



HAL
open science

**Métabolisme et intérêt nutritionnel de l'acide
docosapentaénoïque n-3 : modulation du statut tissulaire
en acides gras n-3 par les lipides laitiers alimentaires
chez le rat**

Gaëtan Drouin

► **To cite this version:**

Gaëtan Drouin. Métabolisme et intérêt nutritionnel de l'acide docosapentaénoïque n-3 : modulation du statut tissulaire en acides gras n-3 par les lipides laitiers alimentaires chez le rat. Alimentation et Nutrition. Université de Rennes, 2018. Français. NNT : 2018REN1B020 . tel-01938412

HAL Id: tel-01938412

<https://theses.hal.science/tel-01938412>

Submitted on 28 Nov 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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Nutrition et Pathologies Métaboliques

Ecole doctorale Biologie Santé

présentée par

Gaëtan DROUIN

Préparée à l'unité de recherche
Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine
Agrocampus Ouest Rennes

**Métabolisme et intérêt
nutritionnel de l'acide
docosapentaénoïque n-3.
Modulation du statut
tissulaire en acides gras
n-3 par les lipides laitiers
alimentaires chez le rat.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 03 juillet 2018**

devant le jury composé de :

Béatrice MORIO

Directrice de recherche, INRA, Lyon
Présidente du jury

Jean-Marie BARD

Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes
Rapporteur

Michel NARCE

Professeur, INSERM/UB U1231, Dijon
Rapporteur

Bernadette DELPLANQUE

Chargée de recherche, Université Paris Sud
Examinatrice

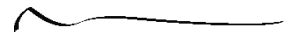
Charlotte BAUDRY

Chef de projet, Lactalis R&D, Retiers
Examinatrice

Philippe LEGRAND

Professeur, Agrocampus Ouest, Rennes
Directeur de thèse

À mes parents.
À ma famille.
Toujours et à jamais.



Merci à tous ceux qui ont collaborés à ce projet

Le laboratoire

Philippe Legrand
Daniel Catheline
Vincent Rioux
Etienne Guillocheau
Cyrielle Garcia
Annaëlle Siquin
Océane Sence
Morgan Lucas
Coline Delavillechabrole
Isabelle James
Clémence Penhoat
Françoise Boissel
Fanny Lemarié
Justine Marchix



Dominique Volland
Stephan Crespel
Nelly Sbiti
David Causeur
Catherine Helary
Josiane Fouquet
Sophie Giffo
Fabien Roquier
Noël Grosset



Jean-Jacques Dubois
Gwenaël Jan
Jacques Portanguen
Valérie Gagnaire

Les membres du comité de thèse

Jacques Mourot
Odile Sergent
Lucile Montagne



Charlotte Baudry
Pascale Le Ruyet



Pierre Guéret
Nicolas Collet
Claude Bendavid



Charles Serhan
Ian Robert Riley
Paul Norris



Michel Guichardant
Nathalie Bernoud-Hubac



Thierry Durand
Claire Vigor
Guillaume Reversat



Michèle Marty
Véronique Quillien



Justine Bertrand Michel
Pauline Le Faouder



David Kouakou-Ngoran



Maxime Hervé



Alain Fautrel



Xavier Blanc



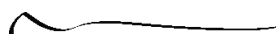
Badia Mssassi



Laurent Deleurme

Annie et Evelyne
Ma famille
Mes amis
Et Momo...

SOMMAIRE



REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE.....	2
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTES DES TABLEAUX	12
LISTE DES ARTICLES	13
LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES	14
LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHÉES	15
LISTE DES ARTICLES EN COLLABORATION	17
LISTE DES CONGRÈS EN COLLABORATION	18
AVANT-PROPOS	20
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	24
1 LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS À LONGUES CHAINES : ORIGINE, MÉTABOLISME, CONVERSION.....	25
1.1 DEFINITION DES ACIDES GRAS.....	25
1.2 MÉTABOLISME ET VOIE DE CONVERSION DES AGPI.....	26
1.2.1 Anabolisme.....	26
1.2.2 Biosynthèse des AGPI-LC chez l'animal.....	27
1.2.2.1 Famille des AGPI n-6 et n-3.....	28
1.2.2.1.1 Désaturases	28
1.2.2.1.2 Voie de Sprecher et Δ 4-désaturase.....	29
1.2.2.1.3 Élongases	31
1.2.2.1.4 Rétroconversion du DHA.....	32
1.2.2.2 Famille des AGPI n-7 et n-9.....	33
1.2.3 Catabolisme.....	34
1.3 REGULATION NUTRITIONNELLE DE LA CONVERSION DES AGPI	35
1.3.1 Notion de saturation de la voie de conversion des AGPI	35
1.3.2 Régulation génique	35
1.3.3 Régulation par le substrat.....	38
1.3.3.1 Par l'apport d'AGPI.....	38
1.3.3.2 Augmentation de la conversion par les acides gras saturés exogènes.....	39
1.3.4 Effet du sexe sur la conversion des AGPI.....	40
1.3.5 Effet de l'âge et influence épigénétique sur la conversion des AGPI	42
1.3.6 Des expressions enzymatiques dépendantes du tissu	44
2 FONCTIONS DES AGPI	45
2.1 FONCTION ENERGETIQUE	45

2.2	FONCTION STRUCTURALE	45
2.3	FONCTIONS SPECIFIQUES DE PRECURSEURS DE MEDIEATEURS OXYGENES	46
2.3.1	Les eicosanoïdes	46
2.3.2	Les docosanoïdes	48
2.4	REGULATEUR DE L'EXPRESSION GENIQUE	49
2.5	FONCTION TISSU DEPENDANTE	53
2.5.1	Cerveau	53
2.5.2	Rétines	54
2.5.3	Système cardiovasculaire	55
3	LES AGPI : ENTRE INTÉRÊTS NUTRITIONNELS ET ENJEUX DE SANTÉ	57
3.1	ESSENTIALITE, RECOMMANDATIONS, CONSOMMATION ET SOURCES DES AGPI.....	57
3.1.1	Essentialité des AGPI	57
3.1.2	Recommandations et ANC	58
3.1.2.1	<i>Nutrition générale</i>	58
3.1.2.2	<i>Nutrition infantile</i>	59
3.1.3	Consommation alimentaire	60
3.1.3.1	<i>Nutrition générale</i>	60
3.1.3.2	<i>Nutrition infantile</i>	61
3.1.4	Sources et durabilité des AGPI	62
3.1.5	Stratégies d'optimisation du statut en AGPI-LC n-3 chez l'Homme	63
3.1.5.1	<i>Augmenter les apports</i>	63
3.1.5.2	<i>Induire la conversion à partir du précurseur</i>	65
3.2	DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE A L'INCORPORATION DANS LES TISSUS.....	66
3.2.1	Biomarqueurs de la consommation alimentaire des acides gras	66
3.2.2	Biodisponibilité et digestibilité des acides gras	68
3.2.3	Distribution tissulaire des AGPI	71
3.2.4	Le cerveau : un tissu riche en AGPI dont le niveau est fortement régulé	71
3.2.4.1	<i>Composition cérébrale en AGPI</i>	71
3.2.4.2	<i>Transport du DHA jusqu'au tissu cérébral</i>	72
3.2.4.3	<i>Turn-over et provenance des AGPI cérébraux</i>	74
4	FOCUS SUR L'ACIDE DOCOSAPENTAÉNOÏQUE N-3 (DPA)	76
4.1	LE DPA, UN AGPI-LC PEU ETUDIÉ ET PEU DISPONIBLE COMMERCIALEMENT	76
4.2	SOURCES ALIMENTAIRES, CONSOMMATION ET BIODISPONIBILITE	77
4.2.1	Sources, consommation alimentaire, recommandations et marqueurs du DPA	77
4.3	METABOLISME DU DPA, DISTRIBUTION ET BIODISPONIBILITE	79
4.3.1	Métabolisme	79
4.3.2	Précurseur de médiateurs oxygénés	81
4.4	EFFETS PHYSIOLOGIQUES.....	82
4.4.1	Maladies cardiovasculaires et syndrome métabolique	82
4.4.2	Inflammation, neurologie et cancer	84

OBJECTIFS DE RECHERCHE	87
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	89
PARTIE 1 : PURIFICATION DU DPA PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	90
1 CONTEXTE DE L'ETUDE	91
2 MATERIELS ET METHODES	92
2.1 MATERIELS	92
2.2 ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES SOURCES PAR GCMS	92
2.2.1 Extraction et dérivation des lipides en esters méthyliques	92
2.2.2 Séparation, identification et quantification des acides gras par GCMS	93
2.3 PURIFICATION DU DPA PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	93
2.3.1 Préparation des huiles et contrôle de l'oxydation	93
2.3.1 Purification du DPA par chromatographie liquide	94
2.3.2 Suivi de purification par chromatographie gazeuse	94
3 RESULTATS ET DISCUSSION	95
3.1 MISE EN PLACE DE LA PURIFICATION	95
3.1.1 Préparation, et sélection des sources alimentaires	95
3.1.2 Sélection des colonnes, augmentation d'échelle, optimisation de l'élution	96
3.2 PURIFICATION DU DPA ET DES AGPI-LC N-3	97
3.3 DISCUSSION GENERALE, LIMITES ET GESTION DES FLUX EN LABORATOIRE DE RECHERCHE	98
4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	100
PARTIE 2 : EFFETS D'UNE SUPPLÉMENTATION EN DPA	101
1 IMPACT D'UNE SUPPLEMENTATION EN DPA SUR L'INCORPORATION DES ACIDES GRAS DANS LES TISSUS. INFLUENCE DU VECTEUR LIPIDIQUE ASSOCIE	102
1.1 CONTEXTE DE L'ETUDE.....	102
1.2 ARTICLE 1: THE IMPACT OF N-3 DOCOSAPENTAENOIC ACID SUPPLEMENTATION ON FATTY ACID COMPOSITION IN RATS DIFFERS DEPENDING UPON TISSUES AND IS INFLUENCED BY THE PRESENCE OF DAIRY LIPIDS IN THE DIET	103
1 Introduction	105
2 Material and methods	106
2.1 <i>Chemicals</i>	106
2.2 <i>The n-3 ethyl docosapentaenoate (DPA-EE) purification</i>	106
2.3 <i>Diets</i>	107
2.4 <i>Animals</i>	108
2.5 <i>Lipid extraction and fatty acid composition</i>	109
2.6 <i>Biochemical parameters of plasma</i>	110
2.7 <i>Statistical analysis</i>	110
3 Results	111

3.1	<i>Experiment 1 - Impact of n-3 DPA supplementation on fatty acid composition in tissues after 3 weeks of diet</i>	112
3.1.1	The n-3 DPA supplementation increased n-3 PUFA and decreased n-6 PUFA (Figure 2)	113
3.1.2	Global and comparative impact of n-3 DPA supplementation on tissues (Figure 4)	114
3.2	<i>Experiment 2 – Combined effects of dairy lipid mixture (DL) and n-3 DPA supplementation after 6 weeks of diet compared to a vegetable oils mixture (VO)</i>	114
3.2.1	Dairy lipids improved n-3 PUFA status in tissues	115
3.2.2	The n-3 DPA supplementation increased n-3 PUFA and decreased n-6 PUFA.....	115
3.2.3	The n-3 DPA supplementation differently affected tissue FA composition in combination with dairy lipids or vegetable oils mixtures	117
3.2.4	Plasma cholesterol decreased with n-3 DPA supplementation and increased with DL diet	118
4	Discussion	118
5	Conclusion	120
6	Acknowledgments	121
7	Author contributions statement	121
8	Conflict of interest statement	121
9	References	121
2	IMPACTS COMPARATIFS DU DPA PAR RAPPORT A L'EPA ET AU DHA	129
2.1	CONTEXTE DE L'ETUDE.....	129
2.2	ARTICLE 2 : COMPARATIVE EFFECTS OF N-3 DOCOSAPENTAENOIC ACID (DPA), DHA AND EPA ON PLASMA LIPID PARAMETERS, OXIDATIVE STATUS AND FATTY ACID TISSUE COMPOSITION IN RATS	131
1	Introduction	132
2	Material and methods	133
2.1	<i>Chemicals</i>	133
2.2	<i>The n-3 ethyl poly-unsaturated fatty acid purifications</i>	133
2.3	<i>Diets and animals</i>	135
2.4	<i>Tissue sampling</i>	136
2.5	<i>Lipid extraction and fatty acid composition</i>	137
2.6	<i>Blood biochemical parameters</i>	137
2.7	<i>Complete blood count, peripheral blood mononucleated cells, and splenocytes sub-populations</i>	138
2.8	<i>Statistical analysis</i>	139
3	Results	140
3.1	<i>Animals, food intake, and n-3 fatty acids excretion</i>	140
3.2	<i>DPA supplementation decreased plasma lipids</i>	140
3.3	<i>DPA supplementation increased antioxidant status and aspartate transaminase activity</i>	140
3.4	<i>DPA supplementation affected tissue fatty acid composition in a similar manner than EPA</i> 141	
3.4.1	Impact of n-3 PUFA supplementations on overall tissue fatty acid composition	141

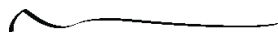
3.4.2	Impact of n-3 PUFA supplementations on n-3 fatty acids tissue contents	143
3.4.3	Impact of n-3 PUFA supplementations on n-6 fatty acids tissue contents	144
3.5	<i>DPA supplementation affected whole blood cells and splenocytes</i>	144
4	Discussion	145
5	Conclusion	149
6	Acknowledgments	149
7	Author contributions statement	150
8	Conflict of interest statement	150
9	References	151
3	DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES DES PARTIES 1 ET 2	159
	PARTIE 3 : LA MATIÈRE GRASSE LAITIÈRE COMME VECTEUR D'INDUCTION DU STATUT TISSULAIRE EN AGPI	167
1	UNE INCORPORATION DE LIPIDES LAITIERS DANS LE REGIME AUGMENTE LE STATUT EN AGPI N-3 168	
1.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	168
1.2	ARTICLE 3: INCORPORATION OF DAIRY LIPIDS IN THE DIET INCREASED LONG-CHAIN OMÉGA-3 FATTY ACIDS STATUS IN POST-WEANING RATS	169
1	Introduction	171
2	Material and methods	172
2.1	<i>Chemicals and products</i>	172
2.2	<i>Ethyl docosahexaenoate (DHA-EE) purification</i>	172
2.3	<i>Diets</i>	173
2.4	<i>Animals</i>	174
2.5	<i>Lipid extraction and fatty acid composition</i>	175
2.6	<i>Biochemical parameters of the plasma</i>	176
2.7	<i>Δ-6 desaturase activity assay</i>	176
2.8	<i>RNA isolation and real-time qPCR</i>	177
2.9	<i>Statistical analysis</i>	177
3	Results	179
3.1	<i>Body weight and food intake</i>	179
3.2	<i>Dairy lipids differently increased n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in tissues</i>	179
3.3	<i>Dairy lipids saved LCPUFA precursors α-linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA)</i>	180
3.4	<i>Dairy lipids enriched fatty acid composition of tissues</i>	182
3.5	<i>Dairy lipids increased plasma cholesterol</i>	182
4	Discussion	183
5	Acknowledgments	186
6	Author contributions statement	186
7	Conflict of interest statement	186
1.3	RESULTATS ET DISCUSSION COMPLEMENTAIRES	195

1.3.1	Autres compositions tissulaires en acides gras.....	195
1.3.2	Optimisation de la séparation des classes de lipides par CCM.....	195
1.3.3	Etude de la Δ -9 désaturase.....	196
1.3.3.1	Matériels et méthodes.....	196
1.3.3.2	Résultats et discussion.....	198
2	VERS L'OPTIMISATION DES CONDITIONS NUTRITIONNELLES ET PHYSIOLOGIQUES POUR L'INCORPORATION DE LIPIDES LAITIERS COMME VECTEUR D'OPTIMISATION DU STATUT TISSULAIRE EN AGPI N-3	201
2.1	CONTEXTE DE L'ETUDE.....	201
2.2	MATERIELS ET METHODES.....	202
2.2.1	Produits chimiques.....	202
2.2.2	Régimes.....	202
2.2.3	Animaux.....	203
2.2.4	Compositions tissulaires en acides gras et dosages.....	204
2.2.5	Analyses statistiques.....	205
2.3	RESULTATS PRELIMINAIRES ET DISCUSSION.....	281
2.3.1	Croissance et consommation alimentaire.....	281
2.3.2	Statut cérébral en acides gras.....	281
2.3.3	Vers la confirmation d'un modèle prédictif du DHA applicable à d'autres espèces.....	283
2.4	PERSPECTIVES.....	286
3	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE LA PARTIE 3	286
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	288
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	290
	ANNEXES.....	257
	ANNEXE I: REVUE GENERALE SUR LE DPA.....	258
	ANNEXE II: APPENDIX DE L'ARTICLE 01.....	293
	Appendix A	294
	<i>Appendix A - Figure 1: Purification of n-3 DPA by liquid chromatography</i>	294
	<i>Appendix A - Figure 2: Rats cumulated body weight gain (A) and total weight gain (B)</i>	295
	<i>Appendix A - Table 1: Organs weight at the end of the experimentation</i>	296
	Appendix B	297
	<i>Appendix B – Table 1: Liver, red blood cells and plasma total lipid fatty acid composition</i>	298
	<i>Appendix B – Table 2: Intestin, stomach and heart fatty acid composition of total lipids</i>	299
	<i>Appendix B – Table 3: Kidney, brain and retina fatty acid composition of total lipids</i>	300
	<i>Appendix B – Table 4: Spleen, lung and bone marrow fatty acid composition of total lipids</i>	380
	<i>Appendix B – Table 5: Pancreas, epididymal adipose tissue (TAE) and skin fatty acid composition of total lipids</i>	381

