stress Alters Spatial Representation and Bursting Patterns of Place Cells in Behaving Mice. *Sci Rep* 5, 16235.

Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M., and Pagotto, U. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083, 111-128.

- Pathan, A.R., Gaikwad, A.B., Viswanad, B., and Ramarao, P. (2008). Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur J Pharmacol* 589, 176-179.
- Patterson, E., Ryan, P.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J* 92, 286-300.
- Paun, A., and Danska, J.S. (2016). Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Pediatr Diabetes*.
- Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8, 457-465.
- Pepys, M.B., and Baltz, M.L. (1983). Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 34, 141-212.
- Pesce, M., Speranza, L., Franceschelli, S., Ialenti, V., Patrino, A., Febo, M.A., De Lutiis, M.A., Felaco, M., and Grilli, A. (2011). Biological role of interleukin-1beta in defensive-aggressive behaviour. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 25, 323-329.
- Petra, A.I., Panagiotidou, S., Hatzigelaki, E., Stewart, J.M., Conti, P., and Theoharides, T.C. (2015). Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther* 37, 984-995.
- Pickup, J.C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 813-823.
- Pistell, P.J., Morrison, C.D., Gupta, S., Knight, A.G., Keller, J.N., Ingram, D.K., and Bruce-Keller, A.J. (2010). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 219, 25-32.
- Pohl, J., Woodside, B., and Luheshi, G.N. (2009). Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory responses to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 150, 4901-4910.
- Pomara, N., Greenberg, W.M., Branford, M.D., and Doraiswamy, P.M. (2003). Therapeutic implications of HPA axis abnormalities in Alzheimer's disease: review and update. *Psychopharmacol Bull* 37, 120-134.
- Pomytkin, I.A., Cline, B.H., Anthony, D.C., Steinbusch, H.W., Lesch, K.P., and Strekalova, T. (2015). Endotoxaemia resulting from decreased serotonin transporter (5-HTT) function: a reciprocal risk factor for depression and insulin resistance? *Behav Brain Res* 276, 111-117.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., and Dittel, B.N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81, 374-389.
- Porte, D., Jr., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264-1276.
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A.A., Gendron, A., Bah, R., and Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* 63, 801-808.
- Powell, T.R., Fernandes, C., and Schalkwyk, L.C. (2012). Depression-Related Behavioral Tests. *Curr Protoc Mouse Biol* 2, 119-127.
- Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*.

**R**

- Radler, M.E., Wright, B.J., Walker, F.R., Hale, M.W., and Kent, S. (2015). Calorie restriction increases lipopolysaccharide-induced neuropeptide Y immunolabeling and reduces microglial cell area in the arcuate hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 285, 236-247.
- Rafnsson, S.B., Deary, I.J., Smith, F.B., Whiteman, M.C., Rumley, A., Lowe, G.D., and Fowkes, F.G. (2007). Cognitive decline and markers of inflammation and hemostasis: the Edinburgh Artery Study. *J Am Geriatr Soc* 55, 700-707.
- Raison, C.L., Demetrashvili, M., Capuron, L., and Miller, A.H. (2005). Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs* 19, 105-123.
- Rajmohan, V., and Mohandas, E. (2007). The limbic system. *Indian journal of psychiatry* 49, 132-139.
- Ransohoff, R.M., and El Khoury, J. (2015). Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
- Rao, S.R. (2012). Inflammatory markers and bariatric surgery: a meta-analysis. *Inflamm Res* 61, 789-807.
- Raper, N.R., Cronin, F.J., and Exler, J. (1992). Omega-3 fatty acid content of the US food supply. *J Am Coll Nutr* 11, 304-308.
- Rask, E., Olsson, T., Soderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D.E., Johnson, O., and Walker, B.R. (2001). Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1418-1421.
- Redman, L.M., and Ravussin, E. (2011). Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal* 14, 275-287.
- Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88, 640-651.
- Rendeiro, C., Rhodes, J.S., and Spencer, J.P. (2015). The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem Int*.
- Reus, G.Z., Jansen, K., Titus, S., Carvalho, A.F., Gabbay, V., and Quevedo, J. (2015). Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res* 68, 316-328.
- Rey, C., Nadjar, A., Buaud, B., Vaysse, C., Aubert, A., Pallet, V., Laye, S., and Joffre, C. (2016). Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain Behav Immun* 55, 249-259.
- Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353, 1711-1723.
- Richard, E.M., Helbling, J.C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.P., Mormede, P., and Moisan, M.P. (2010). Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151, 649-659.
- Rosi, S., Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Worley, P.F., Barnes, C.A., and Wenk, G.L. (2006). Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142, 1303-1315.
- Rosmond, R. (2003). Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes? *Med Sci Monit* 9, Ra35-39.

Rothe, J., Mackay, F., Bluethmann, H., Zinkernagel, R., and Lesslauer, W. (1994). Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts in vitro. *Circ Shock* 44, 51-56.

Rubio-Perez, J.M., and Morillas-Ruiz, J.M. (2013). Serum cytokine profile in Alzheimer's disease patients after ingestion of an antioxidant beverage. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 1233-1241.

Rummel, C., Inoue, W., Poole, S., and Luheshi, G.N. (2010). Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry* 15, 523-534.

## S

Sahay, A., and Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10, 1110-1115.

Salazar, A., Gonzalez-Rivera, B.L., Redus, L., Parrott, J.M., and O'Connor, J.C. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. *Horm Behav* 62, 202-209.

Salim, S., Chugh, G., and Asghar, M. (2012). Inflammation in anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88, 1-25.

Salmon, A.B. (2016). Beyond Diabetes: Does Obesity-Induced Oxidative Stress Drive the Aging Process? *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 5.

Sandoval, D., Cota, D., and Seeley, R.J. (2008). The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annual review of physiology* 70, 513-535.

Sapolsky, R.M. (1982). The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. *Horm Behav* 16, 279-292.

Sapolsky, R.M. (1986). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid. *Neuroendocrinology* 43, 440-444.

Sapolsky, R.M. (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57, 925-935.

Sartori, S.B., Landgraf, R., and Singewald, N. (2011). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurol* 6, 531-571.

Sasaki-Hamada, S., Hojo, Y., Koyama, H., Otsuka, H., and Oka, J. (2015). Changes in hippocampal synaptic functions and protein expression in monosodium glutamate-treated obese mice during development of glucose intolerance. *Eur J Neurosci* 41, 1393-1401.

Sasaki, A., de Vega, W.C., St-Cyr, S., Pan, P., and McGowan, P.O. (2013). Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience* 240, 1-12.

Sastry, P.S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24, 69-176.

Savignac, H.M., Tramullas, M., Kiely, B., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behav Brain Res* 287, 59-72.

Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., and Nagatsu, T. (1999). Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem* 72, 1466-1471.

Schedlowski, M., Engler, H., and Grigoleit, J.S. (2014). Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun* 35, 1-8.

Schele, E., Benrick, A., Grahnemo, L., Egecioglu, E., Anesten, F., Palsdottir, V., and Jansson, J.O. (2013). Inter-relation between interleukin (IL)-1, IL-6 and body fat regulating circuits of the hypothalamic arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 25, 580-589.

- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* *1813*, 878-888.
- Schindler, C., Levy, D.E., and Decker, T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* *282*, 20059-20063.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2007). (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* *101*, 1596-1606.
- Schulingkamp, R.J., Pagano, T.C., Hung, D., and Raffa, R.B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* *24*, 855-872.
- Schultz, D.R., and Arnold, P.I. (1990). Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* *20*, 129-147.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* *46*, 2119-2123.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* *404*, 661-671.
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* *510*, 92-101.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* *8*, 349-361.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., and Moussignac, R.L. (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* *196*, 1025-1037.
- Shang, X., Shang, Y., Fu, J., and Zhang, T. (2016). Nicotine Significantly Improves Chronic Stress-Induced Impairments of Cognition and Synaptic Plasticity in Mice. *Mol Neurobiol*.
- Sharma, A.N., Elased, K.M., Garrett, T.L., and Lucot, J.B. (2010). Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav* *101*, 381-388.
- Sharma, S., and Fulton, S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* *37*, 382-389.
- Sheline, Y.I., Gado, M.H., and Kraemer, H.C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* *160*, 1516-1518.
- Shi, H., and Clegg, D.J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* *97*, 199-204.
- Siervo, M., Wells, J.C., and Cizza, G. (2009). The contribution of psychosocial stress to the obesity epidemic: an evolutionary approach. *Horm Metab Res* *41*, 261-270.
- Silverman, M.N., and Sternberg, E.M. (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* *1261*, 55-63.
- Simopoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. *Environ Health Prev Med* *6*, 203-209.
- Sivanathan, S., Thavartnam, K., Arif, S., Elegino, T., and McGowan, P.O. (2015). Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. *Behav Brain Res* *286*, 265-270.



- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., *et al.* (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16731-16736.
- Soleimani, M., Jameie, S.B., Barati, M., Mehdizadeh, M., and Kerdari, M. (2014). Effects of coenzyme Q10 on the ratio of TH1/TH2 in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6. *Iran Biomed J* *18*, 203-211.
- Solmi, M., Veronese, N., Favaro, A., Santonastaso, P., Manzato, E., Sergi, G., and Correll, C.U. (2015). Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology* *51*, 237-252.
- Sonar, S., and Lal, G. (2015). Role of Tumor Necrosis Factor Superfamily in Neuroinflammation and Autoimmunity. *Front Immunol* *6*, 364.
- Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D., and Sapolsky, R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* *64*, 33-39.
- Souza, C.G., Moreira, J.D., Siqueira, I.R., Pereira, A.G., Rieger, D.K., Souza, D.O., Souza, T.M., Portela, L.V., and Perry, M.L. (2007). Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci* *81*, 198-203.
- Spagnuolo, C., Napolitano, M., Tedesco, I., Moccia, S., Milito, A., and Russo, G.L. (2016). Neuroprotective role of natural polyphenols. *Curr Top Med Chem*.
- Speaker, K.J., and Fleshner, M. (2012). Interleukin-1 beta: a potential link between stress and the development of visceral obesity. *BMC Physiol* *12*, 8.
- Spector, A.A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids* *34 Suppl*, S1-3.
- Spolcova, A., Mikulaskova, B., Krskova, K., Gajdosechova, L., Zorad, S., Olszanecki, R., Suski, M., Bujak-Gizycka, B., Zelezna, B., and Maletinska, L. (2014). Deficient hippocampal insulin signaling and augmented Tau phosphorylation is related to obesity- and age-induced peripheral insulin resistance: a study in Zucker rats. *BMC Neurosci* *15*, 111.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* *82*, 171-177.
- Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., and Bloom, S. (2005). Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* *85*, 1131-1158.
- Stefan, N., and Stumvoll, M. (2002). Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* *34*, 469-474.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* *409*, 307-312.
- Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Antiviral defense: interferons and beyond. *J Exp Med* *203*, 1837-1841.
- Stonehouse, W., Conlon, C.A., Podd, J., Hill, S.R., Minihane, A.M., Haskell, C., and Kennedy, D. (2013). DHA supplementation improved both memory and reaction time in healthy young adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* *97*, 1134-1143.
- Stough, C., Downey, L., Silber, B., Lloyd, J., Kure, C., Wesnes, K., and Camfield, D. (2012). The effects of 90-day supplementation with the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function and visual acuity in a healthy aging population. *Neurobiol Aging* *33*, 824 e821-823.
- Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Cutler, R.G., Lee, K., Egan, J.M., and Mattson, M.P. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* *11*, 309-317.

Stranahan, A.M., Lee, K., Martin, B., Maudsley, S., Golden, E., Cutler, R.G., and Mattson, M.P. (2009). Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* 19, 951-961.

Strine, T.W., Mokdad, A.H., Dube, S.R., Balluz, L.S., Gonzalez, O., Berry, J.T., Manderscheid, R., and Kroenke, K. (2008). The association of depression and anxiety with obesity and unhealthy behaviors among community-dwelling US adults. *Gen Hosp Psychiatry* 30, 127-137.

Stump, M., Mukohda, M., Hu, C., and Sigmund, C.D. (2015). PPARgamma Regulation in Hypertension and Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 17, 89.

Su, K.P., Huang, S.Y., Peng, C.Y., Lai, H.C., Huang, C.L., Chen, Y.C., Aitchison, K.J., and Pariante, C.M. (2010). Phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 genes influence the risk of interferon-alpha-induced depression by regulating polyunsaturated fatty acids levels. *Biol Psychiatry* 67, 550-557.

## T

Tannenbaum, B.M., Brindley, D.N., Tannenbaum, G.S., Dallman, M.F., McArthur, M.D., and Meaney, M.J. (1997). High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 273, E1168-1177.

Tarr, A.J., Galley, J.D., Fisher, S.E., Chichlowski, M., Berg, B.M., and Bailey, M.T. (2015). The prebiotics 3'Sialyllactose and 6'Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut-brain axis. *Brain Behav Immun* 50, 166-177.

Thaler, J.P., Choi, S.J., Schwartz, M.W., and Wisse, B.E. (2010). Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox. *Front Neuroendocrinol* 31, 79-84.

Tsatsoulis, A., Mantzaris, M.D., Bellou, S., and Andrikoula, M. (2013). Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism* 62, 622-633.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-1338.

Tsigos, C., and Chrousos, G.P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.

## U

Uguz, F., Akman, C., Kucuksarac, S., and Tufekci, O. (2009). Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy is associated with less frequent mood and anxiety disorders in patients with rheumatoid arthritis. *Psychiatry Clin Neurosci* 63, 50-55.

## V

Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Jr., Stoffel, M., and Friedman, J.M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14, 95-97.

Valkanova, V., Ebmeier, K.P., and Allan, C.L. (2013). CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord* 150, 736-744.

Valladolid-Acebes, I., Stucchi, P., Cano, V., Fernandez-Alfonso, M.S., Merino, B., Gil-Ortega, M., Fole, A., Morales, L., Ruiz-Gayo, M., and Del Olmo, N. (2011). High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiol Learn Mem* 95, 80-85.