<i>Appendix B – Table 6: Sub-cutaneous adipose tissue (SCAT). muscle and testis fatty acid composition of total lipids</i>	382
Appendix C	383
<i>Appendix C– Table 1: Liver fatty acids composition of total lipids</i>	384
<i>Appendix C – Table 2: Heart fatty acids composition of total lipids</i>	385
<i>Appendix C – Table 3: Lung fatty acids composition of total lipids</i>	386
<i>Appendix C – Table 4: Spleen fatty acids composition of total lipids</i>	387
<i>Appendix C – Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids</i>	388
<i>Appendix C – Table 6: Brain fatty acids composition of phospholipids</i>	389
Appendix D	390
<i>Appendix D – Figure 1: Loadings plot of Figure3 A</i>	390
<i>Appendix D – Figure 2: Loadings plot of Figure 3 B.</i>	391
ANNEXE III: SUPPLEMENTARY MATERIAL DE L'ARTICLE 02	392
Appendix A	393
<i>Appendix A – Table 1: Plasma assays</i>	393
Appendix B	394
<i>Appendix B – Table 1: Pearson correlation coefficient tests of total fatty acids proportions represented in Figure 3 (A-B).</i>	394
<i>Appendix B – Table 2: Pearson correlation coefficient tests of polyunsaturated fatty acids proportions represented in Figure 3 (C-D).</i>	396
Appendix C	319
Appendix D	320
<i>Appendix D – Table 1: Liver total lipid fatty acid composition.</i>	321
<i>Appendix D – Table 2: Heart total lipid fatty acid composition.</i>	322
<i>Appendix D – Table 3: Lung total lipid fatty acid composition.</i>	323
<i>Appendix D – Table 4: Spleen total lipid fatty acid composition.</i>	324
<i>Appendix D – Table 5: Kidney total lipid fatty acid composition.</i>	325
<i>Appendix D – Table 6: Red blood cells total lipid fatty acid composition.</i>	326
<i>Appendix D – Table 7: Brain total lipid fatty acid composition.</i>	327
<i>Appendix D – Table 8: Splenocytes total lipid fatty acid composition.</i>	328
<i>Appendix D – Table 9: Peripheral blood mononucleated cells total lipid fatty acid composition...</i>	329
ANNEXE IV-A: VERSION EDITEE ET SUPPLEMENTARY MATERIAL DE L'ARTICLE 03	330
Version éditée de l'article 3	331
Supplementary Material 1	344
<i>Supplementary material 1 - Table 1: Organs weight at the end of the experimentation</i>	344
<i>Supplementary material 1 - Figure 1: Rats body weight gain (A), food (B) and water consumption (C).</i>	345
Supplementary Material 2	346
<i>Supplementary material 2 - Table 1: Brain fatty acids composition of phospholipids</i>	347
<i>Supplementary material 2 - Table 2: Retina fatty acids composition of total lipids</i>	348

<i>Supplementary material 2 - Table 3: Liver fatty acids composition of total lipids</i>	349
<i>Supplementary material 2 - Table 4: Heart fatty acids composition of total lipids</i>	350
<i>Supplementary material 2 - Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids</i>	351
Supplementary Material 3	352
<i>Supplementary material 3 - Figure 1: Principal component analysis of the heart</i>	352
<i>Supplementary material 3 - Figure 2: Redundancy analysis of the heart</i>	353
<i>Supplementary material 3 - Table 1: Pearson correlation coefficient of heart redundancy analysis</i>	354
Supplementary Material 4	355
<i>Supplementary material 4 – Figure 1: Δ-6 desaturase activity and Fads2 mRNA relative expression</i>	355
Tissus complémentaire à l'article 3	356
ANNEXE IV-B: DONNEES COMPLEMENTAIRES DE LA PARTIE 3.2	360
ANNEXE V : COMMUNICATIONS AFFICHEES ET RESUMES ASSOCIES	362
ANNEXE VI : LISTE DES FORMATIONS DOCTORALES	373
ABSTRACT	375
RÉSUMÉ	376

LISTE DES ABBRÉVIATIONS



ACOX1 : Acyl-CoA Oxydase 1	KO : Knock-Out
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	LA : Acide Linoléique
ACSL : Acyl-CoA-Synthétase	LC : Chromatographie Liquide
AET : Apport Energétique Total	LDL : Low-Density Lipoprotein(s)
AGCM : Acides Gras à chaînes Courtes et Moyennes	LOX : Lipoxygénase
AGMI : Acide(s) Gras Mono-Insaturé(s)	LPC : lysophosphatidylcholines
AGPI : Acide(s) Gras Poly-Insaturé(s)	LPLAT : Acyl-CoA Lysophospholipide Acyltransférase
AGPI-LC : AGPI à longue(s) chaîne(s)	LT : Leucotriènes
AGS : Acide(s) Gras Saturé(s)	LXR : Liver X Receptor
AGT : Acides Gras Totaux	MGL : Matière(s) Grasse(s) Laitière(s)
ALA : Acide α -linoléique	MGLA : Matière Grasse Laitière Anhydre
APOE4 : apolipoprotéine E4	MGV : Matière(s) Grasse(s) Végétale(s)
BF₃ : Trifluorure de brome	MLX : Max-Like factor X
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique	NAD(H) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Réduit)
ChREBP : Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein	NADP(H) : NAD Phosphate (Réduit)
CoA : Coenzyme A	NaOH : Hydroxyde de sodium
COX : Cyclooxygénase(s)	NF : Nuclear Factor
CPT-1 : Carnitine Palmitoyl-Transférase	PBMC : Cellules Périphériques Mononuclées issues du Sang Total
EE : Ester(s) Ethylique(s)	PC : Phosphatidyl-Choline
ELOVL : Elongation of Very Long chain fatty acids enzyme	PD : Protectine(s)
elovl : Gène codant pour ELOVL	PE :Phosphatidyl-Éthanolamine
EMAG : Ester(s) Méthylique(s) d'Acide(s) Gras	PG : Prostaglandines
Fads : Fatty Acid Desaturase	PGI₂ : Prostacycline
Fads : Gène codant pour Fads	PL : Phospholipide(s)
FAS : Fatty Acid Synthase	PPAR : Récepteur(s) Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes
FAT/CD36 : Fatty Acid Transporter CD36	PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes
FATP : Fatty Acid Transporter Protein	PRP : Plasma Riche en Plaquettes
FID : Détecteur à Ionisation de Flamme	RT-qPCR : Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative après Transcription Inverse
GCMS : Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse	RXR : Récepteur aux Rétinoïdes X
GPCR : récepteur(s) membranaire(s) couplé(s) à des protéines G	SCD1 : Stéaroyl-CoA désaturase (gène de la $\Delta 9$ -désaturase)
HDL : High-Density Lipoprotein(s)	SREBP-1c : Sterol Regulatory Element-Binding Protein
HMG-CoA Synthase : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase	TBS : Tampon Tris salin
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance	TBX : Thromboxane(s)
HRP : Horseradish Peroxidase	TG : Triglycéride(s)
kcal : kilocalorie(s)	VLDL : Very Low-Density Lipoprotein(s)

LISTE DES FIGURES

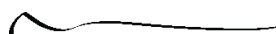


Figure 1. Nomenclature des acides gras.....	25
Figure 2. Conformation des acides gras.....	26
Figure 3. Noms usuels et structures des AGPI-LC n-3.....	26
Figure 4. Voie de la lipogenèse utilisant deux complexes enzymatiques.....	27
Figure 5. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés chez l'animal.....	28
Figure 6. Mécanisme schématique de la $\Delta 6$ -désaturation.....	29
Figure 7. Chaîne de réactions enzymatiques pour l'élongation des AGPI.....	31
Figure 8. Expression des élongases et des désaturases des AGPI-LC dans le cœur.....	32
Figure 9. Voies cataboliques des acides gras selon la longueur de la chaîne carbonée.....	34
Figure 10. Effet d'une supplémentation en ALA, EPA et DHA sur le taux plasmatique d'AGPI-LC n-3.....	35
Figure 11. Effet d'une supplémentation en acide stéaridonique sur le taux d'AGPI-LC sanguin.....	35
Figure 12. Taux de DHA plasmatique en fonction des quantités d'ALA et de LA du régime.....	38
Figure 13. L'acide myristique augmente l'activité des enzymes désaturases.....	39
Figure 14. Les acides gras à chaînes courtes et moyennes protègent les précurseurs des AGPI et les AGPI-LC de la β -oxydation mitochondriale.....	39
Figure 15. Expression des enzymes et des facteurs de transcription impliqués dans la conversion des AGPI en fonction du sexe.....	40
Figure 16. La déficience en ALA module l'expression des enzymes par méthylation de l'ADN.....	43
Figure 17. Expression génique des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases dans les tissus humains.....	44
Figure 18. Modèle putatif de l'effet des AGPI n-3 sur les rafts lipidiques.....	46
Figure 19. Voie de synthèse des eicosanoïdes.....	47
Figure 20. Voie de synthèse des docosanoïdes issus du DHA.....	48
Figure 21. Impact des AGPI alimentaires sur les facteurs de transcription hépatiques et le métabolisme lipidique et glucidique.....	49
Figure 22. Effet nucléaire des acides gras.....	50
Figure 23. Gènes et enzymes régulés par SREBPs.....	51
Figure 24. Rôle des AGPI n-3 dans la fonction cardiovasculaire.....	56
Figure 25. Influence de l'acide linoléique (LA) sur la croissance du rat.....	57
Figure 26. Influence de l'ALA sur l'apprentissage.....	57
Figure 27. Carte de la consommation mondiale d'Omega-3.....	60
Figure 28. Evolution de la teneur en LA et en ALA dans le lait maternel de femmes américaines.....	62
Figure 29. Sources des AGPI-LC n-3 et leur durabilité.....	63
Figure 30. Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la voie de conversion des AGPI n-3 avec la matière grasse laitière.....	65
Figure 31. Comparaison des biomarqueurs des AGPI-LC n-3.....	66
Figure 32. Processus de digestion et d'absorption des lipides alimentaires.....	68
Figure 33. Transport des acides gras dans l'organisme.....	69
Figure 34. Structure générale d'une lipoprotéine.....	70
Figure 35. Stockage et relargage tissulaire des AGPI.....	70

Figure 36. Distribution tissulaire des AGPI n-3 et n-6 dans 25 compartiments.....	71
Figure 37. Distribution cérébrale du DHA	72
Figure 38. Incorporation du DHA dans le cerveau.....	73
Figure 39. Evolution temporelle du nombre de publications associées à l'EPA, au DPA ou au DHA	76
Figure 40. Compétition entre les AGPI-LC incluant le DPA.....	79
Figure 41. Docosanoïdes issus du DPA	81
Figure 42. Optimisation du gradient de séparation des acides gras par GCMS	93
Figure 43. Présentation du système de purification par chromatographie liquide	94
Figure 44. Optimisation de la source d'huile utilisé pour la purification du DPA.....	95
Figure 45. Optimisation des conditions d'élution et du système de colonnes flash.....	96
Figure 46. Méthode de boucle de purification du DPA par chromatographie liquide	97
Figure 47. Suivi de purification du DPA par chromatographie liquide et gazeuse.....	98
Figure 48. Résumé graphique de l'article 1	103
Figure 49. Experimental procedures of the experiments 1 and 2 (Art 1- Fig 1)	108
Figure 50. Fatty acid composition of tissues in n-3 DPA, DHA and EPA (Art 1- Fig 2).....	113
Figure 51. Ratio n-6 LCPUFA / LA from fatty acid composition of tissues (Art 1- Fig 3).....	113
Figure 52. OPLS-DA model of all fatty acids of the studied tissues (Art 1- Fig 4).....	114
Figure 53. DHA proportion in brain phospholipids (Art 1- Fig 5).....	115
Figure 54. Redundancy analysis of fatty acids composition of the liver, heart, lung, and spleen (Art 1- Fig 6)	117
Figure 55. Plasma cholesterol concentrations (Art 1- Fig 7).....	118
Figure 56. Résumé graphique de l'article 2.....	130
Figure 57. Plasma lipid profile of rats (Art 2- Fig 1)	140
Figure 58. Antioxidant status, plasma ASAT and ALAT activities (Art 2- Fig 2)	141
Figure 59. Redundancy analysis of overall tissue fatty acid composition (Art 2- Fig 3).....	142
Figure 60. DPA status in tissues of rats (Art 2- Fig 4).....	142
Figure 61. DHA status in tissues of rats (Art 2- Fig 5)	142
Figure 62. EPA status in tissues of rats (Art 2- Fig 6)	143
Figure 63. Effet de la dose de DPA dans un modèle de culture d'hépatocytes primaires de rat.....	161
Figure 64. Study design including two experiments (Art 3- Fig 1).....	174
Figure 65. Sum of n-3 fatty acids proportion in tissues (Art 3- Fig 2).....	179
Figure 66. DHA proportion in tissues (Art 3- Fig 3).....	180
Figure 67. n-3 DPA proportion in tissues (Art 3- Fig 4).....	181
Figure 68. LA and ALA proportions in tissues (Art 3- Fig 5)	181
Figure 69. Séparation des classes de lipides et purification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie sur couche mince.	195
Figure 70. Western Blot de la Δ 9-désaturase	197
Figure 71. Influence des régimes sur la delta-9 désaturase et les triglycérides plasmatiques.....	198
Figure 72. Design expérimental et répartition des animaux.....	202
Figure 73. Résultats d'animalerie.....	203
Figure 74. Comparaison de nos données avec le modèle prédictif du DHA dans le cerveau	206

LISTES DES TABLEAUX

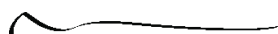
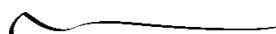


Tableau 1. Nomenclature des acides gras	24
Tableau 2. Recommandations nutritionnelles des AGPI-LC n-3 des comités d'experts internationaux pour l'adulte	58
Tableau 3. Composition en acides gras du lait maternel et des préparations pour nourrissons.	61
Tableau 4. Formes chimiques des AGPI-LC n-3 dans les différentes sources alimentaires.....	64
Tableau 5. Propriétés physiques des colonnes de chromatographie liquide utilisées	94
Tableau 6. Composition des sources alimentaires utilisées pour la purification du DPA	95
Tableau 7. Oil mixtures and fatty acid composition of the four experimental diets (Art 1 – Tab 1)..	107
Tableau 8. n-3 PUFA tissue contents (Art 1 – Tab 2).....	116
Tableau 9. n-6 PUFA tissue contents (Art 1 – Tab 3).....	116
Tableau 10. The composition of the experimental diets (Art 2- Tab 1).....	134
Tableau 11. Body and organ weights, food intake and excretion (Art 2- Tab 2).....	140
Tableau 12. Percentage of apparent retroconversion of DPA and DHA into EPA (Art 2- Tab 3).....	143
Tableau 13. n-6 fatty acids content in tissues (Art 2- Tab 4).....	144
Tableau 14. n-3 and n-6 fatty acid contents in splenocytes and peripheral blood mononuclear cells (Art 2- Tab 5)	144
Tableau 15. Complete blood count, white blood cell, and splenocyte subpopulations (Art 2- Tab 6)	145
Tableau 16. Oil mixtures and fatty acid composition of the lipid blends composing the four experimental diets (Art 3 – Tab 1)	173
Tableau 17. The n-6 polyunsaturated fatty acids composition in tissues of rats fed the four diets (Art 3 – Tab 2)	182
Tableau 18. Total fatty acids composition of epididymal adipose tissue of rats fed the four diets (Art 3 – Tab 3)	183
Tableau 19. Plasma concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol (Art 3 – Tab 4)	184
Tableau 20. Composition des solutions utilisées pour les Western Blots	196
Tableau 21. Composition des régimes expérimentaux.....	202
Tableau 22. Composition en acides gras totaux du cerveau des rats nourris avec les trois régimes ..	207

LISTE DES ARTICLES



- **Incorporation of dairy lipids in the diet increased long-chain Omega-3 fatty acids status in post-weaning rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Siquin A¹, Baudry C², Le Ruyet P², Rioux V¹, Legrand P¹.
Frontiers in Nutrition, Section Lipidology.
Soumis le 11 janvier 2018. Révisé le 06 avril 2018. Accepté le 30 avril 2018.

- **The impact of n-3 docosapentaenoic acid supplementation on fatty acid composition in rats differs depending upon tissues and is influenced by the presence of dairy lipids in the diet.**
Gaetan Drouin¹, Etienne Guillocheau¹, Daniel Catheline¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand¹
Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)
Soumis le 12 juin 2018. Révisé le 22 juillet 2018. Accepté le 29 juillet 2018.

- **Comparative effects of n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition.**
Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Etienne Guillocheau¹, Pierre Gueret³, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand¹
Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)
Soumis le juin 07 2018. Révisé le 16 août 2018. Accepté le 19 septembre 2018.

- **The n-3 docosapentaenoic acid (DPA): a new player in the n-3 long chain polyunsaturated fatty acid family**
Gaetan Drouin¹, Vincent Rioux¹, Philippe Legrand¹
Biochimie
Soumis le 24 septembre 2018, en révision.

- **Large-scale purification the n-3 docosapentaenoic acid by liquid chromatography**
Drouin G.¹, Catheline D.¹, Legrand P.¹, Rioux V.¹
Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)
En cours d'écriture.

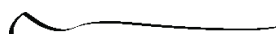
Légende des affiliations des auteurs :

1 Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest, Rennes, France

2 Lactalis R&D, Retiers, France

3 Laboratoire d'Hémostase - CHU Ponchaillou, Rennes, France

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES



- **Impact d'une supplémentation en DPA n-3 sur l'enrichissement tissulaire en acides gras n-3.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Pédrone F¹
Journée Recherche Lactalis, Bourgbarré, France ; 24/06/2016.

- **Impact d'une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) sur la composition tissulaire en acides gras n-3 chez le rat.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Pédrone F¹, Legrand P¹
Journées Francophone de Nutrition (JFN), Montpellier, France ; 02/12/2016.
Publié dans Nutrition Clinique et Métabolisme, Vol 31, Issue 3, Sept2017, p244

- **Impact de la matière grasse laitière et du DPA n-3 dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés n-3.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹
Journée recherche de Lactalis (JLR), Laval, France ; 29/06/2017.

- **Metabolic and physiological effects associated with n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) supplementation in rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Guéret P³, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Groupe d'Étude et de Recherche en Lipidomique (GERLI), Dijon, France ; 24/10/2017.

- **Purification des acides gras polyinsaturés par HPLC préparative-flash.**
Drouin G¹, Catheline D¹
Journées lipidomystes, Dijon, France; 25/10/2017.

- **Un enrichissement partiel en lipides laitiers augmente le statut en Omega-3 chez le rat en post-sevrage.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Rioux V¹, Legrand P¹
Journées francophone de nutrition (JFN), Nantes, France ; 15/12/2017.

- **Dairy lipids in the diet increased Omega-3 fatty acids status in post-weaning rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Guillocheau E¹, Baudry C², Le Ruyet P², Rioux V¹, Legrand¹.
European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); Genève, Suisse; 12/05/2018.

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHÉES



- **Dairy lipids in infant formula: Impact on the Omega-3 fatty acid content. Focus on n-3 DPA.**
Drouin G¹, Siquin A¹, Boissel F¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹, Pédrone F¹.
Journée Recherche Lactalis, Bourgbarré, France; 24/06/2016.

- **Impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation on n-3 fatty acid composition of tissues in rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); Prague, République Tchèque; 11/05/2017.

- **Dairy lipids enrichment increased Omega-3 (n-3) status in post-weaning rats. Effect of n-3 DPA supplementation.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹
Journée recherche de Lactalis (JLR), Laval, France ; 29/06/2017.

- **Dairy lipids enrichment increased Omega-3 status in post-weaning rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Sence O¹, Devillechabrolle C¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
International Dairy Federation (IDF), Belfast, Irlande; 29/10/2017.

- **Dairy lipids increase Omega-3 status. Impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Lucas M¹, Gueret P³, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Nutrition Alimentation Métabolisme Santé (NAMS), Rennes, France; 17/11/2017.
(Prix de la meilleur communication affichée)

- **Purification d'acides gras à grande échelle et haute pureté par chromatographie en phase liquide.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Nutrition Alimentation Métabolisme Santé (NAMS), Rennes, France; 17/11/2017.

- **Une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) impacte spécifiquement la composition tissulaire en acides gras chez le rat.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Guillocheau E¹; Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Journées francophone de nutrition (JFN), Nantes, France , 13/12/2017.

- **Effets métaboliques et physiologiques associés à une supplémentation en DPA n-3 chez le rat en post sevrage. Impact de la matière grasse laitière.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Sence O¹, Gueret P³, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Journées francophone de nutrition (JFN), Nantes, France ; 13/12/2017.

- **Dairy lipids increase Omega-3 status. Physiological impact of n-3 docosapentaenoic acid.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹
Journée recherche Villejean,Rennes, France ; 17/01/2018.

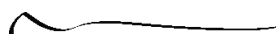
- **Dairy lipids enrichment increased Omega-3 status in post-weaning rats.**
Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Rioux V¹, Legrand P¹
Nutrition & Growth, Paris, France ; 02/03/2018.

- **Large-scale purification of minority fatty acids by liquid chromatography: the n-3 docosapentaenoic acid case.**
Drouin G.¹, Guillocheau E.¹, Catheline D.¹, Rioux V.¹, Legrand P.¹
American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting, Minneapolis, USA.
06/05/2018.

Légende des affiliations des auteurs :

- 1 Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest, Rennes, France
- 2 Lactalis R&D, Retiers, France
- 3 Laboratoire d'Hémostase - CHU Ponchaillou, Rennes, France

LISTE DES ARTICLES EN COLLABORATION



AU SEIN DU LABORATOIRE

- **Dietary caprylic acid and ghrelin O-acyltransferase activity to modulate octanoylated ghrelin functions: what is new in this nutritional field?**
Lemarié F.¹, Beauchamp E.¹, Drouin G.¹, Legrand P.¹, Rioux V.¹
Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids (PLEFA)
Soumis le 07 mars 2018. Révisé le 15 juillet 2018. Accepté le 16 juillet 2018.

- **Retroconversion of dietary *trans*-vaccenic (*trans*-C18:1 n-7) acid to *trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7): proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats.**
Guillocheau E¹, Garcia C¹, Drouin G¹, Richard L¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Journal of Nutritional Biochemistry (JNB).
Soumis le 22 mai 2018. Révisé le 21 août 2018. Accepté le 12 septembre 2018.

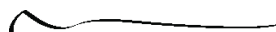
- **Conversion of dietary *trans*-vaccenic acid to *trans*11,*cis*13-conjugated linoleic acid in the rat lactating mammary gland by Fatty Acid Desaturase 3-catalyzed methyl-end Δ13-desaturation**
Garcia C¹, Guillocheau E¹, Richard L¹, Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Biochemical and Biophysical research communications (BBRC)
Soumis le 14 septembre 2018. Accepté le 20 septembre 2018.

AVEC DES LABORATOIRES EXTÉRIEURS

- **Impact of Orexin-A treatment on food intake, energy metabolism and body weight in mice**
Blais A⁴, Drouin G⁴, Chaumontet C⁴, Voisin T⁵, Couvelard A⁵, Even PC⁴, Couvineau A⁵
PLOS One
Soumis le 19 juillet 2016. Accepté le 22 décembre 2016.

- **Post-weaning xenohormone intake affects adult rat submandibular gland in a sex-dependent manner**
Kouidhi W^{6,7}, Bergès R⁷, Drouin G⁷, Desmetz C⁷, Auger J⁸, El May M⁶, Canivenc-Lavier MC⁷
Oral Diseases
Soumis le 26 janvier 2018. Révisé le 29 mars 2018. Accepté le 22 mai 2018.

LISTE DES CONGRÈS EN COLLABORATION



AU SEIN DU LABORATOIRE

- **Les acides gras trans naturels : le défi de la quantité pour des études de supplémentation. Application à l'acide trans-palmitoléique (C16:1 n-7 trans)**
Guillocheau E¹, Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Poster. Journées francophones de nutrition (JFN), Nantes, France ; 13/12/2017.
- **Supplementation studies involving natural *trans* fatty acids: real challenges, actual solutions. The case of *trans*-palmitoleic acid.**
Guillocheau E¹, Drouin G¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Présentation orale. American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting, Minneapolis, USA. 06/05/2018.
- **Do all *trans*-C18:1 intake during pregnancy jeopardize polyunsaturated fatty acid status in newborns? Focus on a *trans*-vaccenic acid (*trans*-C18:1 n-7) supplementation in the rat**
Guillocheau E¹, Drouin G¹, Richard L¹, Garcia C¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Poster. European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); Genève, Suisse; 12/05/2018.
- ***Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a ruminant dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a nutritional study on mice**
Guillocheau E^{1,9}, Drouin G¹, Penhoat C¹, Beauchamp E¹, Ghukasyan¹⁰, Fautrel A¹⁰, Marty M¹¹, Quillien V¹¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Groupe d'Étude et de Recherche en Lipidomique International (GERLI), Saint-Maximin-la Sainte Baume, France. 30/09/2018.
- **Acide *trans*-palmitoléique (C16:1 n-7 *trans*) : des apports assurés par les produits laitiers, et un impact sur le tissu adipeux**
Guillocheau E^{1,9}, Penhoat C¹, Drouin G¹, Godet A¹, Beauchamp E¹, Ghukasyan G¹⁰, Fautrel A¹⁰, Marty M¹¹, Quillien V¹¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
Nutrition Alimentation Métabolisme Santé (NAMS), Rennes, France. 04/10/2018.
- ***Trans*-palmitoleic acid (*trans*-C16:1 n-7), a dairy fat biomarker, and metabolic syndrome components: a study on C57BL/6N mice**
Guillocheau E^{1,9}, Drouin G¹, Penhoat C¹, Beauchamp E¹, Ghukasyan¹⁰, Fautrel A¹⁰, Marty M¹¹, Quillien V¹¹, Catheline D¹, Legrand P¹, Rioux V¹
International Dairy Federation (IDF) world dairy summit, Daejeon, South Korea. 15/10/2018.

AVEC DES LABORATOIRES EXTÉRIEURS

- **Consommation d'édulcorants pendant la gestation et la lactation : impact sur le développement des préférences au sucré et sur la prise alimentaire de la progéniture chez le rat Wistar**
Gharzouli L⁷, Drouin G⁷, Bergès R⁷, Nicklaus S⁷, Canivenc-Lavier MC⁷
Journées francophones de nutrition (JFN), Marseille, France. 11/12/2015.

- **Effet d'un traitement chronique aux orexines chez la souris sur le comportement alimentaire et le métabolisme glucidique**
Chaumontet C.⁴, Drouin G.⁴, Even P.C.⁴, Voisin T.⁵, Couvineau A.⁵, Blais A.⁴
Journées francophones de nutrition (JFN), Marseille, France. 11/12/2015.

- **Do artificial sweeteners act as endocrine-disruptor like? Sex specific effect of prenatal exposure to intensive sweeteners on submandibular salivary gland development of female Wistar rat**
Drouin G⁷, Ménétrier F⁷, Gharzouli L⁷, Soifouani M⁷, Bergès M⁷, Pasquis B⁷, Nicklaus S⁷, Canivenc-Lavier MC⁷
2nd Paris Workshop on endocrine disruptors effects on wildlife and human health (PNRPE), Paris, France. 21/01/2016.

Légende des affiliations des auteurs issus des collaborations :

1 Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest, Rennes, France

2 Lactalis R&D, Retiers, France

3 Laboratoire d'Hémostase - CHU Ponchaillou, Rennes, France

4 UMR 914 PNCA, INRA-AgroParisTech, Paris, France

5 INSERM U1149, Centre de Recherche de l'Inflammation, Paris, France

6 Unité de Recherche 01/UR/08-07, Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis el Manar, Tunis, Tunisie

7 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation. UMR1324 INRA, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté. F-21000 Dijon. France.

8 INSERM U1016, Équipe Génomique Épigénétique et Physiologie de la Reproduction, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France

9 Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière (CNIEL), Département technique et scientifique, Paris, France

10 H2P2 Plateforme d'histopathologie, Université de Rennes 1, Rennes, France

11 Centre Eugène Marquis, Rennes, France.

AVANT-PROPOS

L'augmentation de la prévalence de nombreuses maladies à composantes nutritionnelles représente un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays industrialisés. L'augmentation de ces pathologies résulte principalement d'un changement des modes de vies et des habitudes alimentaires et industrielles de ces dernières décennies. De fait, le lien entre l'alimentation et la santé est de plus en plus au cœur des préoccupations de la société actuelle, comme le montre la recrudescence des programmes de recherche, des études, des émissions de télévision et de la communication générale vis-à-vis de la nutrition. En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) participe à la prévention de ces pathologies en intervenant « *à toutes les étapes de la chaîne alimentaire et en évaluant les risques et les bénéfices nutritionnels des aliments et de leurs constituants sur l'organisme afin de définir des recommandations de santé publique* ». De plus, un Programme National de Nutrition Santé (PNNS) a été mis en place en 2001 afin de lutter contre l'augmentation de la prévalence de ces maladies en agissant sur la nutrition.

Dans ce contexte, les lipides ne sont aujourd'hui plus considérés uniquement comme substrat énergétique mais aussi qualitativement pour leurs fonctions biologiques. Parmi-eux, le rôle des acides gras polyinsaturés (AGPI) des familles n-3 et n-6 (ou Oméga-3 et Oméga-6) dans la modulation de l'apparition, de l'altération et de la prévention de ces maladies est de mieux en mieux démontré. Néanmoins, les habitudes de consommation actuelles entraînent un déficit avéré d'AGPI n-3 précurseur et dérivés dont les apports n'atteignent qu'à peine la moitié des besoins. En outre, un déséquilibre alimentaire existe également entre ces deux familles n-3 et n-6 en faveur des AGPI n-6 et ce déséquilibre pourrait être un des facteurs responsables de l'apparition des maladies à composantes nutritionnelles. À l'inverse, les AGPI n-3 se montrent de plus en plus importants, particulièrement pour leurs diverses implications bénéfiques potentielles dans la prévention de nombreuses maladies incluant le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaires ou encore le déclin cognitif. En effet, on estime que 28 millions d'années de vie sont perdues chaque année en raison d'une mauvaise santé, d'un handicap ou d'une mort prématurée en raison d'un apport insuffisant en Oméga-3 (IHME, 2016). La recherche s'intéresse maintenant aux effets physiologiques et métabolique indépendants associés aux différents AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) n-3 comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA) et plus récemment le très peu étudié acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) dans la prévention de ces maladies.

La voie de conversion des AGPI-LC n-3 à partir de leur précurseur l'acide α -linoléique (ALA) est limitée chez l'homme et insuffisante pour atteindre un statut tissulaire optimal en AGPI-LC

n-3 permettant l'apparition de leurs bénéfices physiologiques. Ainsi, l'obtention d'un statut tissulaire optimal en AGPI-LC n-3 est devenu un des centres de préoccupations actuels en nutrition et plus particulièrement en nutrition infantile. En effet, l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les tissus, et plus particulièrement du DHA, est maximale lors des 5 premières années de la vie et est primordiale dans le cerveau et les rétines. Néanmoins, à l'heure actuelle beaucoup de nourrissons sont nourris avec des formules infantiles dont la composition lipidique est très variable et composée majoritairement d'huiles végétales ne permettant pas d'atteindre un bon statut en DHA en comparaison aux nourrissons allaités. Ainsi, certaines entreprises incorporent dans leurs formules infantiles des lipides laitiers, plus proches du lait maternel dans la variété des lipides qui les composent. Bien que ne contenant pas de DHA la plupart du temps, contrairement au lait maternel, ces formules infantiles à base de lipides laitiers pourraient indirectement augmenter le statut tissulaire en DHA, laissant apparaître un axe de recherche intéressant.

Ainsi les travaux de doctorat présentés ici ont été réalisés au laboratoire de biochimie et nutrition humain d'Agrocampus Ouest, qui s'intéresse aux modulations métaboliques des acides gras, en collaboration avec le groupe Lactalis, qui s'attache à l'amélioration de la composition de ses formules infantiles pour les rapprocher le plus du lait maternel et à favoriser l'apport d'AGPI n-3 chez les jeunes enfants.

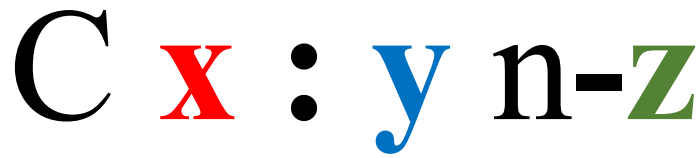
Ces travaux sont présentés dans ce manuscrit sous le titre « **Métabolisme et intérêt nutritionnel de l'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA). Modulation du statut en Oméga-3 des tissus par les lipides laitiers alimentaires chez le rat.** ». Dans un premier temps, une synthèse bibliographique fait le point sur les données de la littérature relative aux fonctions, aux régulations et à la distribution tissulaire des AGPI, en s'axant sur les AGPI n-3, avant de s'intéresser plus particulièrement au DPA. Ensuite, les principaux résultats seront présentés dans trois parties consacrées 1) à la purification du DPA, 2) à l'impact sur la composition tissulaire et le métabolisme lipidique d'une supplémentation nutritionnelle en DPA, 3) à la modulation du statut en AGPI n-3 induit par l'incorporation partielle de matière grasse laitière dans le régime. Pour chacune des parties, les résultats sont principalement présentés sous forme d'article scientifique soumis ou accepté pour publication, ou font l'objet d'une description de la méthodologie utilisée, des résultats puis d'une discussion comprenant les perspectives de recherche envisagées.