- van Dam, A.M., Poole, S., Schultzberg, M., Zavala, F., and Tilders, F.J. (1998). Effects of peripheral administration of LPS on the expression of immunoreactive interleukin-1 alpha, beta, and receptor antagonist in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 840, 128-138.
- van Groen, T., and Wyss, J.M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol* 302, 515-528.
- Vancassel, S., Durand, G., Barthelemy, C., Lejeune, B., Martineau, J., Guilloteau, D., Andres, C., and Chalon, S. (2001). Plasma fatty acid levels in autistic children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65, 1-7.
- Varela, L., and Horvath, T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13, 1079-1086.
- Vauzour, D., Martinsen, A., and Laye, S. (2015). Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochem Int*.
- Velloso, L.A., Araujo, E.P., and de Souza, C.T. (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 15, 189-193.
- Vidrih, B., Karlovic, D., Pasic, M.B., Uremovic, M., Mufic, A.K., and Matosic, A. (2012). A review of the psychoneuroimmunologic concepts on the etiology of depressive disorders. *Acta Clin Croat* 51, 403-409.
- Vigor, C., Bertrand-Michel, J., Pinot, E., Oger, C., Vercauteren, J., Le Faouder, P., Galano, J.M., Lee, J.C., and Durand, T. (2014). Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 964, 65-78.
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., and Harris, T.B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282, 2131-2135.
- Vreeburg, S.A., Zitman, F.G., van Pelt, J., Derijk, R.H., Verhagen, J.C., van Dyck, R., Hoogendijk, W.J., Smit, J.H., and Penninx, B.W. (2010). Salivary cortisol levels in persons with and without different anxiety disorders. *Psychosom Med* 72, 340-347.

## W

- Wada, J., and Makino, H. (2016). Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 12, 13-26.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- Wang, D.S., Tian, Z., Guo, Y.Y., Guo, H.L., Kang, W.B., Li, S., Den, Y.T., Li, X.B., Feng, B., Feng, D., *et al.* (2015). Anxiolytic-like effects of translocator protein (TSPO) ligand ZBD-2 in an animal model of chronic pain. *Mol Pain* 11, 16.
- Wang, T., Yang, Y.J., Wu, P.F., Wang, W., Hu, Z.L., Long, L.H., Xie, N., Fu, H., Wang, F., and Chen, J.G. (2011). Tetrahydroxystilbene glucoside, a plant-derived cognitive enhancer, promotes hippocampal synaptic plasticity. *Eur J Pharmacol* 650, 206-214.
- Weaver, J.D., Huang, M.H., Albert, M., Harris, T., Rowe, J.W., and Seeman, T.E. (2002). Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology* 59, 371-378.
- Whiteman, D.C., and Wilson, L.F. (2016). The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiol.*

Wierenga, C.J., Walsh, M.F., and Turrigiano, G.G. (2006). Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J Neurophysiol* 96, 2127-2133.

Wisse, B.E., Ogimoto, K., Morton, G.J., Wilkinson, C.W., Frayo, R.S., Cummings, D.E., and Schwartz, M.W. (2004). Physiological regulation of hypothalamic IL-1beta gene expression by leptin and glucocorticoids: implications for energy homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1107-1113.

Wittchen, H.U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., *et al.* (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 655-679.

Wosiski-Kuhn, M., Erion, J.R., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E., and Stranahan, A.M. (2014). Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice. *Psychoneuroendocrinology* 42, 165-177.

Wu, A., Molteni, R., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2003). A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 119, 365-375.

Wu, H.W., Ren, L.F., Zhou, X., and Han, D.W. (2015). A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Neurosci* 18, 323-328.

## X

Xiang, X., An, W., Jiang, C., Zhao, J., Wang, X., Sun, G., Li, Y., and Zhang, W. (2013). Lipopolysaccharide inhibits the expression of resistin in adipocytes. *J Mol Endocrinol* 51, 287-299.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.

## Y

Yarchoan, M., and Arnold, S.E. (2014). Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 2253-2261.

Yates, K.F., Sweat, V., Yau, P.L., Turchiano, M.M., and Convit, A. (2012). Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2060-2067.

Ye, H., Zhang, H.J., Xu, A., and Hoo, R.L. (2013). Resistin production from adipose tissue is decreased in db/db obese mice, and is reversed by rosiglitazone. *PLoS One* 8, e65543.

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

## Z

Zaminelli, T., Gradowski, R.W., Bassani, T.B., Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Maria-Ferreira, D., Baggio, C.H., and Vital, M.A. (2014). Antidepressant and antioxidative effect of Ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 26, 351-362.

Zhang, M.M., Liu, S.B., Chen, T., Koga, K., Zhang, T., Li, Y.Q., and Zhuo, M. (2014a). Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. *Mol Brain* 7, 47.

- Zhang, W.N., Bast, T., Xu, Y., and Feldon, J. (2014b). Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 262, 47-56.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61-73.
- Zhao, Q., Matsumoto, K., Tsuneyama, K., Tanaka, K., Li, F., Shibahara, N., Miyata, T., and Yokozawa, T. (2011). Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, kangen-karyu: elucidation in type 2 diabetes db/db mice. *J Pharmacol Sci* 117, 230-242.
- Zhao, Q., Niu, Y., Matsumoto, K., Tsuneyama, K., Tanaka, K., Miyata, T., and Yokozawa, T. (2012). Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complement Altern Med* 12, 188.
- Zheng, Y., Yang, Y., Dong, B., Zheng, H., Lin, X., Du, Y., Li, X., Zhao, L., and Gao, H. (2016). Metabonomic profiles delineate potential role of glutamate-glutamine cycle in db/db mice with diabetes-associated cognitive decline. *Mol Brain* 9, 40.
- Zhong, W.X., Dong, Z.F., Tian, M., Cao, J., Xu, L., and Luo, J.H. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in CA1 region affects synaptic expression of glutamate receptor subunits and associated proteins in the whole hippocampus. *Neuroscience* 141, 1399-1413.
- Zhou, J., and Cidlowski, J.A. (2005). The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70, 407-417.
- Zunszain, P.A., Anacker, C., Cattaneo, A., Carvalho, L.A., and Pariante, C.M. (2011). Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 722-729.



## **ANNEXES**





# LES TROUBLES DE L'HUMEUR ASSOCIÉS À L'OBÉSITÉ ET AU DIABÈTE DE TYPE 2

## Rôle de la neuroinflammation



Célia Fourier\*, Nathalie Castanon\*, Sophie Layé\*

La prévalence des troubles de l'humeur, tels que la dépression majeure, chez les patients obèses et/ou diabétiques atteint près de 30 %, c'est-à-dire le double de ce qui est observé dans la population générale. Ceci est problématique, car la dépression augmente le risque de développer des comorbidités telles que les troubles cardiovasculaires et altère la qualité de vie des patients. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la dépression chez les sujets

obèses/diabétiques est un enjeu majeur de santé publique. Des données épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont révélé que l'action sur le cerveau de l'inflammation de bas grade qui accompagne l'obésité et le diabète est clé dans la symptomatologie dépressive. Les pistes nutritionnelles utilisant les propriétés anti-inflammatoires de nutriments, notamment les acides gras polyinsaturés de type n-3, dans la prise en charge des troubles de l'humeur associés à l'obésité, sont discutées.

### INTRODUCTION

Aujourd'hui, l'obésité est devenue une véritable pandémie mondiale avec, en 2014, plus de 600 millions d'adultes obèses dans le monde (Organisation mondiale de la santé, OMS). De plus, la prévalence du diabète ne cesse d'augmenter et atteint près de 9 % de la population adulte avec une prévision de 592 millions de personnes atteintes en 2035 (OMS, 2014, [1]). Parmi les patients diabétiques, 90 % sont atteints d'un diabète de type 2 (DT2). Outre les comorbidités métaboliques (hyperglycémie, insulino-résistance...), l'obésité sévère et le DT2 sont associés à un plus grand risque de dévelop-

per des altérations neuropsychiatriques telles que la dépression majeure [2]. En effet, la prévalence de dépression chez des patients diabétiques est environ deux fois plus élevée qu'en population générale non diabétique du même âge [3]. Chez le sujet obèse et/ou DT2, les troubles neuropsychiatriques compliquent la prise en charge médicale du patient : en effet, la mauvaise estime de soi et l'autonégligence, qui sont des symptômes de la dépression, participent au mauvais suivi des traitements et des recommandations hygiénodététiques, avec un impact considérable sur la qualité de vie des patients [4]. De plus, la dépression est un facteur de risque pour le développement des comorbidités du diabète, dont les

risques cardiovasculaires, et augmente la mortalité. L'étiologie de la dépression associée au diabète est encore peu connue, ainsi la compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire afin d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients.

### OBÉSITÉ ET DT2 : DES PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES À BAS BRUIT

Bien que différents mécanismes neurobiologiques puissent avoir un rôle dans la mise en place d'une dépression associée à l'obésité et au DT2, des études récentes chez l'Homme et chez l'animal ont mis en évidence un rôle de

\*NutriNeuro (Nutrition et Neurobiologie Intégrée)  
UMR 1286 INRA Université de Bordeaux

l'inflammation dans ce processus (5). L'obésité et le DT2 sont en effet associés à une inflammation chronique dite à bas bruit qui se traduit par des concentrations de facteurs inflammatoires (dont les cytokines) dans la circulation sanguine supérieures aux taux observés chez des sujets non obèses. Un des facteurs majeurs dans le développement de cet état d'inflammation chronique à bas bruit est l'augmentation de la proportion de tissu adipeux blanc. En effet, les adipocytes, mais également les macrophages et les cellules T, s'accumulent progressivement dans le tissu adipeux et sécrètent des facteurs inflammatoires libérés dans la circulation. De nombreuses études ont montré une amélioration du profil inflammatoire circulant chez des patients obèses après une perte de poids importante. De plus, de nombreux patients diabétiques de type 2 sont obèses ou en surpoids et plusieurs études ont montré une relation entre facteurs inflammatoires circulants et mesures d'adiposité (en particulier d'adiposité viscérale) chez les patients diabétiques de type 2. Différentes études montrent que l'obésité est également associée à des altérations de composition de la flore intestinale, ou microbiote intestinal, et à une augmentation de la perméabilité intestinale permettant le passage d'endotoxines bactériennes dans la circulation. Ces altérations gastro-intestinales participent également au développement de l'inflammation à bas bruit associée au DT2 (6). Il est clairement établi que l'inflammation systémique provoque une inflammation cérébrale, caractérisée par la production locale de cytokines inflammatoires (7).

Ainsi, les cytokines inflammatoires libérées dans la circulation peuvent agir à distance sur différents organes, dont le cerveau, au travers de voies humorale, neurale et cellulaire. L'activation de ces différentes voies de communication entre le système immunitaire et le cerveau entraîne la production de cytokines cérébrales par les cellules endothéliales et gliales, en particulier les macrophages résidents du cerveau appelés microglie.

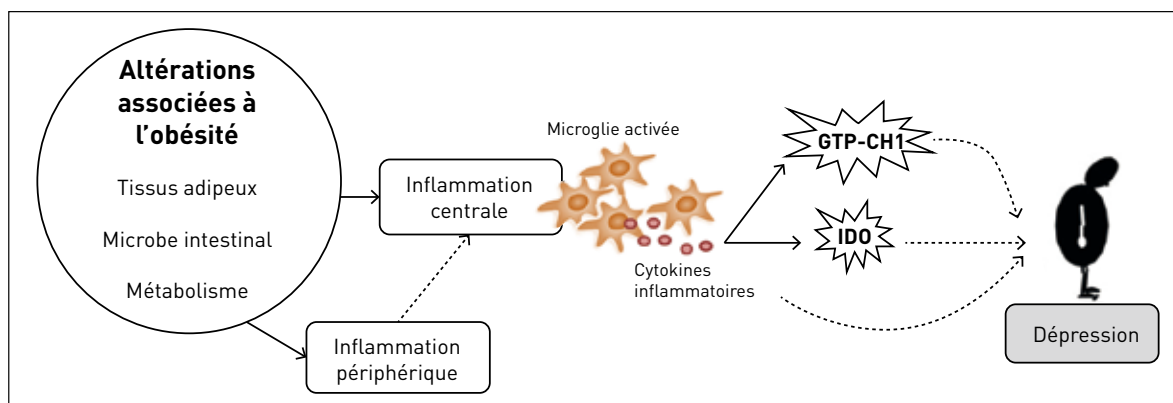
### NEUROINFLAMMATION : UN FACTEUR CLÉ DANS LA RÉGULATION DE L'HUMEUR

Depuis des années, des études cliniques et expérimentales ont montré que la dérégulation de la production et/ou l'activité des cytokines inflammatoires jouent un rôle majeur dans le développement de troubles neuropsychiatriques dans des situations associées à une inflammation. En effet, les cytokines sont capables de moduler différents mécanismes neurobiologiques impliqués dans la régulation de l'humeur, dont le métabolisme et la fonction de certains neurotransmetteurs (les monoamines), l'activité neuroendocrinienne, la plasticité neuronale et/ou les connexions neuronales entre différentes structures cérébrales. Lors d'une infection, la synthèse transitoire de cytokines inflammatoires coordonne un nombre important de changements comportementaux (anorexie, fatigue, altérations transitoires de la cognition et de l'humeur...) regroupés sous le terme de "comportement de maladie". Nécessaire à la résolution de l'infection, le comportement de

maladie est généralement transitoire et ne dure que jusqu'à ce que le pathogène soit éliminé et que le système inflammatoire ne soit plus activé. Cependant, des conditions médicales telles que l'obésité et le DT2 sont caractérisées par une activation prolongée du système immunitaire cérébral. Il est important de noter que l'inflammation cérébrale associée à ces pathologies est particulièrement marquée dans l'hypothalamus, siège du contrôle de l'homéostasie énergétique, mais également dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur et de la cognition, telles que l'hippocampe. Par exemple, des modèles animaux de DT2 tels que les souris *ob/ob* (déficientes pour le gène de la leptine) et les souris *db/db* (déficientes pour le gène du récepteur de la leptine) présentent des altérations métaboliques associées à une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires (interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$ ) dans l'hippocampe (8). De façon notable, cette augmentation de l'inflammation hippocampique dans des modèles animaux du DT2 est associée, chez ces rongeurs, au développement d'altérations émotionnelles s'apparentant à certains symptômes de la dépression majeure chez l'Homme (Fig. 1).

### MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LES ALTÉRATIONS COMPORTEMENTALES ASSOCIÉES À L'INFLAMMATION

Au niveau des monocytes, macrophages et microglies activés, les cytokines inflammatoires sont capables d'induire la synthèse de



**FIGURE 1 - Rôle de l'inflammation dans le développement de la dépression associée à l'obésité. L'obésité est caractérisée par des altérations métaboliques et par une inflammation périphérique à bas bruit provenant d'altérations du tissu adipeux et de la fonctionnalité de la barrière intestinale. Ces altérations participent à la mise en place d'une inflammation cérébrale qui représente un facteur majeur dans le développement de la dépression associée au diabète.**

différentes enzymes telles que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la GTP-cyclohydrolase 1 (GTP-CH1), qui vont alors altérer la biosynthèse de monoamines (sérotonine, dopamine...) connues pour jouer un rôle majeur dans la régulation de l'humeur. L'activation de l'IDO fait partie de la réponse inflammatoire à une infection. L'IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel précurseur de la sérotonine (9). Ainsi, l'activation de l'IDO, qui dégrade alors le tryptophane en kynurénine, peut entraîner une réduction de la production de sérotonine. Cette activation due à une inflammation aiguë est généralement bénéfique. Cependant, une activation prolongée de l'IDO cérébrale peut être délétère puisqu'elle a un impact négatif sur la neurotransmission monoaminergique, mais également sur la survie neuronale. De façon intéressante, le développement de symptômes neuropsychiatriques chez des patients souffrant de pathologies à composantes inflammatoires comme la

maladie d'Alzheimer est associé à des niveaux élevés de kynurénine circulante. De façon similaire, des patients souffrant d'obésité sévère associée à une forte prévalence de symptômes neuropsychiatriques ont également une activation élevée de l'IDO, ainsi qu'une atrophie hippocampique, en comparaison à des sujets non obèses (2). Chez l'animal, l'activation d'IDO chez des souris obèses induit une forte augmentation des concentrations cérébrales de kynurénine. De plus, l'administration de kynurénine à des souris normo-pondérales induit des comportements de type anxieux et de type dépressif ainsi que des altérations cognitives. Ces données mettent donc en évidence un rôle possible des métabolites neurotoxiques de la kynurénine dans le développement de symptômes neuropsychiatriques induits par l'inflammation associée à l'obésité.

De façon concomitante, les cytokines réduisent la disponibilité synaptique de la dopamine en agissant sur les enzymes responsables

de la synthèse de ce neurotransmetteur. Les cytokines inflammatoires activent en effet l'enzyme GTP-CH1, enzyme limitante de la synthèse de néoptérine. Cette activation induit ainsi la production de néoptérine au détriment de la tétrahydrobioptérine (BH4). La BH4 est un cofacteur de la tyrosine hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse des catécholamines, dont la dopamine. La réduction de la disponibilité de la BH4 entraîne ainsi la diminution de la synthèse de dopamine. L'activation de GTP-CH1 par les cytokines, indirectement mesurée par l'augmentation de la production de néoptérine, est ainsi capable d'altérer la production de dopamine, qui est impliquée dans la régulation de l'humeur (10). En accord avec ces données, des niveaux réduits de BH4 et une augmentation de la concentration de néoptérine dans le sang ont été mesurés chez des patients souffrant de troubles neuropsychiatriques. Il est important de noter que, chez la personne âgée, l'inflammation chronique à bas bruit s'accompagne de l'activation d'IDO et de GTP-CH1 qui est corrélée aux

altérations neuropsychiatriques fréquemment observées dans cette population. De plus, des taux de néoptérine élevés ont été mesurés chez le sujet obèse, ce qui suggère que l'activation de GTP-CH1 par les cytokines dans un contexte d'obésité, et les altérations de la neurotransmission dopaminergique qui en résultent pourraient contribuer au développement des symptômes neuropsychiatriques associés à l'obésité.

### IMPACT DES OMÉGA-3 SUR LA NEUROINFLAMMATION ASSOCIÉE À L'OBÉSITÉ

De nombreuses études ont établi un lien entre la consommation de certains nutriments, en particulier les acides gras polyinsaturés de type n-3 (AGPI n-3), et la régulation de l'inflammation [11]. Des interventions nutritionnelles basées sur ces nutriments aux propriétés anti-inflammatoires et connus pour moduler les comportements émotionnels pourraient donc représenter des stratégies intéressantes dans le cadre du développement de nouvelles stratégies visant à améliorer les troubles neuropsychiatriques associés à l'obésité et/ou au DT2. Les AGPI sont des acides gras dits "essentiels" puisqu'ils ne peuvent pas être synthétisés de novo par l'organisme et doivent donc être fournis par l'alimentation. Il existe deux familles d'AGPI : ceux de la série n-6 (dits oméga-6) et ceux de la série n-3 (dits oméga-3). En France, les apports en oméga-3 et en oméga-6 sont déséquilibrés : le rapport oméga-6/oméga-3 est de l'ordre de 10, soit plus du double des recommandations nutritionnelles (Agence nationale de sécu-

### ENCADRÉ - LES CYTOKINES MODULENT L'ACTIVITÉ DES SYSTÈMES DE NEUROTRANSMISSION

- **Indoléamine-2,3 dioxygénase (IDO)** : l'IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel dans la synthèse de sérotonine (5-HT), dont la neurotransmission est perturbée au cours de la symptomatologie dépressive. L'activation de l'IDO, tout en induisant une déplétion en tryptophane, va entraîner la synthèse de kynurénine. Ce métabolite peut à son tour être métabolisé en acide quinolinique, excitotoxique, et en acide kynurénique, neuroprotecteur du fait de ses propriétés antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA (N-méthyl-D-aspartate). L'acide quinolinique est également impliqué dans la production de radicaux libres. Une activation du système immunitaire à la périphérie peut entraîner un basculement du métabolisme de la kynurénine dans le système nerveux central vers la production d'acide quinolinique, au détriment de l'acide kynurénique, entraînant un état "neurotoxique".
- **Guanosine-triphosphate-cyclohydrolase-1 (GTP-CH1)** : l'activation de l'enzyme GTP-CH1 entraîne la production de néoptérine à partir du GTP au détriment de la formation de tétrahydrobioptérine (BH4). Le BH4 est nécessaire à la conversion par la tyrosine hydroxylase de la tyrosine en dopa, précurseur de la dopamine. L'activation de la GTP-CH1 induit donc une diminution des taux de BH4, et par conséquent une diminution de la synthèse de dopamine.

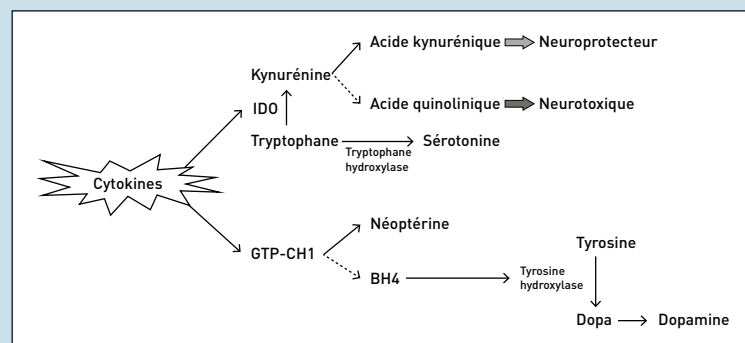


FIGURE 2 - Effet des cytokines sur les systèmes de neurotransmission.

rité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Des études ont mis en évidence des effets anti-inflammatoires des AGPI n-3 à la périphérie [12]. Ainsi, dans les cellules immunitaires, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), des précurseurs des AGPI n-3, réduisent la synthèse de cytokines inflammatoires par l'intermédiaire de dérivés bioactifs comme

les résolvines et protectines, des molécules impliquées dans la résolution de l'inflammation. Chez l'Homme, une consommation élevée de DHA est par ailleurs associée à un risque plus faible de développer des pathologies à composante neuroinflammatoire comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer [13]. Ceci a amené à poser l'hypothèse que le DHA pourrait également avoir des

effets anti-inflammatoires dans le cerveau. En effet, des études chez le rongeur ont mis en évidence un impact des AGPI n-3 non seulement sur la neurogenèse ou la plasticité cérébrale, mais également sur la neuroinflammation. Par exemple, l'activation microgliale et la production accrue de cytokines inflammatoires observées dans un contexte de vieillissement sont diminuées par un enrichissement du régime en EPA et/ou en DHA. De plus, chez la souris, une carence alimentaire en DHA entraîne une activation microgliale et une production accrue de cytokines inflammatoires dans l'hippocampe. En parallèle de leurs effets sur la neuroinflammation, les AGPI n-3 ont également un rôle dans la régulation de l'humeur (14). Par exemple, des patients dépressifs ont des niveaux sanguins d'EPA et de DHA diminués en comparaison à des sujets sains. Au niveau cérébral, des études post-mortem réalisées chez des patients qui souffraient de dépression majeure ont révélé que les taux de DHA étaient plus faibles dans le cortex orbitofrontal. À ces observations

cliniques s'ajoutent des études épidémiologiques qui ont montré qu'une faible consommation d'AGPI n-3 était liée à une prévalence plus élevée de troubles de l'humeur. L'implication du DHA cérébral dans le développement de la dépression a également été évaluée chez l'animal. En effet, il a été montré que la consommation d'un régime contenant de faibles taux d'AGPI n-3 pendant plusieurs générations successives induisait des comportements de types anxieux et dépressif chez le rat, la souris et le primate non humain, et que ces comportements étaient associés à de faibles niveaux de DHA au niveau cérébral dans des structures telles que l'hippocampe. L'ensemble de ces données suggère donc un effet "anti-dépresseur" des AGPI n-3 par une action cérébrale, notamment en réduisant la neuroinflammation. Si cette piste nutritionnelle est prometteuse dans la prise en charge de la neuroinflammation et de ses effets sur le cerveau, il reste cependant à démontrer que les AGPI n-3 protègent de la dépression associée à l'obésité ou au DT2.

## CONCLUSION

De nombreuses données indiquent que l'inflammation est impliquée dans les troubles de l'humeur associés à l'obésité et au DT2. Il reste cependant encore à mieux caractériser la composante neuroinflammatoire par des études d'imagerie cérébrale chez l'Homme afin de développer des stratégies de prise en charge adaptées. Dans ce contexte, des études utilisant des approches nutritionnelles basées sur des nutriments tels que les AGPI n-3, qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et sont connus pour moduler l'humeur sont donc attendues. ■

✘ Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## MOTS-CLÉS

**Obésité, Diabète de type 2, Troubles de l'humeur, Dépression, Neuroinflammation**



## Bibliographie

- Ryden L, Grant PJ, Anker SD et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013 ; 34 : 3035-87.
- Castanon N, Luheshi G, Laye S. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci* 2015 ; 9:229.
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE et al. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2001 ; 24 : 1069-78.
- Moulton CD, Pickup JC, Ismail K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015 ; 3 : 461-71.
- Castanon N, Lasselín J, Capuron L. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014 ; 5:74.
- Cani PD, Osto M, Geurts L et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 2012 ; 3 : 279-88.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008 ; 9 : 46-56.
- Dinel AL, Andre C, Aubert A et al. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 2014 ; 40:48-59.
- Reus GZ, Jansen K, Titus S et al. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res* 2015 ; 68:316-328.
- Murr C, Widner B, Wirleitner B et al. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab* 2002 ; 3 : 175-87.
- Bazinet RP, Laye S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014 ; 15 : 771-85.
- Vauzour D, Martinsen A, Laye S. Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochem Int* 2015.
- Joffre C, Nadjar A, Lebbadi M et al. n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2014 ; 91 : 1-20.
- Laye S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010 ; 82 : 295-303.

# Rôle de l'inflammation dans la dépression associée au diabète

Le diabète de type 2 est associé à une prévalence élevée de développer une dépression. L'identification des mécanismes sous-tendant cette association est un enjeu de santé publique majeur. Des données récentes suggèrent que des processus inflammatoires seraient impliqués dans le développement de ces altérations émotionnelles. L'activité anti-inflammatoire de certains traitements anti-diabète pourrait donc contribuer à une amélioration des symptômes dépressifs chez certains patients diabétiques.

**Célia Fourier, doctorante, Nathalie Castanon, chargé de recherche et Sophie Layé, directeur de recherche, unité NutriNeuro (Nutrition et Neurobiologie Intégrée), UMR 1286, INRA, Université de Bordeaux, Bordeaux.**

*Déclaration d'intérêts : Pas de lien d'intérêt avec l'article.*

## ► Introduction

Le diabète, dont la prévalence mondiale ne cesse d'augmenter (9 % de la population adulte en 2014 d'après l'Organisation mondiale de la santé, OMS) constitue un véritable problème de santé publique. Des études estiment à 592 millions le nombre de personnes qui seront touchées par la maladie en 2035 (1). Parmi les patients diabétiques, 90 % sont atteints d'un diabète de type 2 (DT2). Outre des altérations métaboliques (hyperglycémie, insulino-résistance...), il est associé à une prévalence accrue de développer des co-morbidités neuropsychiatriques telles que la dépression majeure (2). En effet, on sait désormais que la prévalence de dépression chez des patients diabétiques est environ deux fois plus élevée que dans la population générale non diabétique du même âge (3). La dépression a un impact considérable sur la qualité de vie et la prise en charge médicale du patient ainsi que sur le risque de complications (4). En effet, chez l'adulte, elle se caractérise par une mauvaise estime de soi et une auto-négligence, et son occurrence dans un contexte de diabète peut entraîner, entre autres choses, un mauvais suivi du traitement par le patient. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'association entre diabète et dépression est donc nécessaire afin d'améliorer la qualité de vie du patient et sa prise en charge.