"Qu'est-ce que c'est que ce style de bouffer des petits machins tout secs et trois gallons de flotte par jour ? Si la jeunesse se met à croire à ces conneries, on se dirige tout droit vers une génération de dépressifs ! Le gras, c'est la vie."
Caradoc & al, 2005, Livre II, Corpore sano, Ep. 76

Catégorie	Structure	Nom systématique	Nom commun
Acides gras saturés (AGS)	C4:0	Acide butanoïque	Acide butyrique
	C6:0	Acide hexanoïque	Acide caproïque
	C7:0	Acide heptanoïque	Acide oenanthique
	C8:0	Acide octanoïque	Acide caprylique
	C9:0	Acide nonanoïque	Acide pèlargonique
	C10:0	Acide decanoïque	Acide caprique
	C11:0	Acide undecanoïque	-
	C12:0	Acide dodecanoïque	Acide laurique
	C14:0	Acide tétradecanoïque	Acide myristique
	C15:0	Acide pentadecanoïque	-
	C16:0	Acide hexadecanoïque	Acide palmitique
	C17:0	Acide heptadecanoïque	Acide margarique
	C18:0	Acide octadecanoïque	Acide stéarique
	C20:0	Acide eiqueosanoïque	Acide arachidique
C22:0	Acide docosanoïque	Acide béhénique	
C24:0	Acide tétracosanoïque	Acide lignocérique	
Acides gras monoinsaturés (AGMI)	C14:1 n-5	Acide cis 9, tétradecenoïque	Acide myristoléique
	C16:1 n-9	Acide cis 7, hexadecenoïque	-
	C16:1 n-7	Acide cis9,hexadecenoïque	-
	C18:1 n-9	Acide cis 9 octadecenoïque	Acide oléique
	C18:1 n-9	Acide trans 9 octadecenoïque	Acide élaïdique
	C18:1 n-7	Acide cis 11, octadecenoïque	Acide cis-vaccénique
	C18:1 n-7	Acide trans 11, octadecenoïque	Acide trans-vaccénique
	C20:1 n-9	Acide cis 11, eiqueosenoïque	Acide gondoïque
	C22:1 n-9	Acide cis 13, docosenoïque	Acide érucique
	C24:1 n-9	Acide cis 15, tétracosanoïque	Acide nervonique
Acides gras polyinsaturés (AGPI)	C18:2 n-6	Acide cis 9, 12, octadecadienoïque	Acide linoléique
	C18:3 n-3	Acide cis 9, 12, 15 octadecatrienoïque	Acide α-linolénique
	C18:3 n-6	Acide cis 6, 9, 12 octadecatrienoïque	Acide γ-linolénique
	C18:4 n-3	Acide cis 6, 9, 12, 15 octadecatetraenoïque	Acide stéaridonique
	c9 t11 c18:2	Acide cis 9, trans 11 octadecadienoïque	Acide ruménique
	C20:2 n-6	Acide cis 11, 14, eicosadienoïque	-
	C20:3 n-3	Acide cis 11, 14, 17, eicosatrienoïque	-
	C20:3 n-6	Acide cis 8, 11, 14, eicosatrienoïque	Acide di-homo γ-linolénique
	C20:3 n-9	Acide cis 5, 8, 11, eicosatrienoïque	Acide de MEAD
	C20:4 n-6	Acide cis,5, 8, 11, 14, eicosatetraenoïque	Acide arachidonique ARA
	C20:5 n-3	Acide cis 5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoïque	Acide timnodonique EPA
	C22:2 n-6	Acide cis 13,16 docosadienoïque	-
	C22:4 n-6	Acide cis 7, 10, 13, 16, docosatetraenoïque	Acide adrénique
	C22:5 n-3	Acide cis 7, 10, 13, 16, 19 docosapentaenoïque	Acide clupanodonique DPA
	C22:5 n-6	Acide cis 4, 7, 10, 13, 16, docosapentaenoïque	DPA n-6
	C22:6 n-3	Acide cis 4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaenoïque	Acide cervonique DHA
	C24:4 n-6	Acide cis 9, 12, 15, 18 tétracosatetraenoïque	-
C24:5 n-6	Acide cis 6, 9, 12, 15, 18 tétracosapentaenoïque	-	
C24:5 n-3	Acide cis 9, 12, 15, 18, 21 tétracosapentaenoïque	-	
C24:6 n-3	Acide cis 6, 9, 12, 15, 18, 21 tétracosahexaenoïque	-	

Tableau 1. Nomenclature des acides gras

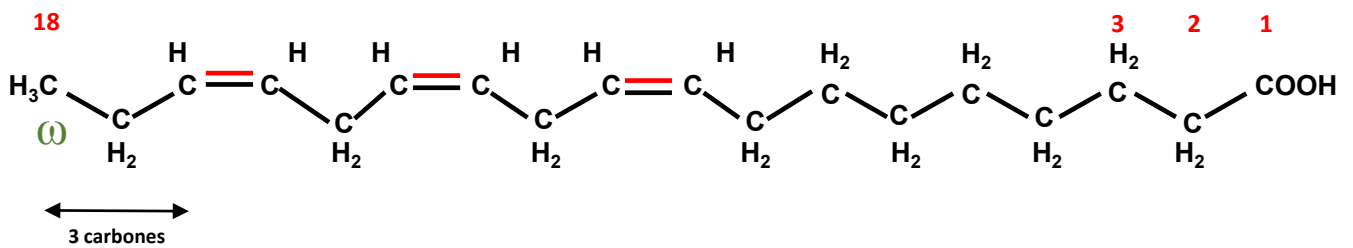
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



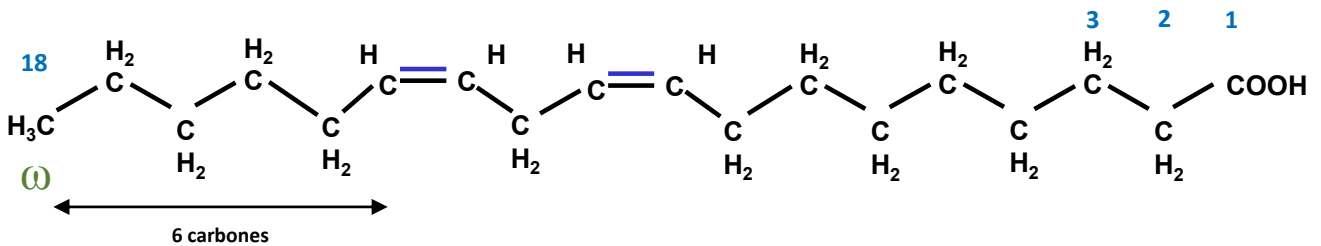
Nombre d'atomes de carbones de l'acides gras

Nombre de doubles liaisons

Position de la 1^{ère} double liaison à partir de l'extrémité méthyle



Acide α -linoléique C18:3 n-3 ou ω -3



Acide linoléique C18:2 n-6 ou ω -6

Figure 1. Nomenclature des acides gras.

Exemple des précurseurs des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et n-6.

1 LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS À LONGUES CHAINES : ORIGINE, MÉTABOLISME, CONVERSION

1.1 Définition des acides gras

En 1823, M Chevreul décrivait pour la première fois la structure glycéridique des huiles et des graisses en définissant la notion d'acides gras (Chevreul 1823). Les acides gras sont des molécules hydrophobes composées d'une chaîne hydrocarbonée linéaire, principalement à nombre pair de carbones et dont la longueur de chaîne varie le plus souvent de 4 à 28 atomes de carbones. Les acides gras sont constitués à leur extrémité d'un groupement méthyle (-CH₃) et d'un groupement carboxyle (-COOH). Certains acides gras possèdent une ou plusieurs doubles liaisons éthyléniques disposées le long de la chaîne carbonée. Ces doubles liaisons sont majoritairement disposées en position *cis* et en position malonique, c'est-à-dire toutes distantes les unes des autres de trois atomes de carbones.

La nomenclature biochimique répertorie les acides gras en fonction du nombre de carbone, du nombre de doubles liaisons aussi appelées insaturations, ainsi qu'en fonction de la position de la première double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle (**Figure 1**). Ils sont notés C x :y n-z (ou ωz), avec x le nombre de carbones, y le nombre d'insaturations et Z la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthylée de la chaîne carbonée. Quand les acides gras sont insaturés, on distingue des configurations géométriques *cis* et *trans* pour les doubles liaisons.

Les acides gras sont aussi regroupés en trois familles selon le nombre d'insaturations dans la chaîne carbonée. Ainsi, on différencie i) les acides gras saturés (AGS), sans double liaison ; ii) les acides gras mono-insaturés (AGMI), contenant une seule double liaison ; iii) les acides gras poly-insaturés (AGPI), contenant au moins deux doubles liaisons. Parmi les AGPI, deux familles se distinguent par leur caractère indispensable et par la position de la première double liaison à l'extrémité méthyle : la famille des AGPI n-3 ou Oméga-3 et la famille des AGPI n-6 ou Oméga-6. L'acide α -linoléique (ALA) est le précurseur de la famille des AGPI n-3 tandis que les acides gras de la famille des AGPI n-6 dérivent de l'acide linoléique (LA) Il existe également deux autres familles d'AGPI, la famille des n-7 et des n-9. (Fahy et al. 2011).

Les propriétés physico-chimiques des acides gras varient selon la longueur de leur chaîne carbonée, de leur nombre d'insaturations et de la configuration géométrique des doubles

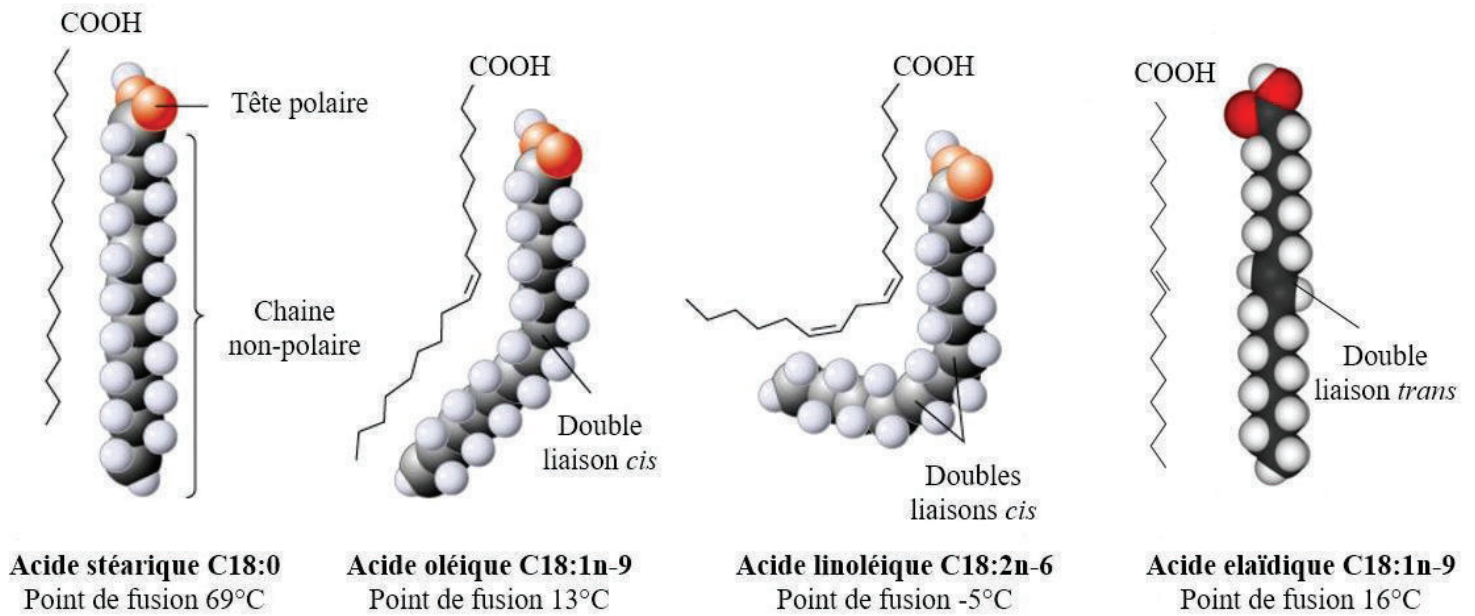


Figure 2. Conformation des acides gras

Adapté de *Loconto 2006 et Williams 2009*.

La conformation des insaturations et le nombre de carbone de la chaîne carbonée impactent le point de fusion et la géométrie spatiale de l'acide gras.

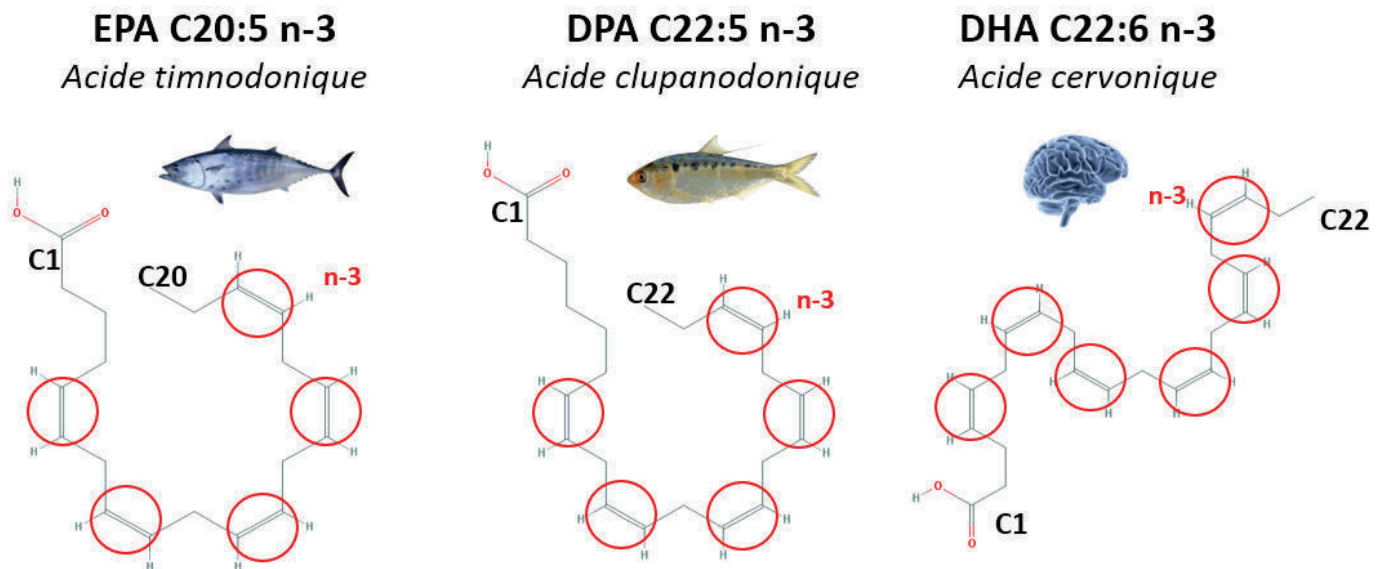


Figure 3. Noms usuels et structures des AGPI-LC n-3

EPA : acide cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque,

DPA : acide cis-7,10,13,16,19-docosapentaénoïque,

DHA : acide cis-4,7,10,13,16,19-docosaénoïque.

liaisons. Par exemple, leur solubilité dans l'eau est directement corrélée à la longueur de leur chaîne carbonée, plus la chaîne sera longue et moins l'acide gras sera soluble. Le nombre d'insaturations va influencer sur le point de fusion de la matière grasse. Par exemple, la bougie est composée d'acide stéarique (stéarine, C18:0) et est solide à température ambiante. Le beurre quant à lui contient majoritairement des acides gras saturés et sera pris en masse à température ambiante, alors qu'une huile enrichie en acide gras insaturés sera liquide (huiles d'olive, de colza, de poisson). La conformation *trans* des insaturations va aussi augmenter le point de fusion par rapport à l'isomère *cis*, ainsi l'ajout de ces composés est fréquemment utilisé en agroalimentaire, comme dans les margarines (**Figure 2**) (M. Williams 2009; Loconto 2006).

Alors que le nom systématique des acides gras est défini par les racines grecs de la structure chimique de leur chaîne carbonée, la dénomination commune des acides gras est souvent associée à la source alimentaire ou au tissu dans lequel l'acide gras a été découvert ou dans lequel il est le plus présent (**Tableau 1**). Par exemple, l'acide *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque ou C22:6 n-3 (DHA) est communément appelé acide cervonique car il a été découvert dans le cerveau dans lequel il est très riche. L'acide eicosapentaénoïque ou C20:5n-3 (EPA) est dénommé acide timnodonique car son taux est élevé dans le thon. L'acide docosapentaénoïque ou C22:5 n-3 (DPA) est quant à lui appelé acide clupanodonique car il est retrouvé principalement dans les poissons de la famille des clupéiformes dont fait partie le clupanodon (**Figure 3**).

La suite de cette première partie se focalisera principalement sur les AGPI des familles n-3 et n-6, en s'intéressant de temps en temps aux lipides d'origine laitière. Le métabolisme des acides gras sera aussi plus détaillé au niveau du foie, du cerveau et du cœur.

1.2 Métabolisme et voie de conversion des AGPI

1.2.1 Anabolisme

Les principaux sites de la lipogenèse, ou synthèse des acides gras, sont le foie ainsi que le tissu adipeux. Chez les Mammifères allaitants, la glande mammaire constitue également un lieu de synthèse des acides gras et constitue le seul tissu au sein duquel la synthèse *de novo* des acides gras à courtes chaînes (AGCC) a été décrite (Griffin and Sul 2004).