## ► Le diabète : une condition inflammatoire périphérique et centrale

Bien que différents mécanismes neurobiologiques puissent avoir un rôle dans la mise en place d'une dépression associée au diabète, des études récentes chez l'Homme et chez l'animal ont mis en évidence l'importance de l'inflammation dans ce processus (5, 6). Le DT2 est en effet associé à un profil inflammatoire caractérisé par une augmentation de la concentration de cytokines inflammatoires circulantes. Un des facteurs majeurs dans le développement de cet état d'inflammation chronique dit à bas bruit est l'augmentation de la proportion de tissu adipeux blanc. En effet, les

adipocytes mais également les macrophages et les cellules T s'accumulent progressivement dans le tissu adipeux et sécrètent des facteurs inflammatoires libérés dans la circulation. Le DT2 est également associé à des altérations du microbiote intestinal et à une augmentation de la perméabilité intestinale permettant le passage d'endotoxines bactériennes dans la circulation (7). Des études dans des modèles animaux de diabète ont ainsi mis en évidence que ces altérations gastro-intestinales participaient également au développement de l'inflammation à bas bruit associée au diabète (Figure 1).

Il est clairement établi que l'inflammation systémique provoque une inflammation cérébrale, caractérisée par la production locale de cytokines inflammatoires (8). Ainsi, les cytokines inflammatoires libérées dans la circulation peuvent agir à distance sur différents organes, dont le cerveau, au travers de voies humorale, neurale et cellulaire. L'activation de ces voies de communication entre le système immunitaire et le cerveau entraîne la production de cytokines cérébrales par les cellules endothéliales et gliales, en particulier les macrophages résidents du cerveau appelés microglie. Dans le cerveau, les cytokines sont capables de moduler des mécanismes neurobiologiques impliqués dans la régulation de l'humeur, dont le métabolisme et la fonction des neurotransmetteurs (les monoamines), l'activité neuroendocrinienne, la plasticité neuronale et/ou les connexions neuronales entre différentes structures cérébrales. Il est intéressant de noter que l'inflammation cérébrale associée au diabète est particulièrement marquée dans l'hypothalamus, siège du contrôle de l'homéostasie énergétique (9), mais également dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur et de la cognition, telles que l'hippocampe. Par exemple, des modèles animaux de DT2 tels que les souris ob/ob (déficientes pour le gène de la leptine) et les souris db/db (déficiente pour le gène du récepteur de la leptine) présentent des altérations métaboliques associées à une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires

## Mots-clés :

Diabète de type 2,  
Dépression,  
Inflammation,  
Neuro-inflammation,  
Métabolisme



dans l'hippocampe (IL-1, IL-6, TNF-) (10, 11). Au niveau des monocytes, macrophages et microglies activés, ces cytokines inflammatoires sont capables d'induire la synthèse de différentes enzymes telles que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la GTP-cyclohydrolase 1 (GTP-CH1), qui vont alors altérer la biosynthèse de monoamines (sérotonine, dopamine...) connues pour jouer un rôle majeur dans la régulation de l'humeur. De façon notable, cette augmentation de l'inflammation hippocampique dans des modèles animaux du DT2 est associée, chez ces rongeurs, au développement d'altérations émotionnelles s'apparentant à certains symptômes de la dépression majeure chez l'Homme (Figure 2).

### Des facteurs modulateurs

Il existe plusieurs facteurs pouvant moduler l'impact de la neuro-inflammation sur la dépression associée au diabète.

#### L'axe corticotrope

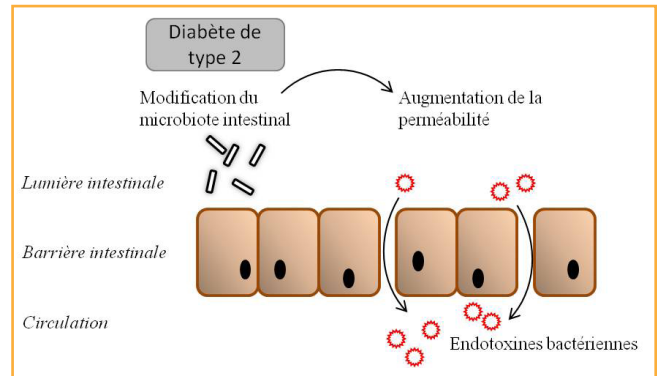
Les effets centraux des cytokines sur la régulation de l'humeur peuvent être modulés par des systèmes neuro-endocriniens, notamment l'axe corticotrope (ou axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien) qui est connu pour être suractivé dans un contexte de diabète. De plus, il est bien établi que des altérations immunes peuvent causer des changements significatifs de l'activité de l'axe corticotrope et vice versa. Ainsi, il a été montré récemment que les glucocorticoïdes pouvaient moduler la sensibilité des microglies dans un modèle animal de diabète (12).

#### La leptine

Une des caractéristiques du diabète est une augmentation significative de la production de leptine et une résistance à cette adipokine. Celle-ci est synthétisée proportionnellement à la quantité de masse grasse et a été largement étudiée pour son rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et du comportement alimentaire. Cependant, la distribution des récepteurs de la leptine dans des structures telles que l'hippocampe a permis de mettre en évidence son rôle dans la régulation des émotions. Des études cliniques ont mis en évidence de faibles niveaux de leptine dans le sérum ou le liquide céphalo-rachidien de sujets atteints de dépression majeure (13). Chez l'animal, des souris diabétiques caractérisées par une altération de la signalisation de la leptine ont des réponses émotionnelles altérées, en association avec une augmentation de l'inflammation hippocampique. Ces données suggèrent que la leptine et les cytokines contribuent de façon synergique au développement de la dépression associée à l'obésité. Cette hypothèse est renforcée par des études montrant que la leptine est un modulateur important du système immunitaire, en particulier de l'activation des cellules immunitaires en périphérie et de la microglie dans le cerveau (14).

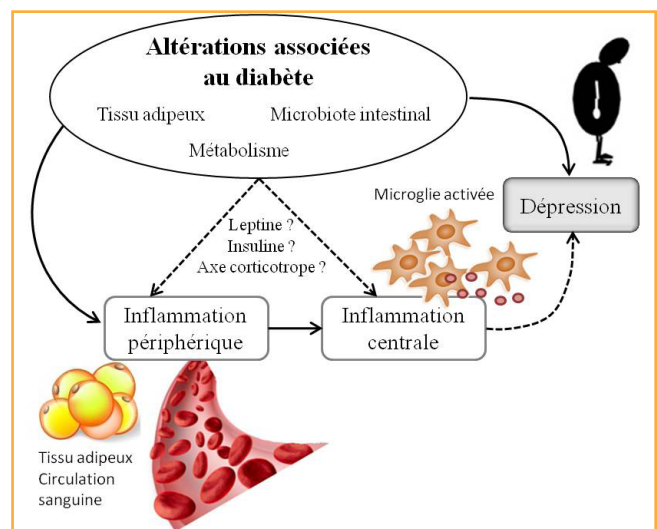
#### L'insuline

L'insuline, dont les taux circulants et les voies de signalisation sont altérés en cas de diabète, est capable d'interagir



**Figure 1 - Rôle des altérations gastro-intestinales dans le développement de l'inflammation à bas bruit associée au diabète.**

Le microbiote intestinal contrôle la fonctionnalité de la barrière intestinale et le développement d'une endotoxémie métabolique. Le diabète de type 2 est associé à des modifications de la composition et de la perméabilité de la barrière intestinale. Ce phénomène participe à l'induction de l'endotoxémie métabolique et initie le développement de l'inflammation dite à bas-bruit associée au diabète.



**Figure 2 - Rôle de l'inflammation dans le développement de la dépression associée au diabète de type 2.** Le DT2 est caractérisé par des altérations métaboliques (hyperinsulinémie, hyperleptinémie, suractivation de l'axe corticotrope...) et par une inflammation périphérique à bas bruit, provenant d'altérations du tissu adipeux et de la fonctionnalité de la barrière intestinale. Ces altérations participent à la mise en place d'une inflammation cérébrale qui représente un facteur majeur dans le développement de la dépression associée au diabète.

avec les processus inflammatoires et d'agir au sein du cerveau pour moduler la cognition et l'humeur (15). L'altération de la voie de signalisation de l'insuline pourrait ainsi, comme la leptine, contribuer au développement d'une dépression dans un contexte de diabète, en interagissant avec les cytokines cérébrales. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de tester cette hypothèse.

### ► Traitements antidiabétiques : effets anti-inflammatoires au-delà du contrôle de la glycémie ?

Plusieurs traitements pharmacologiques anti-inflammatoires (traitements à base de salicylate, anticorps anti-cytokines, activateurs de SIRT1...) ont été récemment testés lors d'essais cliniques chez des patients diabétiques de type 2 dans le but de diminuer la résistance à l'insuline, d'améliorer la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas et/ou d'améliorer les fonctions cardiovasculaires. Cependant, aucun d'entre eux n'a donné de résultats permettant une généralisation de son usage clinique. En revanche, certains médicaments actuellement utilisés dans le traitement du DT2 exercent une activité anti-inflammatoire, au-delà de leur effet sur le contrôle du glucose ou sur les taux d'hémoglobine glyquée, qui constitue le paramètre de référence dans la surveillance de l'équilibre glycémique des patients diabétiques (16). Cette action anti-inflammatoire peut résulter de la diminution de l'hyperglycémie en elle-même, mais elle pourrait également être due à d'autres mécanismes indépendants de l'amélioration de la glycémie. Ainsi, les niveaux de molécules inflammatoires sont diminués chez des patients diabétiques traités avec des thiazolidinediones et dans une moindre mesure avec de la metformine (appartenant à la famille des biguanides). En effet, l'utilisation de thiazolidinediones chez des sujets diabétiques diminue notamment la synthèse de facteurs chimio-attractants des macrophages ainsi que l'infiltration de ceux-ci dans le tissu adipeux. Cependant, d'autres traitements antidiabétiques tels que les sulphonylurées, les glinides, les inhibiteurs des  $\beta$ -glucosidases et les inhibiteurs des SGLT2 ont un effet anti-inflammatoire plus modeste, voire non démontré. Des études complémentaires sont par ailleurs nécessaires afin d'évaluer les capacités anti-inflammatoires des incrétines (analogues du GLP-1 ou inhibiteurs de la DDP4). Cependant, bien que les effets anti-inflam-

matoires de certains traitements antidiabétiques aient été mis en évidence à la périphérie, ceux-ci sont très peu étudiés dans le cerveau. Or, si un traitement antidiabétique améliore l'inflammation dans certaines structures telles que l'hippocampe, ceci pourrait contribuer à une amélioration des symptômes dépressifs chez certains patients diabétiques. Chez l'animal, il a été mis en évidence dans un modèle animal de DT2 que l'inflammation dans l'hippocampe était associée à une résistance à l'insuline dans cette même structure (12). Une amélioration de cette insulino-résistance au niveau cérébral grâce à des traitements antidiabétiques pourrait ainsi diminuer la neuro-inflammation et participer à une amélioration des réponses émotionnelles. Récemment, des études ont montré que des traitements antidiabétiques tels que l'exendine-4 (analogue du GLP-1) diminuait l'inflammation dans l'hippocampe de souris hyperglycémiques et que cet effet était associé à une amélioration de la cognition (17). Peu de données sont cependant disponibles quant aux effets de tels traitements sur les symptômes dépressifs chez l'Homme diabétique.

### ► Conclusion

Il existe encore peu de données chez l'Homme mettant en évidence le rôle de l'inflammation cérébrale dans le développement de la dépression associée au DT2. Cependant, si l'inflammation est impliquée dans l'étiologie de cette pathologie, de nouveaux traitements pourraient cibler une diminution de l'inflammation. De nos jours, il n'existe pas d'étude dans laquelle des modifications de l'inflammation sont utilisées comme traitement de la dépression chez des patients souffrant d'un DT2. Etant donné le potentiel bénéfice d'une amélioration concomitante du contrôle de la glycémie et des symptômes dépressifs, des approches anti-inflammatoires pour traiter la dépression chez des patients diabétiques sont attendues. ■

### Bibliographie

- Ryden L, Grant PJ, Anker SD et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013;34:3035-87.
- Castanon N, Luheshi G, Laye S. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci*. 2015;9:229.
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE et al. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2001;24:1069-78.
- Moulton CD, Pickup JC, Ismail K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:461-71.
- Lasselun J, Capuron L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21:95-101.
- Castanon N, Lasselun J, Capuron L. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:74.
- Cani PD, Ostro M, Geurts L et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012;3:279-88.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:46-56.
- Kalin S, Heppner FL, Bechmann I et al. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:339-51.
- Dinel AL, Andre C, Aubert A et al. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One*. 2011;6:e24325.
- Dinel AL, Andre C, Aubert A et al. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;40:48-59.
- Dey A, Hao S, Erion JR et al. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. *J Neuroimmunol*. 2014;269:20-7.
- Jow GM, Yang TT, Chen CL. Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. *J Affect Disord*. 2006;90:21-7.
- Lafrance V, Inoue W, Kan B et al. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain Behav Immun* 2010;24:358-65.
- Ghosemi R, Haeri A, Dargahi L et al. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol*. 2013;47:145-71.
- Scheen AJ, Esser N, Paquot N. Antidiabetic agents: Potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. *Diabetes Metab*. 2015;41:183-94.
- Huang HJ, Chen YH, Liang KC et al. Exendin-4 protected against cognitive dysfunction in hyperglycemic mice receiving an intrahippocampal lipopolysaccharide injection. *PLoS One*. 2012;7:e39656.



## ORIGINAL ARTICLE

## Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion

T Larrieu<sup>1,2</sup>, LM Hilal<sup>3,4</sup>, C Fourrier<sup>1,2</sup>, V De Smedt-Peyrusse<sup>1,2</sup>, Sans N<sup>3,4</sup>, L Capuron<sup>1,2</sup> and S Layé<sup>1,2</sup>

Understanding how malnutrition contributes to depression is building momentum. In the present study we unravel molecular and cellular mechanisms by which nutritional disturbances lead to impaired emotional behaviour in mice. Here we report that nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) deficiency induces a chronic stress state reflected by disrupted glucocorticoid receptor (GR)-mediated signalling pathway along with hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis hyperactivity. This hyperactivity in turn resulted in neuronal atrophy in the dorsolateral (dl)- and dorsomedial (dm)- prefrontal cortex (PFC) and subsequent mood-related behaviour alterations, similarly to chronic social defeat stress. Supplementation of n-3 PUFA prevented detrimental chronic social defeat stress-induced emotional and neuronal impairments by impeding HPA axis hyperactivity. These results indicate a role for dietary n-3 PUFA in the prevention of HPA axis dysfunction associated with the development of some neuropsychiatric disorders including depression.

*Translational Psychiatry* (2014) 4, e437; doi:10.1038/tp.2014.77; published online 9 September 2014

## INTRODUCTION

Compared with other organs, the brain is highly enriched in long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) including arachidonic acid (20:4n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) that are crucial to its normal development and function. In mammals, arachidonic acid and DHA are converted from their precursors, linoleic acid (LA, 18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), respectively.<sup>1</sup> LA and ALA are not synthesised *de novo* by mammals and are solely provided through diet to maintain sufficient brain levels of long-chain PUFAs. A compelling body of evidence suggests that anxiety and depressive disorders are linked to dietary lipids, especially the n-3 PUFAs.<sup>2-4</sup> Numerous clinical studies revealed that subjects with depressive symptoms and with social anxiety disorders display significant lower levels of n-3 PUFAs and higher ratio of n-6 to n-3 PUFAs in the blood and in the brain.<sup>2-4</sup> Supporting clinical observations, epidemiological lines of evidence have linked nutritional n-3 PUFA deficiency observed in industrialised countries<sup>5,6</sup> and the prevalence of mood disorders.<sup>7</sup> In animal models, it has been shown that transient or maternal n-3 PUFA-deficient diet induces depressive- and anxiety-like symptoms<sup>8-10</sup> as well as abnormal social behaviour<sup>11</sup> in adult offspring. However, mechanisms underlying the effects of n-3 PUFA-deficient diet on emotional behaviour remain largely unknown. Interestingly, similar behavioural impairments occur in mice after exposure to chronic social defeat stress, a well-characterised preclinical model of anxiety and depression.<sup>12-14</sup> Mechanisms of chronic stress-induced emotional behaviour deficits involve retraction of the apical dendritic tree pyramidal neurons in several brain regions such as the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus.<sup>15-18</sup> Moreover, the

hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis is directly involved in inducing anxiety- and depressive-like behaviour after chronic social defeat stress as shown by the enhancement in behavioural resiliency in mice adrenalectomised before social defeat.<sup>19</sup> This led us to an intriguing question regarding whether dietary n-3 PUFA deficiency-induced emotional impairments are due to HPA axis hyperactivity that induces neuronal atrophy in the PFC, similarly to chronic social defeat stress.

To answer this question, we first compared the effects of dietary n-3 PUFA deficiency to those of social defeat stress on emotional behaviour, morphology of PFC pyramidal neurons and HPA axis function in C57BL6/J mice. We then tested whether HPA axis malfunction is responsible for anxiety- and depressive-like behaviours observed in n-3-deficient mice by clamping HPA axis output through adrenalectomy. Finally, we tested the hypothesis that dietary n-3 PUFA-supplementation can preclude the occurrence of depression-like behaviour induced by chronic social defeat stress by impeding HPA axis hyperactivity. This part directly addresses the existing controversy regarding the benefits of a nutritional intervention in treating/preventing mood disorders.

## MATERIALS AND METHODS

## Animals

All experiments were performed according to criteria of the European Communities Council Directive (50120103-A). Behavioural and biochemical experiments were performed on C57BL6/J mice obtained from Charles River (Arbresle, France). Mice were maintained under standard housing conditions on corn cob litter in a temperature- (23 ± 1 °C) and humidity (40%) -controlled animal room with a 12-h light/dark cycle (0700–1900 hours), with *ad libitum* access to food and water. Retired CD1

<sup>1</sup>INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France; <sup>2</sup>Université de Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France; <sup>3</sup>INSERM, Neurocentre Magendie, UMR 862, Bordeaux, France and <sup>4</sup>Université de Bordeaux, Neurocentre Magendie, UMR 862, Bordeaux, France. Correspondence: Dr S Layé, 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, Bordeaux 33076, France.

E-mail: sophie.laye@bordeaux.inra.fr

Received 25 April 2014; revised 19 June 2014; accepted 22 July 2014

breeders used as the aggressors in the social defeat experiments were obtained from Charles River. All tests were conducted during the light period. C57BL6/J male mice were housed two per cage and maintained in a temperature- and humidity-controlled facility on a 12-h light dark cycle with food and water *ad libitum*. Mice were 3- to 4-month-old when the behavioural and biochemical analysis were conducted.

### Diets

C57BL6/J mice were given water and isocaloric experimental diets *ad libitum* (pellets prepared by UPAE-INRA, Jouy-en-Josas, France replaced daily) as previously described.<sup>11,20,21</sup> Pellets were stored at +4 °C, and fatty acid composition was regularly controlled via gas chromatography analyses of organic extracts from manufactured food pellets. Nutritional n-3 PUFA-deficiency experiments: after mating, C57BL6/J females were fed throughout gestation and lactation with a diet containing 6% of rapeseed oil (rich in  $\alpha$ -linolenic acid, 18:3n-3; the control diet) or 6% fat in the form of sunflower oil (rich in LA, 18:2n-6; the n-3-deficient diet). After weaning, male offsprings were fed with the same diet as their dam until the end of the experiments. Nutritional n-3 PUFA-supplementation experiment: C57BL6/J mice dams and their offsprings were kept on a standard diet (A04, 3.1% lipids, SAFE, Augy, France) until weaning of the pups. At the age of 3 weeks, male mice were assigned to the control diet or to a n-3 isocaloric supplemented diet containing 6% of tuna oil (rich in eicosapentaenoic acid 20:5n-3 and docosahexaenoic acid 22:6n-3, the n-3 supplemented diet) until they are 3-month-old (Supplementary Tables S1 and S2). This period of time was chosen on the basis of previous studies, showing that a 2-month supplementation with a diet enriched in tuna oil increases DHA levels in the brain.<sup>21</sup>

### Chronic social defeat stress

Social defeat was performed as previously described.<sup>12</sup> Briefly, intruder mice (control diet, n-3-deficient and n-3-supplemented) were exposed individually to an aggressive CD1 mouse for 5 min per day, during which they were attacked and displayed subordinate posturing. Each episode of stress was followed by 3 h 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. Undefeated mice were placed in pairs within a home cage set-up identical to that of the defeated mice, with one undefeated mice per side separated by a perforated Plexiglas divider for the duration of each sensory contact session. Twenty-four hours after the last episode of social defeat, we conducted social exploration test consisting of two consecutive sessions of 5 min. During the first session, the open field contained an empty wire mesh in the corner of the field. During the second session, a social target animal (unfamiliar CD1 male mouse) was introduced into the cage and active investigatory behaviour was recorded to assess social interaction. Forty-eight hours after the last session of stress, open-field test was performed to assess anxiety-like behaviour. The same animals were used for plasmatic corticosterone levels as well as morphological analyses. Basal condition groups are indicated as 'undefeated' and social defeat condition groups as 'defeated'. To avoid maximum suffering, social defeat was carried out with the minimum number of animals.

### Behavioural testing

For social exploration measurement, mice were transferred to a new cage (40 × 40 cm). A social exploration session comprised 5 min without target followed by 5-min exposure of an unfamiliar adult CD1 male enclosed in a wire mesh placed in the corner of the field. Number of active investigatory behaviour (mainly sniffing the anogenital region, mouth, ears, trunk and tail) was manually counted by an experimenter blind to the conditions.

Open-field test was performed as previously published.<sup>20</sup> Each animal was transferred to the open-field apparatus (40 × 40 cm) and was allowed to freely explore for 10 min the open field. A video tracking system (Smart, Panlab, Barcelona, Spain) recorded the exact track of each mouse as well as total distance travelled (cm) and time spent in the inner region (%).

For the forced swimming test, each mouse was individually placed into a dark-grey polyvinylchloride cylinder (15 cm in diameter, 30 cm high) half filled with water (25 ± 1 °C), so that it would neither reach the base nor the edge of the cylinder. The water was changed between subjects. The amount of swimming during the 6-min test was used as an index of despair-like behaviour. Videotaped behaviours of mice in the forced swimming test were scored by using a time sampling technique to rate the predominant behaviour over a 10-s interval.<sup>20</sup> An animal was considered to

be immobile when it made only minimal movements to keep its head above water.

### Pharmacological experiments

To examine the role of endogenous corticosterone in the behavioural, morphological and biochemical changes measured in n-3-deficient mice, corticosterone deficiency was created by adrenalectomy and low corticosterone replacement or metyrapone pretreatment.

**Surgery and chronic low corticosterone replacement.** For corticosterone replacement experiment, bilateral adrenalectomy (Adx) was performed under isoflurane anaesthesia on 8-week-old control and n-3-deficient mice ( $n=6-8$  mice per group). Sham-operated animals were subjected to anaesthesia and bilateral laparotomy. Immediately after the surgery, adrenalectomised mice received corticosterone (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in 0.9% saline and 2% absolute ethanol) through drinking water for 4 weeks. This intervention has previously been used to both lower and normalise corticosterone levels as well as to mimic the normal circadian pattern of corticosterone secretion.<sup>19,22,23</sup> Emotional behaviour, neuronal dendritic arborisation within the PFC as well as plasma corticosterone levels were then analysed as described above.

**Metyrapone treatment.** Metyrapone (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) is a corticosterone synthesis inhibitor<sup>24</sup> that incompletely blocks glucocorticoid synthesis. It was administered as an acute treatment to avoid HPA axis adaptation to the drug over the course of a chronic treatment. N-3-deficient mice received a single intraperitoneal injection of drug dissolved in saline (0.9% NaCl, 75 mg per kg; 0.1 ml per 10 g) or 0.9% NaCl in control condition, 90 min before the forced swimming test, which is known to be sensitive to acute treatment.

### Plasmatic corticosterone analysis

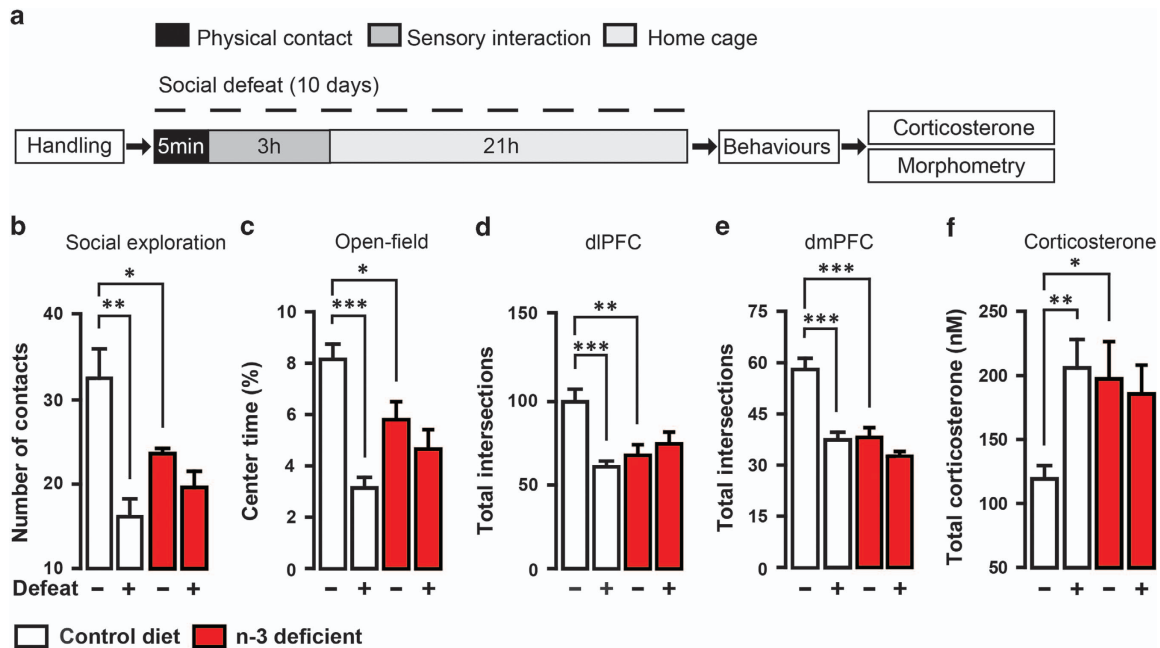
Trunk blood collection in ethylenediaminetetraacetic acid-lined tubes (EDTA) was performed during diurnal rise period, previously determined to occur 60 min before lights off.<sup>25</sup> Corticosterone was measured with an in-house radioimmunosorbent assay in the plasma as previously described.<sup>25</sup> Briefly, after steroid extraction with absolute ethanol, total corticosterone was measured by competition between cold corticosterone (B) and <sup>3</sup>H-B (B\*) by a specific anticorticosterone antibody provided by Dr H Vaudry (University of Rouen, France). We conducted corticosterone analysis 2 weeks after the last session of social defeat in order to validate our model of social defeat previously reported to produce long-lasting effects on several physiological parameters and behaviours.