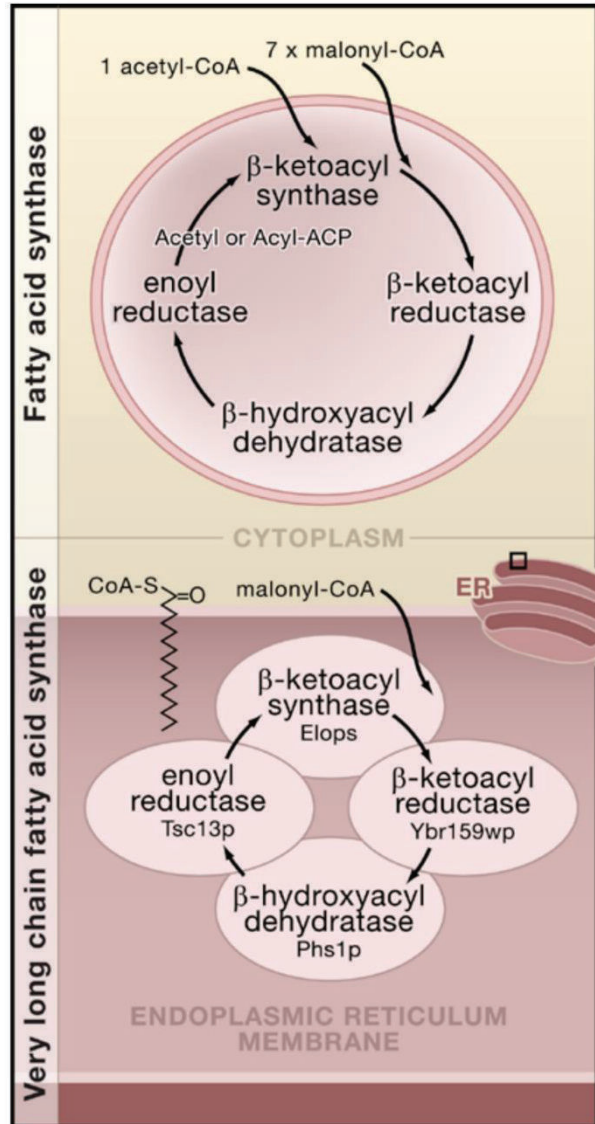


Figure 4. Voie de la lipogénèse utilisant deux complexes enzymatiques

D'après Riezman, 2007.

Les acides gras sont synthétisés dans le cytoplasme par une fatty acid synthase qui utilise de l'acétyl-CoA et 7 molécules de malonyl CoA pour former un palmitoyl-CoA. La synthèse nécessite une série itérative de quatre réactions effectuées par une β -cétoacyl synthase, une β -cétoacyl réductase, une β -hydroxyacyl déshydratase et une énoyl réductase conduisant à un acyl-ACP complètement saturé.

La synthèse qui produit des acides gras à très longue chaîne contenant plus de 16 atomes de carbones se trouve dans le réticulum endoplasmique et effectue également un cycle d'itération similaire de la synthèse des acides gras (élongation) en utilisant comme substrats le malonyl-CoA et l'acyl-CoA.

Un acétyl-CoA est tout d'abord carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). La Fatty Acid Synthase (FAS), qui est un complexe multienzymatique, permet ensuite de synthétiser des acides gras saturés dans le cytosol par condensation de molécules de malonyl-CoA (**Figure 4**). La FAS forme tout d'abord un acyl-CoA à 4 carbones (butyryl-CoA) à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, par un cycle de quatre réactions : i) condensation des deux substrats et de décarboxylation (avec libération de CO₂) : ii) 1^{ère} réduction, iii) déshydratation, iv) 2^{ème} réduction. La répétition de ces quatre réactions, appelée hélice de Wakil, conduit à l'élongation de l'acyl-CoA par groupe de deux carbones à chaque cycle (S. J. Wakil, Stoops, and Joshi 1983). Cette synthèse est consommatrice d'ATP et nécessite comme cofacteur du Nicotidamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP) et du Coenzyme A (CoA). Cependant, elle ne permet de synthétiser des acides gras saturés à plus de 16 carbones ou des acides gras insaturés, le palmitoyl-CoA pouvant être hydrolysé par la thioestérase I, incluse dans le complexe FAS, et libéré dans le cytoplasme (N. Singh, Wakil, and Stoops 1984).

L'élongation des acides gras saturés à plus de 16 atomes de carbone est réalisée dans le réticulum endoplasmique et effectue également un cycle de répétition similaire de la synthèse des acides gras (élongation) en utilisant comme substrats le malonyl-CoA et l'acyl-CoA à allonger (Oh et al. 1997). Contrairement à la synthèse des acides gras jusqu'à 16 atomes de carbones, la synthèse des acides gras saturés à très longues chaînes ne nécessite pas une protéine transporteuse. Les enzymes respectives dans les deux complexes effectuent des réactions similaires, mais ont néanmoins très peu d'homologie séquentielle (Riezman 2007).

1.2.2 Biosynthèse des AGPI-LC chez l'animal

Les AGPI sont répartis en 4 familles caractérisées par la place de la double liaison à partir de l'extrémité méthyle. Les voies de biosynthèse de ces acides gras à partir de leur précurseur sont fortement régulées. On distingue 4 familles d'AGPI : les AGPI n-3 et n-6 ainsi que les AGPI n-9 et n-7. La biosynthèse des AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) nécessite une suite de réactions enzymatiques comprenant la désaturation, l'élongation et la β -oxydation.

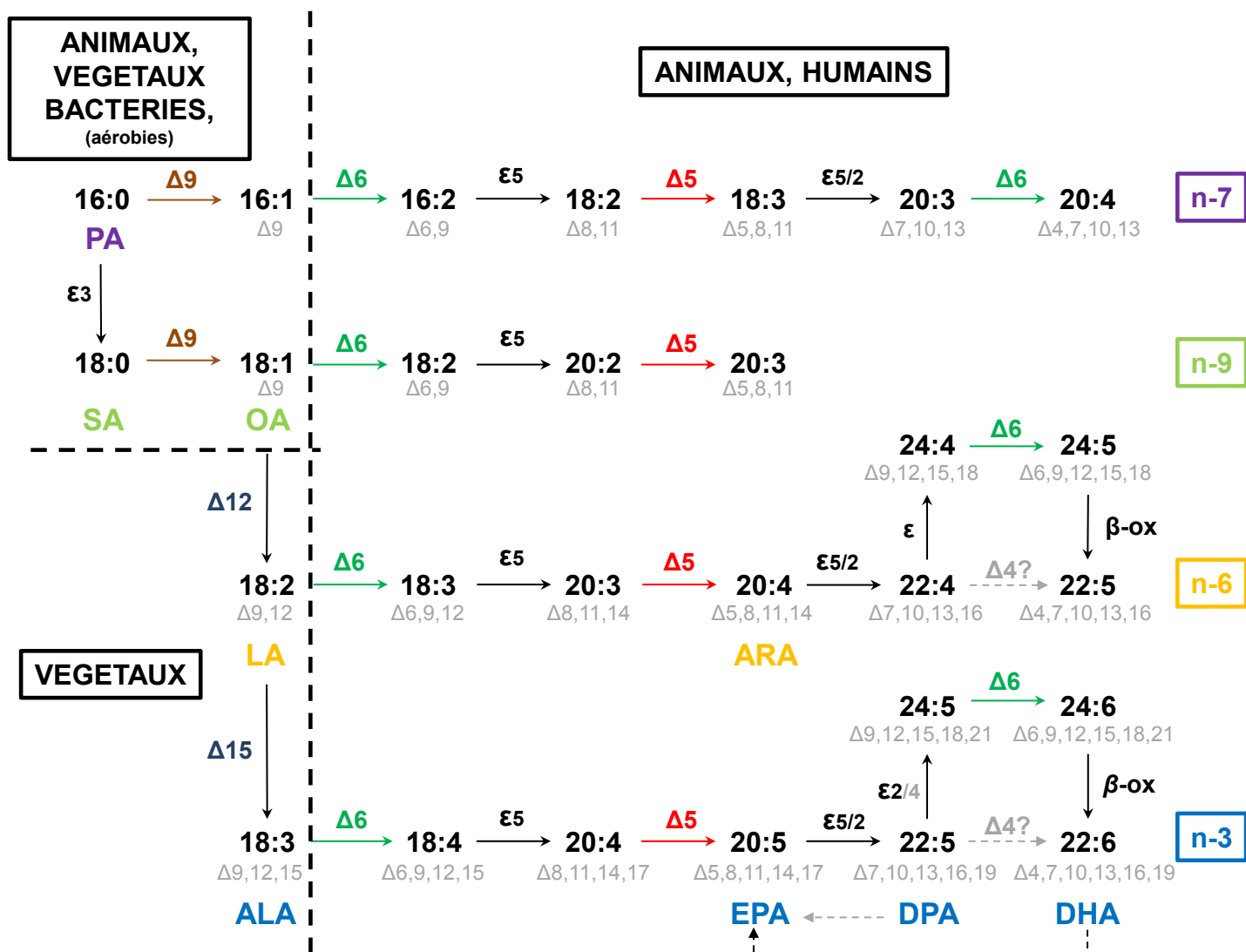


Figure 5. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés chez l'animal.

Le symbole Δx indique une désaturation en position x. Le symbole ϵ indique une élongation du coté carboxyle. Le symbole β indique une β -oxydation peroxysomale. Les flèches en pointillées correspondent aux voies de retroconversion. Les symboles grisés indiquent des réactions avec un faible niveau d'évidence chez l'homme. Les familles n-7 et n-9 ne sont pas essentielles car leur précurseur est synthétisable pas l'animal. Les précurseurs de la famille n-6 et n-3, l'acide linoléique (LA) et l'acide α -linoléinique (ALA) constituent des acides gras essentiels car ils ne sont pas synthétisables par l'animal.

SA : acide stéarique, OA : acide oléique, ARA : acide arachidonique, EPA : acide eicosapentaénoïque, DPA : acide docosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque.

1.2.2.1 Famille des AGPI n-6 et n-3

1.2.2.1.1 Désaturases

Chez les Mammifères, la biosynthèse des dérivés AGPI n-6 et n-3, à partir de leur précurseur essentiel respectif d'origine végétale, le LA et l'ALA, a lieu principalement dans le foie et plus particulièrement dans les hépatocytes. Cette conversion consiste en une succession de réactions de désaturation, d'élongation et de β -oxydation partielle (Howard Sprecher 2000; Pereira, Leonard, and Mukerji 2003) (**Figure 5**). La biosynthèse des AGPI-LC nécessite dans un premier temps l'intervention des enzymes désaturases (Brenna 2002).

Les $\Delta 6$ - et $\Delta 5$ - désaturases sont majoritairement actives dans le foie où a lieu l'essentiel de la conversion du LA et de l'ALA en dérivés AGPI-LC (Bézar et al. 1994). Elles sont décrites comme des enzymes microsomales spécifiques permettant l'introduction d'une double liaison sur la chaîne carbonée des AGPI. La $\Delta 6$ -désaturase intervient à deux étapes de la biosynthèse des AGPI en ajoutant une insaturation entre les carbones 6 et 7 des deux précurseurs LA et ALA pour former respectivement le C18:3 n-6 et le C18:4 n-3 ainsi que sur les dérivés C24:4 n-6 et C24:5 n-3 pour former le C24:5 n-6 et le C24:6 n-3 (Andrea et al. 2002; Guillou et al. 2003). Une meilleure affinité pour l'ALA comparativement au LA dans le cas de la $\Delta 6$ -désaturase a été décrite (R R Brenner 1981). La $\Delta 5$ -désaturase catalyse l'introduction d'une double liaison entre les carbones 5 et 6 du C20:3 n-6 et du C20:4 n-3 et forme ainsi respectivement l'acide arachidonique (ARA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Andrea et al. 2002).

Les différents substrats des désaturases doivent préalablement être activés sous forme d'acyl-CoA pour être reconnus (Y. A. Moon and Horton 2003; Grevengoed, Klett, and Coleman 2014). Cette activation est effectuée par l'acyl-CoA synthétase dans le réticulum endoplasmique. Les mécanismes précis des $\Delta 6$ - et $\Delta 5$ -désaturases sont encore mal connus mais ils sont considérés comme semblables à celui de la $\Delta 9$ -désaturase qui est bien décrit (Jeffcoat et al. 1977; Strittmatter et al. 1974; Tosi et al. 2014). La $\Delta 9$ -désaturation nécessite un complexe de trois protéines : i) la NADH cytochrome b5 réductase, ii) le cytochrome b5, iii) la protéine désaturase elle-même. Ce complexe forme une chaîne de transfert d'électron jusqu'au site catalytique des enzymes, qui permet la réduction finale d'un oxygène moléculaire (O_2) en H_2O et la formation d'une double liaison entre les carbones impliqués (**Figure 6**).

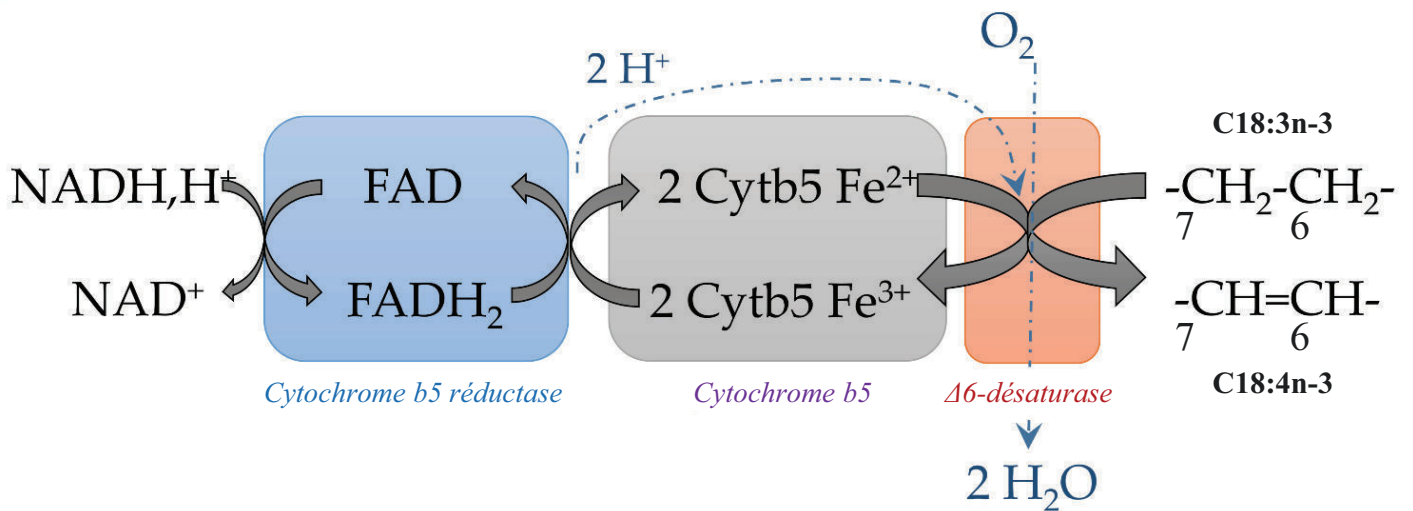


Figure 6. Mécanisme schématique de la $\Delta 6$ -désaturation

Adapté de *Paton et Ntambi, 2009*.

Le mécanisme de la $\Delta 6$ -désaturation est basé sur la description du mécanisme de la $\Delta 9$ -désaturation.

A la fin des années 90, la $\Delta 5$ -désaturase a tout d'abord été clonée chez *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. 1998), puis chez l'Homme (Cho, Nakamura, and Clarke 1999a; A E Leonard et al. 2000), et la $\Delta 6$ -désaturase chez *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. 1998) puis chez le rat (Aki et al. 1999) et enfin chez l'Homme. Cela a permis de démontrer que ces gènes sont particulièrement exprimés dans le foie, le cerveau et le cœur. Par Northern Blot, il a été observé que les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sont fortement exprimées dans le foie, le tissu adipeux ou encore le cerveau chez l'Homme (Cho, Nakamura, and Clarke 1999b). Les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sont codées par les gènes d'un *cluster* nommé fatty acid desaturase (*fads*). La quantification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) quantitative des transcrits humains a montré que ces gènes sont également exprimés dans la glande surrénale, le cervelet ainsi que dans la prostate (pour la $\Delta 6$ -désaturase) (A E Leonard et al. 2000). En 2000, Marquardt s'est intéressé à la région du chromosome 11 humain dans laquelle sont situés les gènes codant pour les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases afin de mieux caractériser leur structure génomique (Marquardt et al. 2000). Les séquences codantes ont été nommées *Fads1* pour la $\Delta 5$ -désaturase et *Fads2* pour la $\Delta 6$ -désaturase. Cette étude a conduit à la découverte d'un troisième transcrit nommé *Fads3*, présentant près de 65% d'homologie avec *Fads1* et *Fads2* (W. J. Park et al. 2009, 2012). Cette forte homologie de séquence a entraîné l'hypothèse de l'existence d'une nouvelle désaturase (Pédrono et al. 2010) puis à la démonstration de l'activité de $\Delta 13$ -désaturation (Vincent Rioux et al. 2013). L'étude de ce *cluster* a également permis de mettre en évidence des régulations très fines des désaturases à la fois par des facteurs de transcription mais aussi par les AGPI eux-mêmes qui sera traité un peu plus loin dans ce manuscrit. L'analyse des séquences d'acide aminés de la $\Delta 6$ -désaturase a aussi montré que la relation phylogénétique entre le rat et l'Homme sont très proches pour cet enzyme (Seiliez et al. 2001).