### Morphological analysis

Brains were quickly removed, washed in phosphate-buffered saline and processed for staining of individual neurons following the manufacturer's instructions for the rapid Golgi kit (FD Neurotech, Columbia, MD, USA). Golgi-stained brain slices of 100  $\mu\text{m}$  containing the dorsal PFC were used for morphological analysis. Pyramidal neurons of PFC II/III layers have been repeatedly characterized as those exhibiting remodelling in response to chronic stress<sup>16</sup> and, therefore, were chosen for morphological analysis in our study. The dorsal PFC can be divided into dorsolateral PFC including frontal association (FrA) cortex (from 2.58 to 3.08 mm anterior to bregma); and dorsomedial PFC including prelimbic cortex (from 1.5 to 2.3 mm anterior to bregma). Three to six neurons per mouse and per region were reconstructed by a trained experimenter blind to the conditions using a Leica (Westar, Germany) and a Zeiss microscope Axio Imager 2 (x100) (Lena, Germany) and analysed using the NeuroLucida software (Micro Bright Field Europe, Magdeburg, Germany). Morphological analyses were conducted 2 weeks after the last session of social defeat.

### Western blot analysis

Another batch of n-3-deficient and control diet mice was used for western blot measurement performed as previously described.<sup>11,20</sup> PFC and hippocampus were homogenised in lysis buffer (TRIS 20 mM pH 7.5, anti-protease cocktail, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM dithiothreitol, 0.5 M EDTA, 1 mM NaOV, 1 mM NaF). After centrifugation, protein concentration was determined using a BCA assay kit (Uptima, Montlucon, France). Equal amounts of proteins (50  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto SDS-PAGE gel (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated overnight (4 °C) with anti-GR (glucocorticoid



**Figure 1.** Dietary n-3 PUFA deficiency induces chronic stress phenotype in mice. (a) Experimental timeline. Control diet (white) and n-3-deficient (red) mice were repeatedly (10 days) submitted to bouts of social defeat before behavioural tests (social exploration and open-field test). Undefeated n-3-deficient mice showed (b) reduced number of contact in social exploration (interaction:  $F_{1,17} = 7.413$ ,  $P = 0.01$ , two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ , Bonferroni's test,  $n = 5-6$  per group), (c) reduced percentage of time spent in the centre of an open-field (interaction:  $F_{1,17} = 9.268$ ,  $P < 0.01$ , two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 5-6$  per group), (d, e) simplification of apical dendritic tree on pyramidal neurons of the dIPFC (interaction:  $F_{1,59} = 11.57$ ,  $P < 0.001$ , two-way ANOVA;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 15$  neurons per group) and dmPFC (interaction:  $F_{1,78} = 12.03$ ,  $P < 0.01$ , Two-way ANOVA;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 20$  neurons per group) and (f) total corticosterone elevation (interaction:  $F_{1,17} = 5.592$ ,  $P < 0.05$ , two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ , Bonferroni's test,  $n = 5-6$  per group). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m.

receptor; M-20; 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-MR (mineralocorticoid receptor; H-300; 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-BDNF (1:5000, Abcam, Cambridge, UK), anti-FKBP51 (1:500, Santa Cruz Biotechnology) and anti-actin (1:2500, Sigma, Saint Louis, MA, USA). After washing, membranes were incubated 1h with rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000, Jackson Immuno Research laboratories, Westgrove, PA, USA). 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, USA). Chemiluminescence was captured and quantified using the gene Tools software (Syngene, Cambridge, UK).

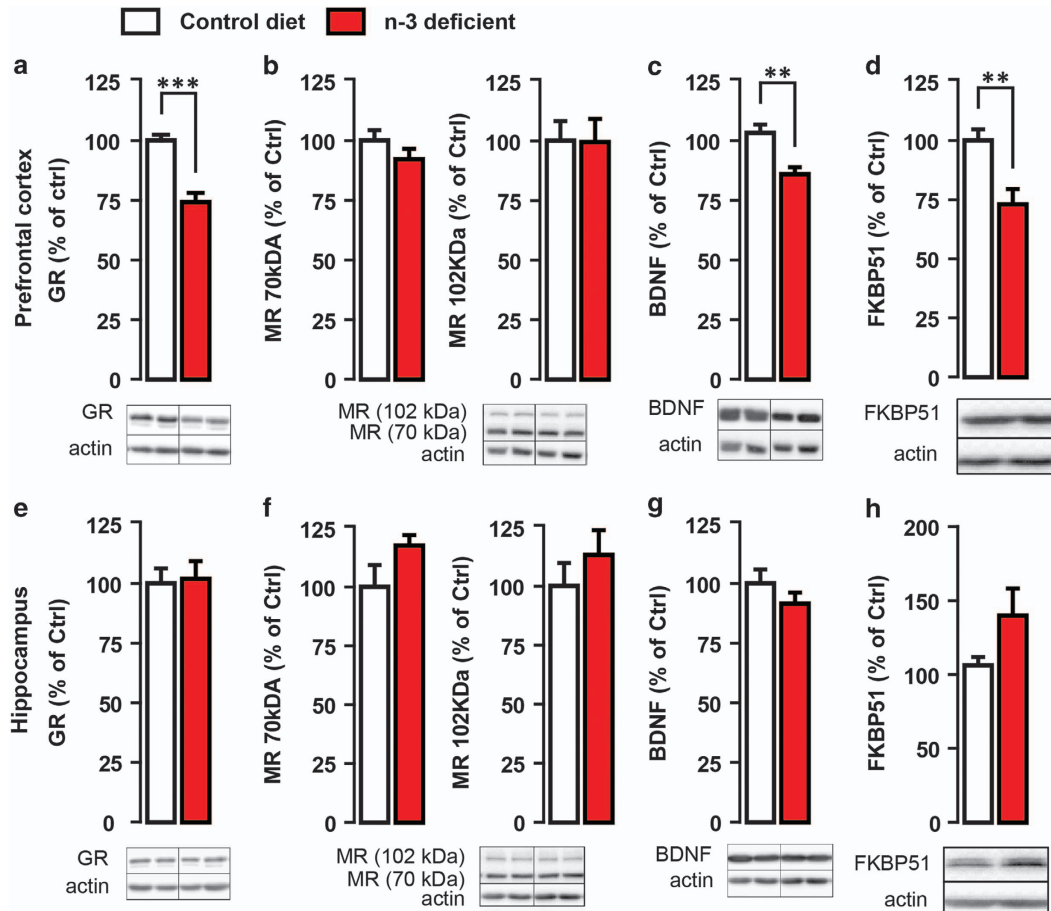
#### Statistical analyses

All values are given as mean  $\pm$  s.e.m. Results obtained in social defeat experiments (behavioural tests, neuronal arborisation and corticosterone analysis) were all analysed by a two-way analysis of variance (ANOVA), with social defeat stress and diet as fixed factors. In Metyrapone experiment (locomotor activity and forced swimming test), treatment and diet were established as fixed factors. Analyses were followed by the Bonferroni *post hoc* test when appropriate. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) were calculated to establish relationships between neuronal arborisation in the dIPFC, dmPFC and respective corticosterone plasma levels. Results obtained in Adx experiments (behavioural tests, neuronal arborisation and corticosterone analysis) were all analysed by an unpaired *t*-test. Results obtained in western blot experiments (GR, MR, BDNF and FKBP51 expression) were all analysed by an unpaired *t*-test. All statistical tests were performed with GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA) using a critical probability of  $P < 0.05$ . Statistical analyses performed for each experiment are summarised in each legends of figures with the chosen statistical test,  $n$  and  $P$ -values, as well as degree of freedom and  $F/t$  values.

#### RESULTS

##### Experiment 1: dietary n-3 PUFA-deficiency induces chronic stress phenotype in mice

We first compared the effects of dietary n-3 PUFA deficiency to those of social defeat stress on emotional behaviour, morphology of PFC pyramidal neurons and HPA axis function in C57BL/6J mice (Figure 1a). Undefeated n-3-deficient mice displayed a decrease in the number of active exploration of an unfamiliar mouse and in the time spent exploring the centre of an open-field compared with undefeated control diet mice (Figures 1b and c). This is consistent with previous reports from our group<sup>11,20</sup> showing that undefeated n-3-deficient mice do not engage socially with unfamiliar mice and exhibit anxiety-like behaviour. Dietary n-3 PUFA deficiency alone induced emotional impairment that was similar to the one observed following social defeat stress. We next used Golgi Cox staining to evaluate dendritic arborisation of pyramidal neurons within the layer II/III of the dIPFC and dmPFC (Supplementary Figure S1). Apical dendritic trees of both dIPFC and dmPFC pyramidal neurons displayed decreased number of intersections in undefeated n-3-deficient mice compared with undefeated control diet mice (Figures 1d and e). Interestingly, neuronal atrophy in undefeated n-3-deficient mice was similar to that observed in defeated control diet mice. These effects were specific to apical dendrites as complexity of basal dendrites was not altered in any of the experimental groups (Supplementary Figure S2). We also measured HPA axis activity and found that n-3 PUFA deficiency induced a significant increase in plasma corticosterone levels in undefeated n-3-deficient mice compared with undefeated control diet mice (Figure 1f). Similar increase in basal corticosterone levels was found in undefeated n-3-deficient mice and defeated control diet mice. In addition, we observed an inverse correlation between plasma corticosterone levels and the number of apical dendritic intersections in the dIPFC and dmPFC



**Figure 2.** Glucocorticoid receptors (GR) and GR targets expression is impaired in the PFC of n-3-deficient mice. GR, MR, FKBP51 and BDNF proteins expression was measured with western blot analysis in the PFC and the hippocampus of control diet (white) and n-3-deficient mice (red). n-3-deficient mice showed (a) a marked downregulation of GR expression within the PFC as compared with control diet mice ( $t_{11}=5.659$ ,  $***P < 0.0001$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6-7$  per group). (b) There was no significant effect of n-3 PUFA-deficient diet on either the 70-kDa MR ( $t_{12}=1.274$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=7$  per group) or the 102-kDa MR ( $t_{12}=0.05060$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=7$  per group) expression within the PFC. GR-dependent target (c) BDNF and (d) FKBP51 expression was significantly reduced in the PFC of n-3-deficient mice as compared with control diet mice ( $t_{10}=3.671$ ,  $**P < 0.01$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6$  per group and  $t_{10}=3.351$ ,  $**P < 0.01$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6$  per group, respectively). There was no effect of dietary n-3 PUFA deficiency on the expression of (e) GR ( $t_{11}=0.1953$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6-7$  per group), (f) 70-kDa MR ( $t_{12}=1.599$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=7$  per group), 120-kDa MR ( $t_{10}=0.8858$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6$  per group), (g) GR-dependent target BDNF ( $t_{11}=1.097$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=6-7$  per group) and (h) FKBP51 ( $t_8=1.730$ ,  $P > 0.05$ , unpaired  $t$ -test,  $n=5$  per group) in the hippocampus as compared with control diet. Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m.

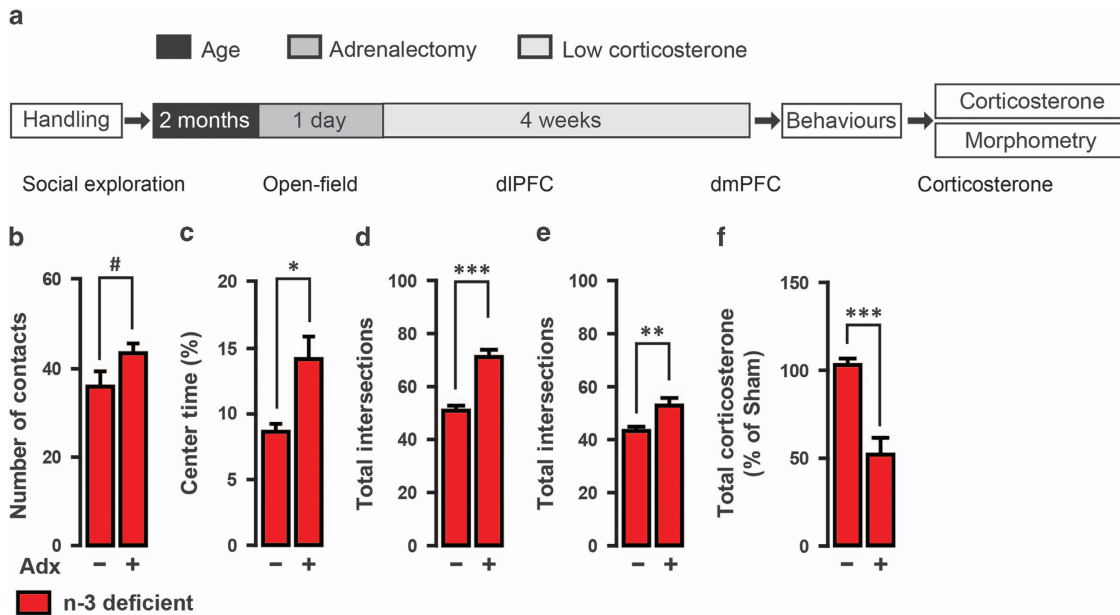
(Supplementary Figure S3). Importantly, social defeat did not induce further modifications of emotional behaviour, neuronal morphology or corticosterone levels in n-3-deficient mice (Figures 1b–f). This suggests that dietary n-3 PUFA deficiency induces a state of chronic stress that is identical to chronic social defeat stress.

High corticosterone levels in n-3-deficient mice prompted us to further investigate the expression of its receptors (GR and MR) as well as the GR-responsive target BDNF and FKBP51. We observed that exposure to dietary n-3 PUFA deficiency not only affected corticosterone secretion but also disturbed GR-mediated signalling pathway in PFC (Figure 2). Precisely, expressions of GR (Figure 2a) and GR-responsive genes, that is, BDNF (Figure 2c) and FKBP51 (Figure 2d), were downregulated specifically in PFC but not in the hippocampus (Figures 2g and h) of n-3-deficient versus control diet mice. No significant change was revealed in both 70- and 102-kDa MR expressions in the PFC (Figure 2b) or HC (Figure 2f) whatever the group. Collectively, these results show that dietary n-3 PUFA deficiency alone induces neuronal atrophy in the PFC and HPA axis hyperactivity similarly to social defeat stress.

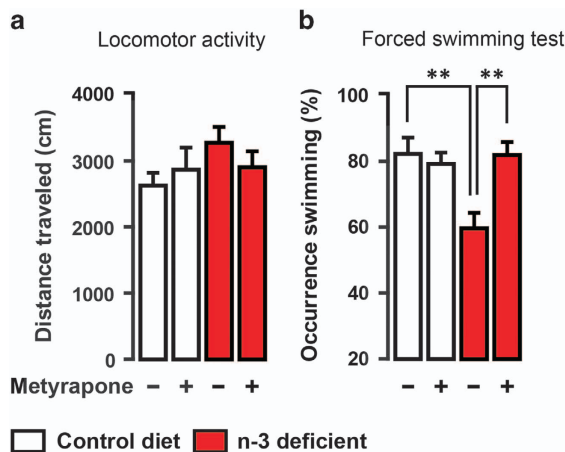
**Experiment 2: Dietary n-3 PUFA deficiency induces chronic stress phenotype through HPA axis hyperactivity**

To test whether HPA axis hyperactivity is responsible for dietary n-3 PUFA deficiency-induced emotional impairment, we clamped the HPA axis output by adrenalectomy followed by low corticosterone replacement<sup>19</sup> (Adx groups; Figure 3a). In the absence of high corticosterone levels, Adx n-3-deficient mice exhibited an increase in the number of social exploration and in the time spent exploring the centre of an open field compared with sham-operated n-3-deficient mice. In addition, complexity of neuronal arborisation in the dlPFC and dmPFC was higher in Adx n-3-deficient mice than sham-operated n-3-deficient mice (Figures 3b–e). Adrenalectomy and low corticosterone replacement maintained plasma corticosterone levels in Adx n-3-deficient mice at 50% lower than those measured in sham-operated n-3-deficient mice (Figure 3f). No effect of Adx and low corticosterone replacement was found in control diet mice on all the parameters measured (Supplementary Figure S4). Furthermore, acute administration of a corticosterone synthesis blocker, Metyrapone, reversed despair-like behaviour previously reported in n-3-deficient mice using the forced swimming test<sup>11,20</sup> (Figure 4).





**Figure 3.** Dietary n-3 PUFA deficiency induces chronic stress phenotype through HPA axis hyperactivity. (a) Experimental timeline. n-3-deficient mice (2-month-old) were bilaterally adrenalectomised (Adx) or sham-operated. Adx mice were provided low dose ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) of corticosterone for 4 weeks before behavioural measurements. (b) Adx n-3-deficient mice increased the number of contacts in social exploration ( $t_{13} = 1.855$ ,  $^{\#}P < 0.09$ , unpaired *t*-test,  $n = 7-8$  per group) and (c) the percentage of time spent in the centre of an open field ( $t_{13} = 2.319$ ,  $^*P < 0.05$ , unpaired *t*-test,  $n = 7-8$  per group). Total apical dendritic intersections of (d) dIPFC ( $t_{52} = 5.287$ ,  $^{***}P < 0.001$ , unpaired *t*-test,  $n = 27$  neurons per group) and (e) dmPFC ( $t_{43} = 2.983$ ,  $^{**}P < 0.01$ , unpaired *t*-test,  $n = 22$  neurons per group) pyramidal neurons were increased in Adx n-3-deficient mice. (f) Adx n-3-deficient mice with corticosterone replacement showed an expected reduction of plasma corticosterone levels ( $t_8 = 5.586$ ,  $^{***}P < 0.001$ , unpaired *t*-test,  $n = 5$  per group). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m.



**Figure 4.** Corticosterone synthesis inhibitor blunts depressive-like behaviour in forced swimming test in n-3-deficient mice. n-3-deficient mice displayed (b) reduced swimming occurrence as compared with control diet mice. Metyrapone administration ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 90 min before forced swimming test prevented depressive-like behaviour in n-3-deficient mice (interaction:  $F_{1,27} = 7.486$ ,  $P < 0.05$ , two-way ANOVA;  $^{**}P < 0.01$ , Bonferroni's test,  $n = 7-8$  per group) that was not due to (a) locomotor activity changes (interaction:  $F_{1,27} = 1.407$ ,  $P > 0.05$ , diet effect:  $F_{1,27} = 1.795$ ,  $P > 0.05$ , treatment effect:  $F_{1,27} = 0.06567$ ,  $P > 0.05$ , two-way ANOVA,  $n = 7-8$  per group). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m.

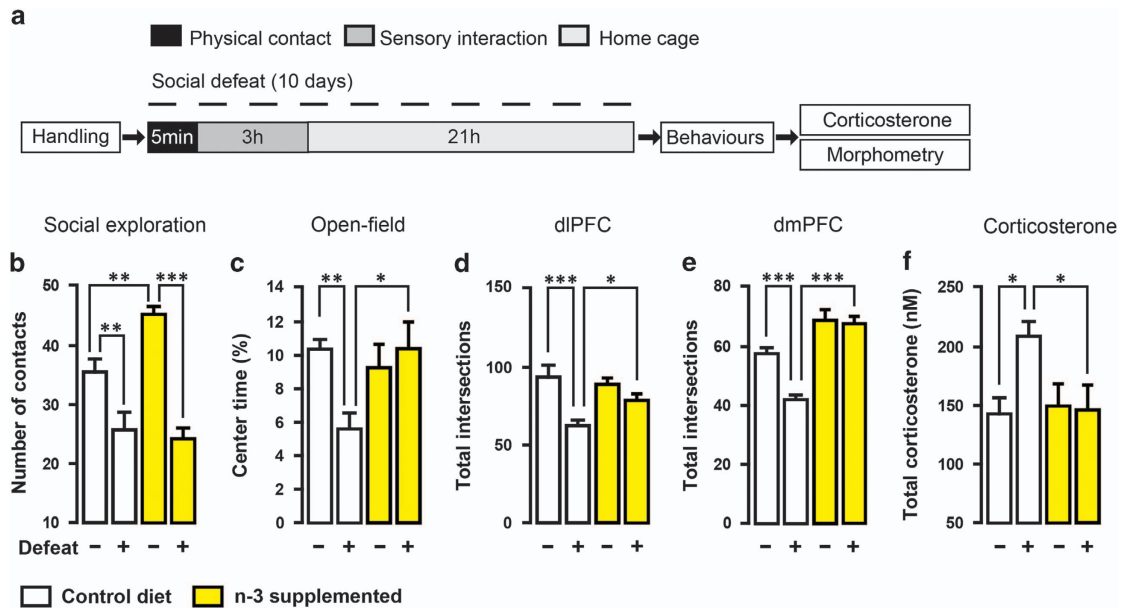
These data demonstrate that dietary n-3 PUFA deficiency leads to emotional and neuronal impairments through chronic adrenal activation.

### Experiment 3: dietary n-3 PUFA supplementation prevents chronic stress phenotype in mice

As we show that both social defeat stress and dietary n-3 PUFA deficiency induce HPA axis hyperactivity, we wondered whether n-3 PUFA supplementation that normalises HPA axis activity in chronically stressed rats<sup>26</sup> could attenuate the effects of chronic social defeat stress on emotional behaviour (Figure 5a). Increase in corticosterone levels after defeat in control diet mice was completely prevented by chronic dietary n-3 PUFA supplementation (Figure 5f). Although chronic dietary n-3 PUFA supplementation failed to reduce social avoidance after defeat (Figure 5b), it was sufficient to attenuate social defeat-induced anxiety-like behaviour (Figure 5c). Moreover, complexity of neuronal dendrites in both dIPFC and dmPFC of defeated n-3-supplemented mice was similar to that observed in undefeated n-3-supplemented mice (Figures 5d and e). Collectively, after social defeat stress, n-3-supplemented mice showed significant resilience to the effects of social defeat on behaviour, dendritic arborisation in the PFC and HPA axis activity. Hence, it is possible to attenuate chronic stress-induced emotional impairment through n-3 PUFA supplementation that prevents HPA axis hyperactivity and neuronal atrophy in the PFC.

### DISCUSSION

During the industrial era, the rapid expansion of Western countries has been associated with a huge shift in the ratio of dietary PUFAs leading to n-3 PUFA deficiency and a high ratio of n-6 to n-3 PUFAs. Nutritional n-3 PUFA deficiency has been associated with many diseases, including mood disorders in Western countries. In the present study we unravel molecular and cellular mechanisms by which nutritional disturbances lead to impaired emotional behaviour in mice. First, we report that nutritional n-3 PUFA deficiency, such as chronic social defeat stress, induces detrimental morphofunctional changes inducing a chronic stress state.



**Figure 5.** Dietary n-3 PUFA supplementation prevents chronic stress phenotype in mice. **(a)** Experimental timeline. Social defeat was conducted once a day for 10 days before behaviours on control diet (white) and n-3-supplemented (yellow) mice. n-3 PUFA supplementation **(b)** failed to reduce number of social exploration (interaction:  $F_{1,30} = 6.305$ ,  $P = 0.0177$ , two-way ANOVA;  $***P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 8-9$  per group) but prevented **(c)** anxiety-like behaviour induced by social defeat (interaction:  $F_{1,30} = 6.012$ ,  $P < 0.05$ , Two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ , Bonferroni's test,  $n = 8-9$  per group), **(d, e)** simplification of apical dendritic tree on pyramidal neurons of the dIPFC (interaction:  $F_{1,54} = 4.201$ ,  $P < 0.05$ , two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 14$  neurons per group) and dmPFC (interaction:  $F_{1,60} = 7.260$ ,  $P < 0.01$ , two-way ANOVA;  $***P < 0.001$ , Bonferroni's test,  $n = 16$  neurons per group) and **(f)** total corticosterone elevation (interaction:  $F_{1,24} = 4.144$ ,  $P = 0.05$ , two-way ANOVA;  $*P < 0.05$ , Bonferroni's test,  $n = 7$  per group). Data are displayed as mean  $\pm$  s.e.m.

Second, our data provide clear evidence that n-3 PUFA deficiency induces HPA hyperactivity, reflected by plasma corticosterone elevation that leads to neuronal atrophy in PFC and emotional alterations. Third, we showed that dietary n-3 PUFA supplementation induces resilience to the effects of chronic social defeat stress on emotional behaviours by preventing HPA axis hyperactivity and neuronal atrophy in PFC. This finding provides new arguments in favour of the hypothesis suggesting that increased dietary intake of n-3 PUFAs may be of benefit in treating mood and anxiety disorders.<sup>27</sup>

By submitting mice to a long-term dietary n-3 PUFA deficiency, we were able to reproduce several behavioural and cellular phenotypes that have been frequently described after exposure to chronic social defeat stress.<sup>12,18,28</sup> We found in experiment 1 that n-3 PUFA-deficient diet alone disturbed social behaviour as well as increased anxiety-related behaviour in an open-field test. Our data agree with previous reports showing that transient or maternal dietary n-3 PUFA deficiency induces the development of anxiety- and depressive-like behaviours along with abnormal social interaction in both rats and mice.<sup>8-11,20,29</sup> Interestingly, undefeated n-3-deficient mice exhibited a behavioural phenotype comparable to that of mice exposed to chronic social defeat stress. To investigate cellular mechanisms, we focused our attention on the dendritic arborisation of pyramidal neurons within the layer II/III of the dIPFC and dmPFC for analysis of the effects of n-3 PUFA deficiency on neuronal morphology. The PFC is normally implicated in executive tasks and reward and has recently been proposed to be involved in emotional behaviour and the pathophysiology of depression.<sup>30,31</sup> To our knowledge, this is the first study reporting a drastic decrease in the apical but not basal dendritic complexity, reflected by a decreased number of total intersections in the PFC, following long-term n-3 PUFA deficiency in mice. This finding is in line with previous reports in which neurite growth and synaptogenesis are decreased in the brain of n-3 PUFA-deprived mice,<sup>32</sup> although promoted by DHA *in vitro*.<sup>33</sup> Moreover, previous studies have shown that chronic

stress reduces apical but not basal dendritic arborisation complexity of pyramidal neurons in layer II/III of the PFC.<sup>15-17,34-36</sup>

The mechanism by which chronic stress leads to dendritic simplification has been demonstrated to involve the action of corticosterone.<sup>35,37</sup> In this study, we showed that HPA axis activity was severely disrupted after exposure to dietary n-3 PUFA deficiency, in a similar way to chronic stress. We reported an increase in plasma corticosterone release and downregulation of GR and their downstream targets: BDNF and FKBP51 following n-3 PUFA deficiency. Such a decrease in GR expression in the brain could be linked to high corticosterone levels observed in n-3-deficient mice as previous studies have shown that corticosterone regulates GR expression in the PFC. Accordingly, Adx-induced upregulation of GR expression in the PFC of rats is downregulated by 1 week of corticosterone administration.<sup>38</sup> In addition, defective GR signalling increases anxiety-like behaviour and reduces FKBP51 expression in the cortex,<sup>39</sup> supporting our results. In addition, a recent study in a clinical cohort has demonstrated a link between FKBP51 and stress-related psychiatric disorders.<sup>40</sup> Our results further support previous data showing decreased expression of BDNF in the PFC of rats deprived of n-3 PUFAs for 15 weeks.<sup>41</sup> Recent data have elegantly linked BDNF and HPA axis activity by using knock-in mice for BDNF(met) polymorphism originally identified in depressed patients.<sup>42,43</sup> Indeed, heterozygous BDNF(+/Met) mice display HPA axis hyper-reactivity as well as increased anxiety- and depressive-like behaviours. GR signalling and BDNF have a crucial role in neuronal plasticity including axonal growth neurite maturation and neuronal activity. They have been postulated to be key mediators of stress-induced neuronal atrophy in the PFC.<sup>44-46</sup> Finally, we aim in future studies to examine neuronal morphology in a control structure, the hippocampus, in which no change was observed in GR and GR-target genes expression in n-3-deficient mice. If no change in dendritic arborisation is found in hippocampal pyramidal neurons, this would strongly suggest that GR sensitivity is closely associated with neuronal atrophy in n-3-deficient mice.