1.2.2.1.2 Voie de Sprecher et $\Delta 4$ -désaturase

L'existence d'une $\Delta 4$ -désaturase pour synthétiser le C22:5 n-6 à partir du C22:4 n-6 et le DHA à partir du DPA a été proposée (Rodolfo R. Brenner 1971; M D Rosenthal 1987; Grønn et al. 1990) puis démontré dans des cultures de fibroblastes humain atteints du syndrome de Zellweger et donc ne possédant pas de peroxyosomes (Grønn et al. 1990). puis chez *Thraustochytrium sp* (Qiu, Hong, and MacKenzie 2001), au sein des micro-algues *Pavlova lutheri* (Tonon et al. 2003) et *Isochrysis sphaerica* (B. Guo et al. 2013). Plus récemment une activité $\Delta 4$ -désaturase a été montrée chez les vertébrés dans des modèles de levures

recombinantes (Y. Li et al. 2010), ainsi que chez le poisson (*Teleost fish*) (Obloh et al. 2017) et impliquerait la même séquence génique que *Fads2*. Chez l'Homme, l'équipe de Brenna a montré que des cellules tumorales mammaires humaines dépourvues de la $\Delta 6$ -désaturase et transfectées avec un vecteur fonctionnel de *Fads2* permettaient d'obtenir directement du DHA et du DPA n-6 à partir de l'ALA-d₅ et du LA-d₅ (H. G. Park et al. 2015). Néanmoins ces résultats restent controversés, car la démonstration est seulement basée sur l'absence des intermédiaires à 24 carbones marqués dans les cellules. Une $\Delta 4$ -désaturase des sphingolipides a aussi été identifiée et caractérisée chez la levure (*Candida albicans*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*), le lombric puis chez la souris et cette étude suggère que les sphingolipides $\Delta 4$ -désaturés fournissent un signal précoce nécessaire pour déclencher l'entrée des cellules dans les voies de différenciation méiotiques et spermatides pendant la spermatogenèse chez la drosophile (Ternes et al. 2002). Un an plus tard que la proposition de l'existence d'une $\Delta 4$ -désaturase, l'équipe de Sprecher a décrit une conversion du DPA en DHA et du C22:4n-6 en DPA n-6 en trois étapes : i) élongation, ii) $\Delta 6$ -désaturation, iii) β -oxydation peroxysomale partielle (Voss et al. 1991). Cette voie, encore appelée « Voie de Sprecher » par certains auteurs est maintenant largement acceptée (Andrea et al. 2002; Obloh et al. 2017).

La mitochondrie et le peroxysome contiennent la machinerie enzymatique nécessaire à la β -oxydation partielle du DHA (Hiltunen et al. 1986) qui a été précisé dans les années 2000 comme faisant intervenir un complexe multienzymatique (Ferdinandusse et al. 2001; Hui Min Su et al. 2001). L'étude de cellules de patients atteints du syndrome de Zellweger a démontré que l'étape de β -oxydation partielle a lieu principalement dans le peroxysome (Hui Min Su et al. 2001). Dans cette chaîne réactionnelle, l'acyl-CoA oxydase est l'enzyme limitante et parmi ses trois isomères identifiés, c'est l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) dénommée la palmitoyl-CoA oxydase qui est responsable de la β -oxydation des AGPI-LC (Wanders and Waterham 2006). Cette étape ne semble pas limitante dans la conversion du DPA jusqu'au DHA sauf en situation pathologique puisqu'il a tout de même été montré que le taux de DHA dans le cerveau est diminué de 70% chez les patients atteints du syndrome de Zellweger (Martinez 1995, 2001). En situation physiologique, les AGPI-LC n-3 pourraient inhiber la β -oxydation mitochondriale et induire l'entrée de ces AGPI-LC dans le peroxysome (Osmundsen and Bjørnstad 1985). De nombreuses interrogations restent en suspens concernant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des AGPI. En effet, si leurs activités sont correctement décrites, les mécanismes de désaturations et leurs régulations restent à déterminer plus précisément. L'activité récemment décrite de la $\Delta 8$ -désaturase codée par *Fads2* (W. J. Park et al. 2009, 2011) et la diversité de

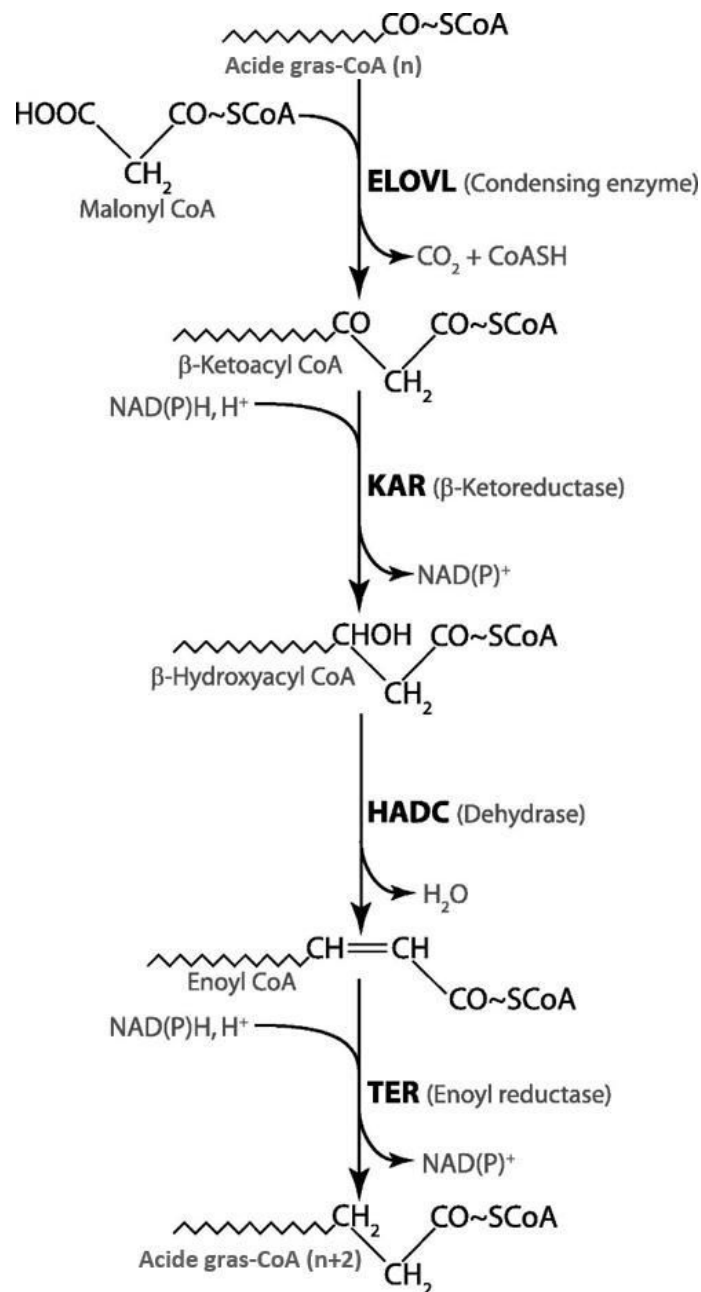


Figure 7. Chaîne de réactions enzymatiques pour l'élargissement des AGPI

Adapté de *Guillou et al. 2010*.

ELOVL, elongation of very-long-chain fatty acids; **KAR**, 3-ketoacyl-CoA reductase; **HADC**, 3-hydroxyacyl-CoA déhydratase; **TER**, trans-2,3,-enoyl-CoA reductase; **NAD(H)**, nicotinamide adénine dinucléotide; **NADP(H)**, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

substrats « mineurs » ou « atypiques » (acides gras à 24 carbones, C21:5 n-3...) montrent qu'il reste encore beaucoup à élucider.

1.2.2.1.3 Élongases

L'allongement des acides gras microsomaux implique l'addition d'unités à deux atomes de carbone à un acyl-CoA en utilisant le malonyl-CoA comme donneur et le NADPH comme agent réducteur. L'allongement est obtenu avec quatre réactions enzymatiques séparées (**Figure 7**): i) condensation entre l'acyl-CoA gras et le malonyl-CoA pour donner le 3-cétoacyl-CoA; ii) réduction du 3-cétoacyl-CoA pour générer le 3-hydroxyacyl-CoA; iii) déshydratation du 3-hydroxyacyl-CoA pour produire du trans-2-énoyl-CoA; et enfin, iv) réduction du trans-2-énoyl-CoA pour former l'acyl-CoA allongé (Cinti et al. 1992). Chez les mammifères, les deux réductions sont réalisées par la 3-cétoacyl-CoA réductase et la trans-2,3,-énoyl-CoA réductase, respectivement (Y. A. Moon and Horton 2003) et plusieurs isoformes ont été identifiées (Kihara 2012). Chez les mammifères, c'est la réaction de condensation initiale qui est limitante et cette réaction fait intervenir un autre type d'enzyme: les élongases (ELOVL, Elongation of Very Long-chain fatty acids) (Amanda E. Leonard et al. 2004), qui présentent une spécificité de substrat (Osei et al. 1989).

Sept gènes codant pour des élongases (*elovl*) ont été clonés chez les Mammifères (souris, rat, Homme) et différents isomères ont été identifiés. Si certains gènes codant pour les élongases sont exprimés de façon ubiquitaire (*elovl* 1, 5, 6), les autres isomères sont exprimés plus spécifiquement dans certains organes tels que le foie ou encore la rétine. Néanmoins les niveaux d'expressions spécifiques de chaque élongase en fonction des tissus et des espèces n'ont pas encore été démontrés (Guillou et al. 2010). Quatre isoformes sont présentes dans le foie avec des intensités d'expressions différentes. Ainsi, l'isoforme 5 est très exprimée dans le foie et rentre d'ailleurs en jeu dans deux des trois étapes d'élongation de la biosynthèse des AGPI-LC (Y. Wang et al. 2005) tandis que l'isoforme 2 catalyse majoritairement l'élongation du DPA et de l'acide adrénique (ou C22:4 n-6) (Gregory, Cleland, and James 2013) (**Figure 5**). ELOVL4 pourrait intervenir dans une moindre mesure que ELOVL2 dans l'élongation du DPA et de l'acide adrénique, mais est plutôt décrite pour l'allongement des AGPI à très longues chaînes, supérieure à 24 atomes de carbones (Agbaga et al. 2008), néanmoins cette élongase ne serait pas exprimée chez l'homme (Kitazawa et al. 2009).

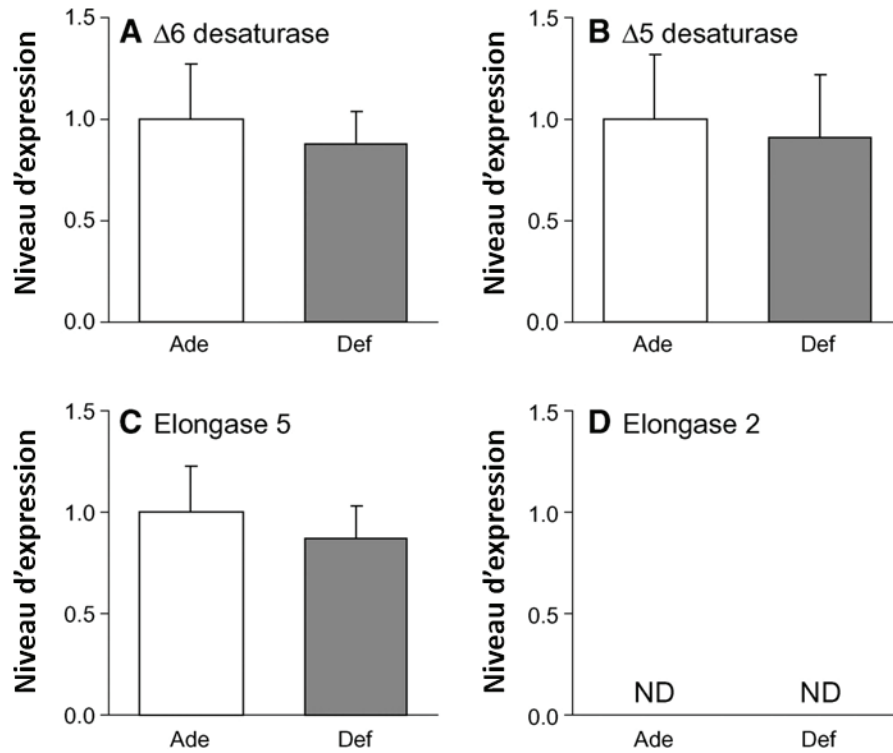


Figure 8. Expression des élongases et des désaturases des AGPI-LC dans le cœur

Adapté de *Igarashi et al., 2008*.

Les histogrammes représentent le niveau d'expression relatif des ARNm codant pour la Δ6-désaturase (A), la Δ5 désaturase (B), l'élongase-5 (C), et l'élongase-2 (D) dans le cœur de rats nourris avec un régime contenant un statut adéquat en acide α-linolénique (ALA) (Ade) ou un régime déficient en ALA (Def). Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne ± SD (n=10/groupe).

Longtemps considérées comme des enzymes non limitantes et sans régulation spécifique, les données sur les élongases restent pauvres comparativement aux désaturases et peu de données existent concernant leur régulation. Les premières études de caractérisation et de régulation ont eu lieu à la fin du XX^{ème} siècle (Toke and Martin 1996; Tvrdik et al. 2000) et de nouvelles méthodes d'analyses et de mesures des activités et des expressions des différentes élongases ont été mises en place quelques années après (Kitazawa et al. 2009) et ont fait l'objet d'une revue (Jump 2009). Les isomères ELOVL 1, 3, 6 et 7 ont une affinité supérieure pour les AGS et les AGMI tandis que les ELOVL 2, 4 et 5 sont plus spécifiques des AGPI-LC (Amanda E. Leonard et al. 2004; Guillou et al. 2010). Dans des levures recombinantes exprimant les différents gènes des élongases et des désaturases, il a été montré que la saturation de l'activité enzymatique associée au vecteur contenant *elovl2* était atteinte pour des concentrations plus faibles en substrat que pour *fads2* et bien plus rapidement que pour *elovl5* (Gregory et al. 2011; Gregory, Cleland, and James 2013). Dans le foie, le taux d'expression des sous-unités ELOVL se classe comme suit : 5>1=2=6 (Y. Wang et al. 2005). Cela remet en question la limitation de la voie de conversion des AGPI-LC par la seule $\Delta 6$ -désaturase. De façon assez intrigante, l'ELOVL2 n'est pas exprimé dans le cœur de rat (**Figure 8**), qui ne peut donc pas allonger le DPA en C24:5 n-3, le DHA cardiaque provient donc exclusivement du DHA circulant, alors qu'elle a été retrouvée chez l'Homme et la souris (Igarashi et al. 2008; Amanda E. Leonard et al. 2002), même si ce résultat est controversé (Kitson et al. 2012).

1.2.2.1.4 Rétroconversion du DHA

Le DHA peut subir une rétroconversion en EPA par un processus enzymatique impliquant également une β -oxydation peroxysomale (Conquer and Holub 1997; Stoffel et al. 1970). Le taux de rétroconversion maximum est estimé entre 9 et 12% chez l'Homme, associé à une supplémentation en DHA, arriverait à son maximum dès 4h après l'ingestion de DHA (Plourde et al. 2011), et serait d'environ 1-2% en conditions physiologiques (J. M. Alessandri et al. 2009). L'EPA produit est ensuite rapidement incorporé aussi bien dans les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylcholines (PC) que dans les esters de cholestérol (EC), mais aussi dans une moindre mesure dans les triglycérides (TG) (Grønn et al. 1991). L'EPA provenant de la rétroconversion du DHA peut être lui-même converti en DPA, qui s'incorpore principalement dans les phospholipides (PL) mais très peu dans les EC, contrairement à l'EPA (Brossard et al. 1996). L'ingestion de DHA entraîne souvent une

augmentation du statut en EPA. La rétroconversion du DHA en EPA est souvent estimée par le calcul entre les quantités d'EPA et de DHA présente dans un groupe contrôle non-supplémenté en DHA et un groupe supplémenté en DHA, on parle alors de rétroconversion apparente du DHA. Une récente étude chez le rat utilisant du DHA marqué ^{13}C a montré que la contribution de la rétroconversion du DHA ingéré en EPA reste minime par rapport à l'augmentation du statut total en EPA suite à l'ingestion d'ALA (Adam H. Metherel, Chouinard-Watkins, et al. 2017). Cela sous-entend que l'EPA provient principalement de sa conversion à partir des AGPI précurseurs, et qu'il doit exister des mécanismes de contrôle de la voie de conversion de l'EPA vers le DHA entraînant une accumulation de l'EPA dans les tissus.

1.2.2.2 Famille des AGPI n-7 et n-9

Contrairement aux familles des AGPI n-6 et n-3, les AGPI n-7 et n-9 peuvent être synthétisés *de novo* par l'organisme chez les Mammifères à partir d'acides gras saturés, l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), respectivement. La formation des précurseurs des AGPI n-7 et n-9, à savoir l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et l'acide oléique (C18:1 n-9) respectivement, nécessite l'intervention d'une enzyme : la Stéaroyl-CoA ou la $\Delta 9$ -désaturase, isolée et purifiée pour la première fois à partir de microsomes d'hépatocytes de rats en 1974 (Strittmatter et al. 1974). L'enzyme $\Delta 9$ -désaturase catalyse l'introduction d'une double liaison *cis*- sur le carbone situé en position 9 de la chaîne carbonée. Par exemple, la désaturation de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0), respectivement en acide palmitoléique (C16:1 n-7) et en acide oléique (C18:1 n-9), est effectuée par un complexe enzymatique microsomal de trois protéines: la NADH cytochrome b5 réductase, le cytochrome b et la $\Delta 9$ -désaturase. Comme présenté pour la $\Delta 6$ -désaturase, ce complexe forme une chaîne de transfert d'électrons jusqu'au site catalytique de la $\Delta 9$ -désaturase qui permet la réduction finale d'un oxygène en H_2O et la formation d'une double liaison entre les carbones situés en position 9 et 10 (**Figure 6**) (Jeffcoat et al. 1977; Paton and Ntambi 2009). Au sein de l'organisme, les dérivés à longue chaîne des AGPI n-7 et n-9 sont représentés de façons minoritaires dans les tissus mais peuvent apparaître en quantités plus élevées lors du développement de carences nutritionnelles. Par exemple, une augmentation de l'acide de MEAD (C20:3 n-9) dans les tissus relève d'une carence en AGPI n-6 et n-3 (Chu and Hegsted, 1981).