In our study, we observed that chronic social defeat stress did not induce further modifications of emotional behaviour, neuronal morphology or corticosterone levels in n-3-deficient mice, supporting the idea that these mice are under a state of chronic stress. Taken together, these data suggest that n-3 PUFA brain contents modulate neuronal morphology in PFC along with depressive- and anxiety-related behaviours similarly to chronic social defeat stress through corticosterone secretion. In support of this hypothesis, we observed an inverse correlation between plasma corticosterone levels and the number of apical dendritic intersections in the dIPFC and dmPFC. In addition, repeated administration of corticosterone in rodents is known to reduce the dendritic arborisation of apical pyramidal neurons within the PFC along with altered emotional behaviour.<sup>37,47</sup> We also established a causal link between n-3 deficiency-induced morphofunctional changes and HPA axis hyperactivity by clamping corticosterone secretion in n-3-deficient mice. We demonstrated that Adx and low corticosterone replacement in n-3-deficient mice improved both social interaction and anxiety-like behaviour as compared with Sham-operated n-3-deficient mice. These findings are consistent with previous studies showing that Adx improves behavioural impairment in mice exposed to chronic social defeat stress.<sup>19</sup> Moreover, we showed that corticosterone synthesis inhibition following treatment with Metyrapone prevented depressive-like behaviour by increasing the occurrence of swimming in n-3-deficient mice evaluated in the FST as compared with saline n-3-deficient mice. These findings demonstrate that normalising HPA activity either by Adx or Metyrapone is associated with significant behavioural enhancement in various tests assessing anxiety- and depressive-like behaviours. We further revealed that elevated corticosterone in n-3-deficient mice is responsible for pyramidal neuron arborisation atrophy within the PFC as Adx n-3-deficient mice displayed enhancement of apical dendritic arborisation. Altogether, data in experiment 2 provide clear evidence that nutritional n-3 PUFA deficiency induces chronic adrenal activation that leads to neuronal atrophy in the dIPFC and dmPFC and mood-related behaviour alteration.

Although mechanisms by which n-3 PUFA deficiency induces HPA axis hyperactivity remain largely unexplored, the relationship between n-3 PUFA deficiency and the endocannabinoid (eCB) system is indicated. Molecularly, the two principal eCBs, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, are signalling lipids produced from membrane long-chain PUFAs.<sup>48</sup> The eCB system has emerged as a fundamental regulator of HPA axis negative feedback and an important modulator of emotional behaviour.<sup>49</sup> In our recent studies, we found that nutritional n-3 PUFA deficiency ablates long-term synaptic depression mediated by eCB in the mPFC via a desensitisation of the cannabinoid type 1 receptor (CB1).<sup>11</sup> Moreover, the effect of the CB1 agonist WIN55,212-2 in anxiety-like behaviour is abolished and the CB receptor signalling pathways are altered in the PFC of n-3-deficient mice.<sup>20</sup> One hypothesis is that HPA axis hyperactivity observed in n-3-deficient mice in this study is due to the reduction of CB1 receptor function in the PFC of these mice.

Experiment 3 shows that chronic n-3 PUFA supplementation prevents detrimental chronic stress-induced emotional and neuronal impairments by impeding HPA axis hyperactivity. This experiment provides a stronger causal link between dietary n-3 PUFAs and a chronic stress mechanism (HPA axis hyperactivity) regarding the occurrence of mood-related behaviours. These findings support data suggesting that n-3 PUFA supplementation can preclude the occurrence of depression-like behaviour induced by chronic stress by acting on HPA axis.<sup>26</sup> Numerous clinical studies revealed that subjects with depressive symptoms and/or with social anxiety disorders display significantly lower levels of n-3 PUFAs (mainly ALA, EPA and DHA) in the blood and/or in the brain<sup>2-4,50</sup> as compared to non-depressed subjects or subjects with mild symptoms.<sup>51</sup> This part of our work addresses an

important question regarding the prevention of depression through dietary n-3 PUFA intake. Indeed, our data create a very strong argument for a prophylactic effect of n-3 supplementation<sup>52,53</sup> by acting on HPA axis and neuronal morphology. In line with our results, chronic n-3 PUFA supplementation with fish oil rich in EPA and DHA in healthy humans prevents adrenal activation elicited by a mental stress<sup>54</sup> or by inflammatory stimuli<sup>55</sup> as compared with control. In addition, n-3 supplementation reduces anxiety symptoms among healthy young adults.<sup>56</sup> Taken together, these data reinforce the idea that n-3 PUFA supplementation can be efficient as an early prevention for subjects at high risk for mood disorders, including anxiety and depression.<sup>57</sup>

Protective effect of long-chain n-3 PUFAs could be linked to hippocampal neurogenesis (recently reviewed in Zainuddin *et al.*<sup>58</sup>). N-3 PUFAs have been associated with changes in hippocampal neurogenesis in several rodent models.<sup>32,59-61</sup> In addition, changes in hippocampal neurogenesis and cell survival in the dentate gyrus have been correlated with depressive-like behaviour. Interestingly, a recent study demonstrated that clamping glucocorticoid levels prevent chronic social defeat-induced decreases in neurogenesis and depressive-like behaviour in WT mice, but not in mice with a genetic ablation of neurogenesis.<sup>19</sup> This is particularly relevant to our results showing that long-chain n-3 PUFA supplementation prevents chronic social defeat-induced HPA axis deregulation. However, whether the beneficial effect of n-3 PUFAs on glucocorticoids and mood is dependent on neurogenesis remains to be evaluated.

In conclusion, this is the first report providing evidence that long-term dietary n-3 PUFA deficiency induces a chronic stress state marked by emotional alterations that are due to HPA axis hyperactivity and cortical neuronal atrophy. Moreover, these data demonstrate that chronic dietary n-3 PUFA supplementation prevents detrimental chronic stress-induced emotional and neuronal impairments by impeding HPA axis hyperactivity. Our study presents dietary n-3 PUFAs as a potential tool in the prevention of neuropsychiatric disorders associated with HPA axis dysfunction such as depression and anxiety.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially supported by INRA, FRM, ANR MoodFood and the Region Aquitaine. TL was the recipient of a postdoctoral fellowship from the 'société française de nutrition (SFN)' and the Labex BRAIN. The authors declare no competing financial interests. We thank P Birac, C Tridon and M Cadet of the animal facility, the Dr N Abrous and Dr M Koehl for the NeuroLucida software as well as the Dr N Arvy for adrenalectomy surgery. We also thank the 'Biochemistry Platform' of the SFR Neuroscience funded by the Labex BRAIN. We thank Dr G Ferreira, Professor M Darnaudéry and Dr MP Moisan for helpful and fruitful discussions. We Dr A Panatier for her valuable suggestion and advice and Dr C Murphy for correcting the English text of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1486**: 219-231.
- 2 Adams PB, Lawson S, Sanigorski A, Sinclair AJ. Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 1996; **31**: S157-S161.
- 3 Green P, Hermesh H, Monselise A, Marom S, Presburger G, Weizman A. Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; **16**: 107-113.
- 4 McNamara RK, Liu Y. Reduced expression of fatty acid biosynthesis genes in the prefrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 2011; **129**: 359-363.



- 5 Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002; **56**: 365–379.
- 6 Simopoulos AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet* 2009; **100**: 1–21.
- 7 Hibbeln JR. Fish consumption and major depression. *Lancet* 1998; **351**: 1213.
- 8 Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* 2000; **41**: 473–480.
- 9 DeMar JC, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI. One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 2006; **47**: 172–180.
- 10 Bondi CO, Taha AY, Tock JL, Totah NKB, Cheon Y, Torres GE et al. Adolescent behavior and dopamine availability are uniquely sensitive to dietary omega-3 fatty acid deficiency. *Biol Psychiatry* 2014; **75**: 38–46.
- 11 Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I et al. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 2011; **14**: 345–350.
- 12 Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 2006; **311**: 864–868.
- 13 Krishnan V, Han M-H, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 2007; **131**: 391–404.
- 14 Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF et al. IκB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci* 2011; **31**: 314–321.
- 15 Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ et al. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 2009; **325**: 621–625.
- 16 Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS. Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex* 2011; **21**: 2056–2064.
- 17 Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 2004; **125**: 1–6.
- 18 Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B et al. Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci* 2011; **31**: 12889–12899.
- 19 Lehmann ML, Brachman RA, Martinowich K, Schloesser RJ, Herkenham M. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. *J Neurosci* 2013; **33**: 2961–2972.
- 20 Larrieu T, Madore C, Joffre C, Layé S. 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* 2012; **68**: 671–681.
- 21 Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Grégoire S et al. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS ONE* 2012; **7**: e36861.
- 22 Stranahan AM, Arumugam T V, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 2008; **11**: 309–317.
- 23 Jacobson L, Akana SF, Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. Circadian variations in plasma corticosterone permit normal termination of adrenocorticotropic responses to stress. *Endocrinology* 1988; **122**: 1343–1348.
- 24 Child DF, Burke CW, Burley DM, Rees LH, Fraser TR. Drug controlled of Cushing's syndrome. Combined aminoglutethimide and metyrapone therapy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976; **82**: 330–341.
- 25 Richard EM, Helbling J-C, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 2010; **151**: 649–659.
- 26 Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P et al. Chronic ω-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* 2011; **219**: 116–122.
- 27 Sublette ME, Ellis SP, Geant AL, Mann JJ. Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression. *J Clin Psychiatry* 2011; **72**: 1577–1584.
- 28 Hartmann J, Wagner K V, Liebl C, Scharf SH, Wang X-D, Wolf M et al. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology* 2012; **62**: 332–339.
- 29 Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res* 2003; **964**: 136–143.
- 30 Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008; **455**: 894–902.
- 31 Nestler EJ, Carlezon WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 2006; **59**: 1151–1159.
- 32 Cao D, Kevala K, Kim J, Moon H-S, Jun SB, Lovinger D et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 2009; **111**: 510–521.
- 33 Calderon F, Kim H-Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2004; **90**: 979–988.
- 34 Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 2012; **37**: 39–47.
- 35 Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2005; **15**: 1714–1722.
- 36 Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR et al. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci* 2006; **26**: 7870–7874.
- 37 Liu R-J, Aghajanian GK. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 359–364.
- 38 Meaney MJ, Aitken DH. [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 1985; **328**: 176–180.
- 39 Godavathi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR. Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 1824–1834.
- 40 Fani N, Gutman D, Tone EB, Almlil L, Mercer KB, Davis J et al. FKBP5 and attention bias for threat: associations with hippocampal function and shape. *JAMA Psychiatry* 2013; **70**: 392–400.
- 41 Rao JS, Ertley RN, Lee H-J, DeMar JC, Arnold JT, Rapoport SI et al. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 2007; **12**: 36–46.
- 42 Wichers M, Kenis G, Jacobs N, Myin-Germeys I, Schruers K, Mengelers R et al. The psychology of psychiatric genetics: evidence that positive emotions in females moderate genetic sensitivity to social stress associated with the BDNF Val-sup-6-sup-6Met polymorphism. *J Abnorm Psychol* 2008; **117**: 699–704.
- 43 Yu H, Wang D-D, Wang Y, Liu T, Lee FS, Chen Z-Y. Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants. *J Neurosci* 2012; **32**: 4092–4101.
- 44 Suri D, Vaidya VA. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 2013; **239**: 196–213.
- 45 Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 2010; **70**: 304–322.
- 46 Atry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 2012; **64**: 238–258.
- 47 Wellman CL. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 2001; **49**: 245–253.
- 48 Wood JT, Williams JS, Pandarinathan L, Janero DR, Lamm-Keefe CJ, Makriyannis A. Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *J Lipid Res* 2010; **51**: 1416–1423.
- 49 McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; **42C**: 116–131.
- 50 Peet M, Horrobin DF. 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* 2002; **59**: 913–919.
- 51 Parker G, Gibson NA, Brotchie H, Heruc G, Rees A-M, Hadzi-Pavlovic D. Omega-3 fatty acids and mood disorders. *Am J Psychiatry* 2006; **163**: 969–978.
- 52 Carlezon WA, Mague SD, Parow AM, Stoll AL, Cohen BM, Renshaw PF. Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol Psychiatry* 2005; **57**: 343–350.
- 53 Mizunoya W, Ohnuki K, Baba K, Miyahara H, Shimizu N, Tabata K et al. Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. *Springerplus* 2013; **2**: 165.
- 54 Delarue J, Matzinger O, Binnert C, Schneiter P, Chioléro R, Tappy L. Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men. *Diabetes Metab* 2003; **29**: 289–295.
- 55 Michaeli B, Berger MM, Revelly J-P, Tappy L, Chioléro R. Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers. *Clin Nutr* 2007; **26**: 70–77.
- 56 Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 2011; **25**: 1725–1734.
- 57 McNamara RK, Strawn JR. Role of long-chain omega-3 fatty acids in psychiatric practice. *PharmaNutrition* 2013; **1**: 41–49.



- 58 Zainuddin MSA, Thuret S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *Br Med Bull* 2012; **103**: 89–114.
- 59 Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 2006; **139**: 991–997.
- 60 He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 11370–11375.
- 61 Dyall SC, Michael GJ, Michael-Titus AT. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 2010; **88**: 2091–2102.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Translational Psychiatry website (<http://www.nature.com/tp>)