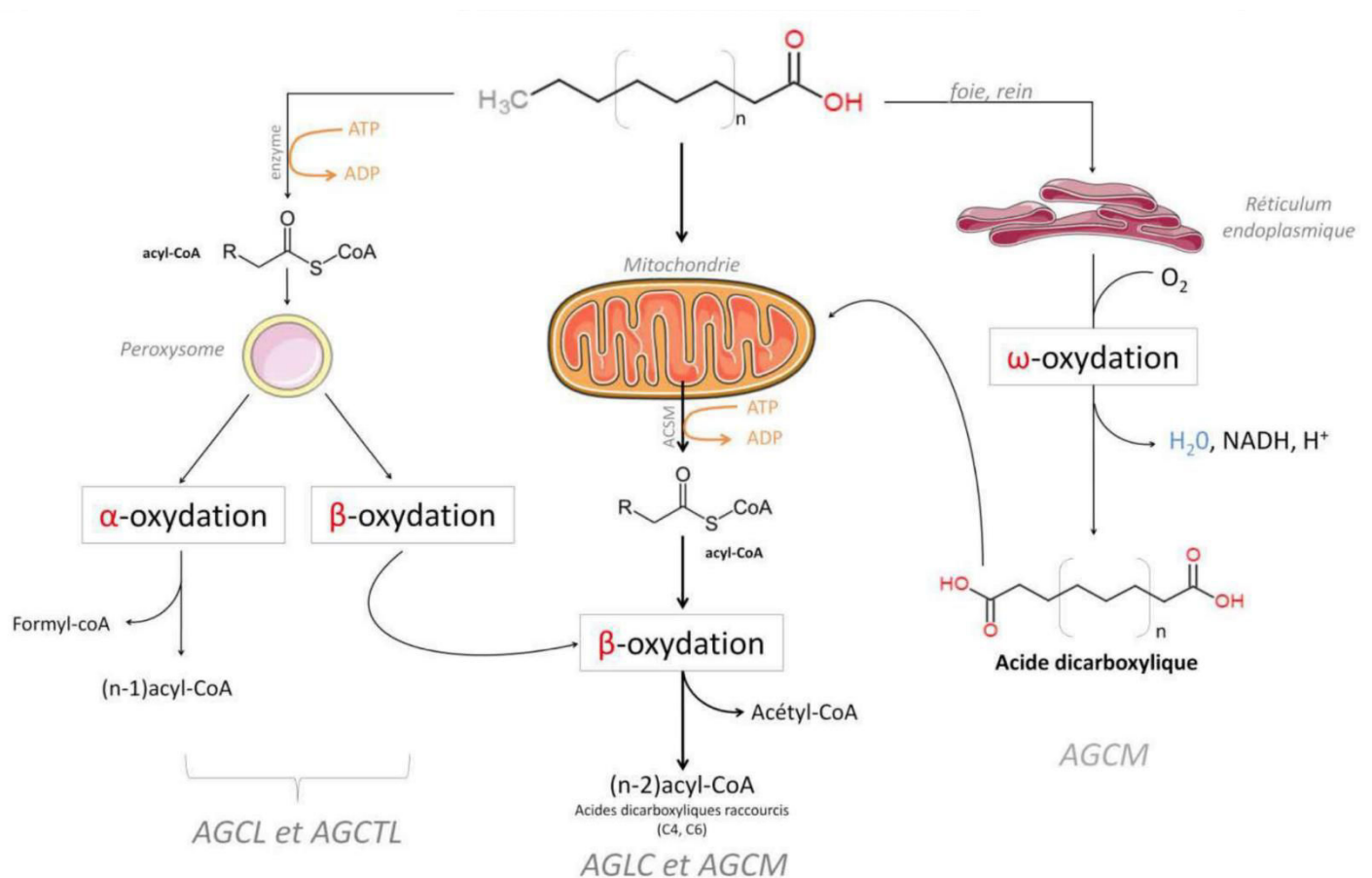


Figure 9. Voies cataboliques des acides gras selon la longueur de la chaîne carbonée

D'après Lemarie, 2018.

Les acides gras à chaîne longue (AGCL) et les acides gras à chaîne très longue (AGCTL) peuvent être α ou β -oxydés dans les peroxysomes. Les AGLC et les acides gras à chaîne moyenne (AGCM) peuvent être β -oxydés après activation sous forme d'acyl-CoA, dans la matrice mitochondriale. Les produits de la β -oxydation mitochondriale sont l'acétyl-CoA, l'ATP et des cofacteurs réduits. Dans le foie et les reins, les AGCM peuvent aussi être ω -oxydés en acides dicarboxyliques, pouvant ensuite être redirigés vers les mitochondries pour être β -oxydés en acides dicarboxyliques plus courts.

1.2.3 Catabolisme

Le catabolisme des AGPI représente leur principal devenir métabolique (Ghasemifard et al. 2015) (**Figure 9**). Préalablement à la β -oxydation mitochondriale, les AGPI doivent être internalisés dans la matrice mitochondriale par l'action de l'enzyme carnitine palmitoyltransférase (CPT-1), contrairement aux acides gras à chaînes courtes et moyennes (AGCM) (Clouet, Niot, and Bézard 1989; Bézard et al. 1994). Avant leur intégration dans la mitochondrie, les AGPI-LC peuvent préalablement subir une première étape de β -oxydation peroxysomale (Ferdinandusse et al. 2001). Au sein de la matrice mitochondriale, les acides gras vont tous être raccourcis selon la même chaîne de réaction en entrant dans l'hélice de Lynen. Leur catabolisme va permettre la formation d'acétyl-CoA qui pourra être oxydé dans le cycle de Krebs ou réutilisé dans des voies de synthèse et la formation de NADH et de FADH₂, nécessaires à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire.

Il existe également une voie métabolique mineure, la ω -oxydation. Elle a lieu dans le réticulum endoplasmique du foie et des reins, principalement quand le taux d'acétyl-CoA est trop important par rapport à la quantité d'acide oxaloacétique disponible et nécessaire à la réaction d'oxydation du cycle de Krebs. Elle produit des acides dicarboxyliques pouvant ensuite être redirigés vers les mitochondries pour être β -oxydés en acides dicarboxyliques plus courts. Les acétyl-CoA sont alors transformés en corps cétoniques ou utilisés pour la synthèse *de novo* d'acides gras à chaîne longue (Van Wymelbeke, Louis-Sylvestre, and Fantino 2001). Néanmoins cette voie reste préférentielle pour les AGCM (Wanders, Komen, and Kemp 2011).

Le devenir des acides gras dans la cellule est dépendant de la longueur de leur chaîne carbonée : plus un acide gras est court, plus son catabolisme est rapide (V Rioux et al. 2003). Ainsi, les acides gras à courte chaîne sont préférentiellement β -oxydés par rapport aux acides gras avec une chaîne à plus de 12 carbones chez le rongeur (Van de Heijning et al. 2017) comme chez l'Homme (DeLany et al. 2000). Pour une même longueur de chaîne carbonée, le nombre et l'emplacement des insaturations vont aussi influencer sur le taux de β -oxydation des acides gras, ainsi, la β -oxydation de l'ALA est supérieure à celle de l'acide oléique (C18:1 n-9), elle-même supérieure à celle de LA (Leyton, Drury, and Crawford 1987). Le taux de β -oxydation de l'ALA ingéré retrouvé dans des études utilisant des traceurs isotopiques varie en fonction du temps de mesure, de la condition physiologique de l'individu (à jeun, obèse...). Néanmoins on considère que plus de 75% de l'ALA ingéré est oxydé partiellement sous forme d'acétate ou totalement en CO₂ (Burdge et al. 2003). Environ 20% de l'ALA ingéré est complètement oxydé en 9h, et 33% en 48h (DeLany et al. 2000)

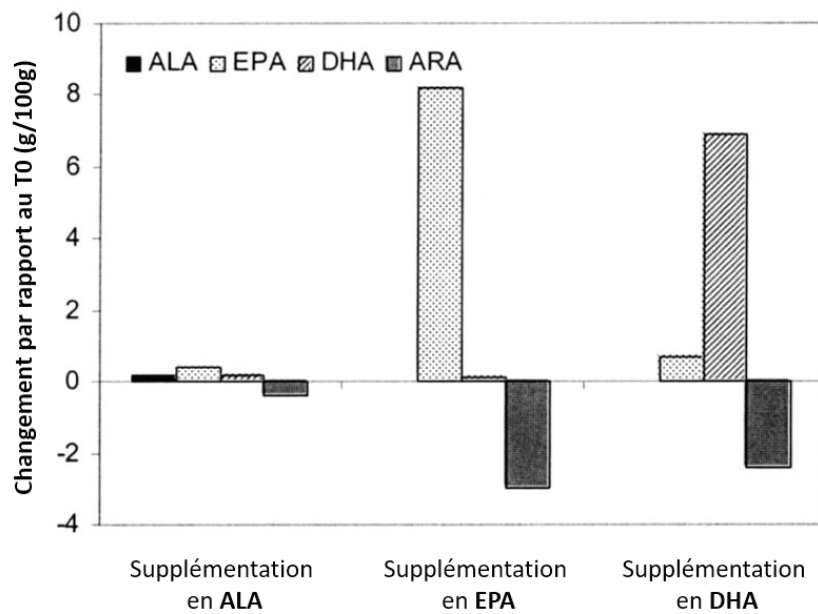


Figure 10. Effet d'une supplémentation en ALA, EPA et DHA sur le taux plasmatique d'AGPI-LC n-3

Adapté de *Arterburn et al., 2006*.

Concentrations plasmatiques en acides gras des phospholipides d'individus consommant 3.7g/j d'ALA, 4g/j d'EPA ou 4g/j de DHA (étude croisée chez l'Homme). Seule la supplémentation en DHA augmente le statut plasmatique en DHA. ARA : acide arachidonique

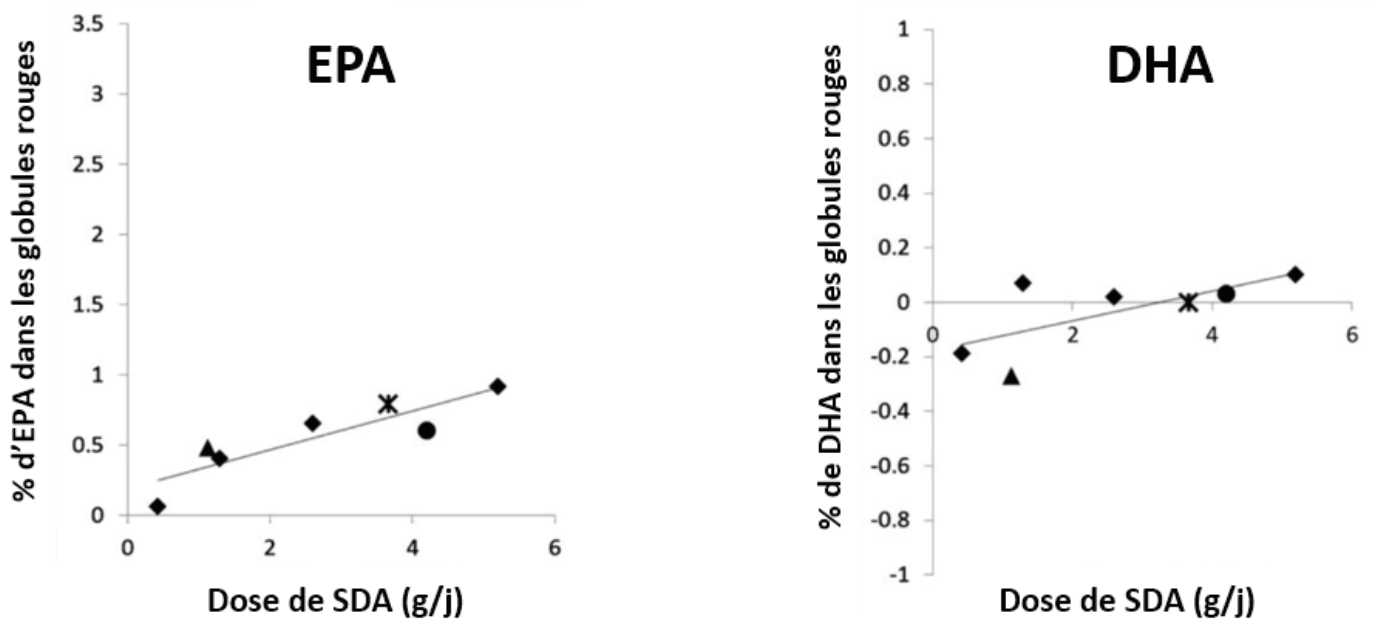


Figure 11. Effet d'une supplémentation en acide stéaridonique sur le taux d'AGPI-LC sanguin

Adapté de *Walker et al., 2013*.

Etude croisée chez l'homme de l'effet dose d'une supplémentation en acide stéaridonique

1.3 Régulation nutritionnelle de la conversion des AGPI

La conversion des AGPI va être influencée par la quantité et la composition de l'apport nutritionnel, le sexe, l'âge, le statut physiologique et des facteurs génétiques.

1.3.1 Notion de saturation de la voie de conversion des AGPI

Les $\Delta 6$ - et $\Delta 5$ - désaturases ainsi que les ELOVL2 et 5 sont les enzymes clés de la voie de biosynthèse des AGPI-LC, et la $\Delta 6$ -désaturation a longtemps été considérée comme la plus limitante (Tosi et al. 2014; Rodriguez et al. 1998; Cook et al. 1991). En effet, les études de supplémentation en ALA dans le régime ont montré que peu importe la dose d'ALA ingérée, la quantité de DHA plasmatique retrouvée n'augmentait pas jusqu'au niveau d'une supplémentation directe en DHA (Guillou et al. 2010). Lors de la conversion de l'ALA en dérivés n-3 à longue chaîne, aucune accumulation des intermédiaires de synthèse C18:4 n-3 et C20:4 n-3 n'est observée. Cela suggère que la $\Delta 5$ -désaturation ait lieu plus rapidement que la $\Delta 6$ -désaturation et donc que la $\Delta 5$ -désaturase, de même que ELOVL5 ne sont pas des enzymes limitantes dans cette voie métabolique (**Figure 10**) (Arterburn, Hall, and Oken 2006; Amanda E. Leonard et al. 2004; Jakobsson, Westerberg, and Jakobsson 2006).

De nombreuses études ont essayé sous de nombreuses conditions nutritionnelles et physiologiques d'induire la voie de la conversion des AGPI-LC n-3 jusqu'à augmenter son dérivé final, sans succès. La $\Delta 6$ -désaturase étant considéré comme l'enzyme limitante et intervenant deux fois dans la voie de conversion des AGPI-LC n-3 à partir de l'ALA, l'ajout de dérivés n-3 aurait pu entraîner une augmentation du DHA en « outrepassant » la première étape de désaturation. Néanmoins, en comparaison avec une supplémentation en ALA dans le régime, la supplémentation avec de l'acide stéaridonique (SDA, C18:4 n-3) chez le rat (Kawabata et al. 2013) et chez l'Homme (J. Whelan, Gouffon, and Zhao 2012) entraîne une augmentation de l'EPA et du DPA dans une moindre mesure mais pas du DHA (**Figure 11**). L'augmentation est néanmoins plus importante avec les régimes supplémentés en SDA et 20% du SDA est converti jusqu'à l'EPA chez l'Homme (Walker, Jebb, and Calder 2013). La supplémentation du régime en EPA entraîne une augmentation de l'EPA et du DPA plasmatique mais toujours pas du DHA.

Plus récemment, il a été montré que l'activité de ELOVL2 serait plus limitante que celle de la $\Delta 6$ -désaturase (Gregory et al. 2011), renforçant l'argumentaire que la voie de conversion est

saturée au niveau du DPA pour les AGPI n-3 et du C22:4 n-6 pour la famille des n-6. Pour étayer cette hypothèse, l'ajout de $^{14}\text{C}24:5$ n-3 ou de $^{14}\text{C}24:6$ n-3 dans le milieu de culture d'astrocytes de rat pendant 24h (50 μM) entraînent une conversion en DHA quasi-totale de ces deux acides gras en DHA (Williard et al. 2002; Henderson et al. 1998). Ainsi, la question se pose de savoir si le DPA pourrait être un bon précurseur pour augmenter la conversion de la voie des AGPI n-3 jusqu'au DHA, comme son addition permettrait d'outrepasser l'élongation de l'EPA en DPA réalisée par ELOVL2 (Kaur et al. 2010).

1.3.2 Régulation génique

Les régulations nutritionnelles des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ - désaturases ainsi que des élongases ont été décrites principalement au niveau transcriptionnel et de nombreuses études tentent de trouver les conditions physiologiques et nutritionnelles optimales permettant d'augmenter la conversion de l'ALA jusqu'au DHA. En effet, aucune régulation au niveau protéique comme des modifications post-traductionnelles n'a été montrée à ce jour sur la $\Delta 6$ -désaturase proprement dite, sûrement à cause de la faible quantité cellulaire de ces protéines rendant leur identification par Western Blot très limitante. Néanmoins, l'identification d'inhibiteurs des désaturases et des élongases hépatiques et de modèles de rongeurs KO facilitent maintenant l'étude des régulations de ces enzymes (L. Zhang et al. 2010).

Chez la souris, un régime supplémenté en huile de carthame ou de maïs (riches en LA) pendant cinq jours conduit à une baisse des niveaux d'expressions géniques des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases dans le foie. Au contraire, une autre étude a montré qu'avec des régimes riches en huile de tournesol (52% LA et 14% ALA) ou en huile de lin (12% LA et 61 % ALA), les expressions des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ - désaturases sont respectivement multipliées par 2,5 et 3,5 (Christiansen et al. 1991). La régulation des désaturases par les AGPI n-6 et n-3 est controversée et reste encore à élucider. Notamment, l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif sur leur propre voie de biosynthèse est encore débattue (M. Nakamura et al. 2004; M. T. Nakamura and Nara 2003). Il a été suggéré que le manque de concordance de ces études pouvait être dû à la variabilité des régimes expérimentaux et du statut nutritionnel (Skrzypski et al. 2009). En effet, l'inhibition des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases par le LA et l'ALA est observée dans le cadre de régimes riches en glucose (Blond and Lemarchal 1984; Cho, Nakamura, and Clarke 1999c, 1999a). Très souvent, les régimes expérimentaux sont comparés à un régime contrôle lipidoprive (sans lipides) dans lequel les activités de désaturation semblent surestimées. A l'inverse, les études rapportant un

effet activateur des précurseurs LA et ALA sur les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sont basées sur des régimes riches en amidon (et non en glucose) et comparés à un contrôle non lipidoprive (Christiansen et al. 1991; Skrzypski et al. 2009).

Par ailleurs, les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sont régulées positivement par le facteur de transcription SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) comme la plupart des enzymes de la lipogénèse (Jay D. Horton, Goldstein, and Brown 2002). Etant inhibiteurs de SREBP-1c, les AGPI pourraient agir indirectement sur la répression de l'expression génique de ces désaturases comme le suggère une étude chez le rat basée sur des régimes enrichis en EPA et en DHA (Grønn et al. 1992). Cependant, chez un animal nourri, l'effet activateur sur SREBP-1c des facteurs lipogéniques comme l'insuline est supérieur aux effets des AGPI-LC : les $\Delta 6$ - et les $\Delta 5$ -désaturases resteraient donc régulées positivement (Guillou et al. 2003; Rimoldi, Finarelli, and Brenner 2001). De plus, le niveau d'expression de ces désaturases reste stable chez les animaux à jeun (Matsuzaka et al. 2002). Indépendamment de la voie SREBP-1c, cette régulation est aussi sous le contrôle de la voie PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) En effet, le facteur de transcription PPAR α peut être activé entre autres par les AGPI chez les animaux à jeun (Deckelbaum, Worgall, and Seo 2006). De plus, l'activité des désaturases serait aussi sous le contrôle de plusieurs hormones comme l'insuline, le glucagon et les glucocorticoïdes (Das 2005). Les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sont donc dépendantes du statut nutritionnel car régulées par des facteurs de transcriptions (SREBP-1c, PPAR α) leur conférant un statut particulier par rapport aux enzymes lipogéniques et cette régulation semble être en outre dépendante des espèces (Dong et al. 2017).

Concernant la régulation des élongases par des facteurs nutritionnels, très peu de données sont disponibles. Une étude a mis en évidence un impact des AGPI n-3 sur l'une des élongases parmi les six autres étudiées. Seule l'expression d'ELOVL5 semble être régulée et inhibée par les AGPI n-3. De plus, les auteurs relèvent également une possible interaction entre ELOVL5 et les $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases sous le contrôle de facteurs environnementaux, dont nutritionnels, plus prononcée pendant les premières années de vie du rat (Y. Wang et al. 2005). Un mécanisme lié au facteur de transcription PPAR α est suggéré une année plus tard (Jakobsson, Westerberg, and Jakobsson 2006).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont corrélié la modulation de l'expression et l'activité des élongases dans le développement de maladies métaboliques. Notamment, des études chez le rat ont montré le rôle prépondérant de l'isoforme ELOVL5 dans le développement du foie pendant la période post-natale (Y. Wang et al. 2005). Ainsi, l'utilisation d'un modèle KO (knock-out)

pour ELOVL5 (*elovl5* -/-) a permis de mettre en évidence une stéatose hépatique due à une activité renforcée de SREBP-1c et par conséquent de l'ensemble des enzymes de la lipogenèse (R. J. Moon et al. 2013). ELOVL6 semble davantage régulée par les facteurs nutritionnels et géniques que ELOVL5. Le promoteur d'*elovl6* étant une cible de certains facteurs de transcription, *elovl6* peut être induite par SREBP-1, le récepteur nucléaire des oxystérols (LXR, Liver X Receptor) et la protéine ChREBP (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein) ainsi que par l'insuline (Kumadaki et al. 2008). Le maintien de la sensibilité à l'insuline chez la souris déficiente pour *elovl6* est attribué en partie à un accroissement du ratio C16:1 n-7/C16:0 (Guillou et al. 2010).

1.3.3 Régulation par le substrat

1.3.3.1 *Par l'apport d'AGPI*

Les voies de conversion des AGPI n-3 et n-6 sont parallèles car il n'existe pas chez les mammifères de réactions permettant d'interconvertir un AGPI-LC n-3 et un AGPI-LC n-6. Néanmoins les deux chaînes réactionnelles utilisent les mêmes enzymes désaturases et élongases, ce qui entraîne une compétition des substrats entre les deux familles pour ces enzymes (Rahm and Holman 1964; Schmitz and Ecker 2008). La compétition de substrat existe aussi à l'intérieur d'une même voie, ainsi la Δ 6-désaturation du C24:5 n-3 en C24:6 n-3 est inhibée par de fortes concentrations en ALA, ce qui peut limiter l'accumulation du DHA dans les tissus, comme pour le C24:5 n-6 et le LA (Portolesi, Powell, and Gibson 2007). Les dérivés des voies n-7 et n-9 utilisent aussi les mêmes enzymes de conversion mais les affinités respectives de l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et de l'acide oléique (C18:1 n-9) pour la Δ 6-désaturase sont plus faibles que son affinité pour l'ALA et le LA. Néanmoins, l'acide oléique fait partie des acides gras majoritaires dans l'alimentation occidentale, en conséquence sa contribution dans la compétition pour le site actif de la Δ 6-désaturase n'est pas nulle (H. G. Park et al. 2018). De plus, l'affinité de la Δ 6-désaturase est plus importante pour l'ALA que pour le LA (H. Sprecher 2002). Cependant, dans le régime occidental pour lequel les AGPI peuvent représenter dans certains cas jusqu'à 20% de l'apport en lipides aux USA, le ratio LA/ALA est proche de 12 et une concentration élevée en LA peut réduire la synthèse d'AGPI-LC n-3 (Horrobin 1993; Schmitz and Ecker 2008). Ainsi, une augmentation de l'apport en ALA

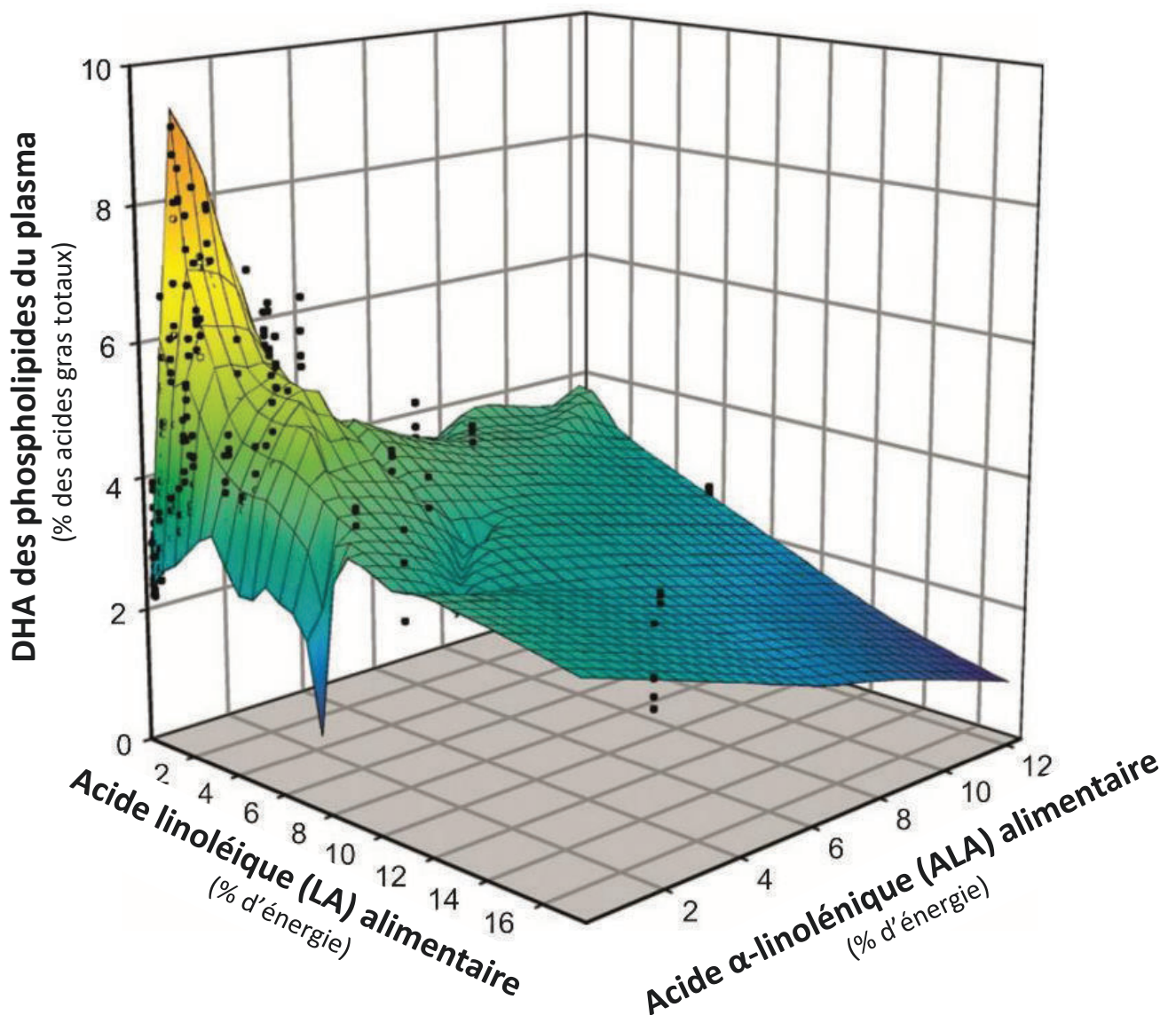


Figure 12. Taux de DHA plasmatique en fonction des quantité d'ALA et de LA du régime

Adapté de *Gibson et al., 2013.*

Graphique en 3 dimensions de la quantité relative de DHA présent dans les phospholipides du plasma en fonction des quantités d'acide linoléique (LA) et d'acide α -linoléique (ALA) présentes dans les 54 régimes donnés à des rats en post sevrage. Les quantités de LA varient de 0,07 à 17,1% d'énergie et les quantités d'ALA de 0,02% à 12,1% d'énergie. Le pic de DHA dans les phospholipides a été atteint dans une gamme alimentaire étroite de 1-3% en ALA et 1-2% en LA.

associée à une diminution de LA pourrait participer à augmenter la synthèse des AGPI-LC dont le DHA (Sinclair, Attar-Bashi, and Li 2002).

La conversion des AGPI en AGPI-LC va dépendre aussi bien de la quantité d'apport en AGPI que du rapport AGPI n-6 / AGPI n-3 (Takeuchi et al. 2008; Ketsa and Marchenko 2014; Boudreau et al. 1991). Ainsi, plusieurs auteurs stipulent que la conversion des AGPI n-3 est régulée plus fortement par les niveaux de substrat que par l'expression relative des *fads* et des *elovl* (Tu et al. 2010). Néanmoins, à cause de la difficulté de suivre l'activité et non pas l'expression des enzymes impliquées dans la conversion des AGPI, l'importance relative du ratio n-6/n-3 et de la quantité de précurseur ALA fait toujours débat (Goyens et al. 2006; Harnack, Andersen, and Somoza 2009).

En 2013, Gibson et collaborateurs ont soumis des rats sevrés à 54 régimes différents en faisant varier progressivement les quantités de LA de 0,07 à 17,1% d'énergie et les quantités d'ALA de 0,02% à 12,1% d'énergie, ainsi que les quantités de lipides dans les régimes de 5%, 10% à 20% d'énergie (R. A. Gibson et al. 2013). Les auteurs concluent qu'il est possible d'augmenter le statut plasmatique en DHA chez les animaux consommant seulement de l'ALA comme source d'AGPI n-3 mais seulement si le niveau d'AGPI alimentaire total est bas, c'est-à-dire inférieur à 3% de l'énergie (**Figure 12**). Ainsi, le pic maximal de DHA (48%) est atteint dans les PL du plasma pour une gamme alimentaire d'ALA allant de 1 à 3% d'énergie et de LA de 1 à 2% d'énergie, soit un ratio moyen proche de 1:1, ce qui est très loin d'une consommation alimentaire humaine, plus proche d'un ratio 12 en Europe (Enti, Opi, and On 2012). De plus, l'augmentation de l'ALA au-delà de 2% d'énergie dans le régime avait induit une diminution des taux de DHA par rapport à des quantités d'ALA plus réduites alors que les taux d'ALA, d'EPA et de DPA continuaient de croître. *A contrario*, les différences de ratio LA/ALA impactaient plus fortement les taux d'EPA principalement, puis de DPA, un faible ratio augmentant leurs proportions plasmatique respectives (R. A. Gibson et al. 2013). En situation inverse de carence, il semble que des voies de régulations prennent également en compte la charge en AGPI-LC de l'organisme afin d'en garantir une synthèse minimale permettant de fournir les métabolites oxygénés nécessaires au maintien métabolique (Lands et al. 1992). Néanmoins, la contribution relative de l'ALA, des différents dérivés n-3 (EPA, DPA, DHA) et les mécanismes nutritionnels la régulant restent encore mal connus. Pour le moment, il n'a pas été clairement démontré qu'un autre processus alimentaire que la consommation directe de DHA permettrait une augmentation du statut cérébral en DHA (Adam H. Metherel, Lacombe, et al. 2017).

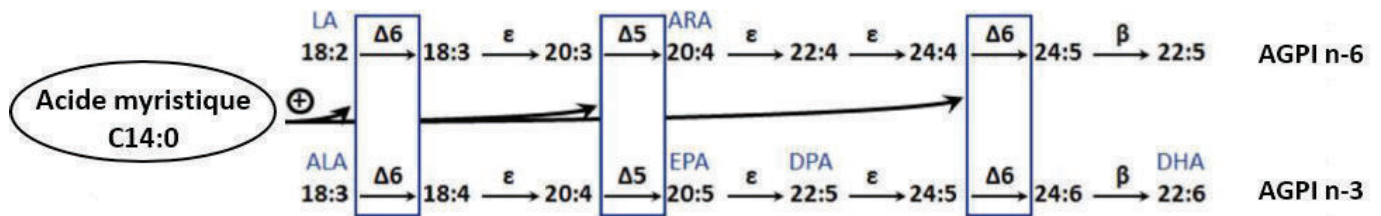


Figure 13. L'acide myristique augmente l'activité des enzymes désaturases

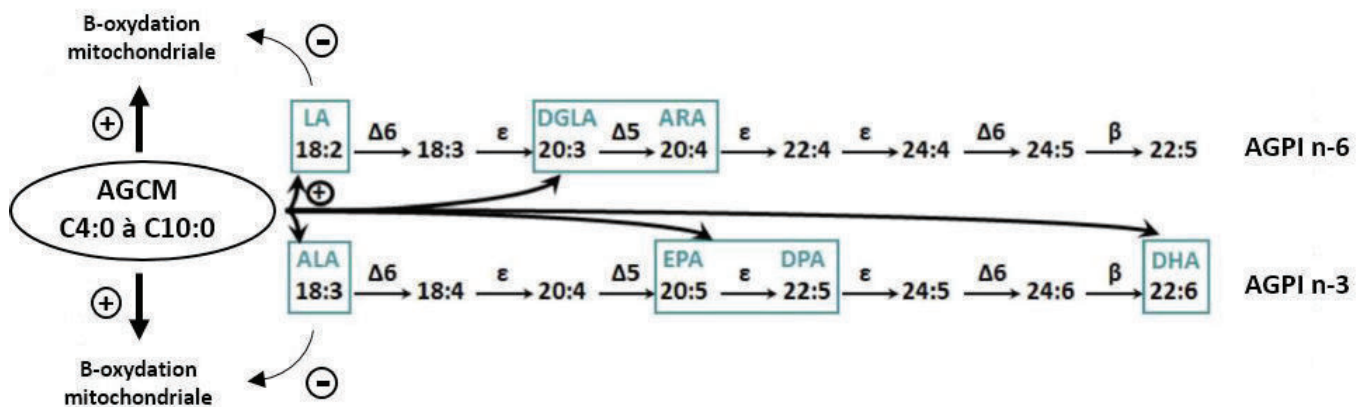


Figure 14. Les acides gras à chaînes courtes et moyennes protègent les précurseurs des AGPI et les AGPI-LC de la β-oxydation mitochondriale

1.3.3.2 Augmentation de la conversion par les acides gras saturés exogènes

Il a été montré que l'acide myristique (C14:0) augmentait l'activité des désaturases et la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 (**Figure 13**). Tout d'abord dans des cultures d'hépatocytes primaires de rats, l'ajout d'acide myristique augmentait l'activité de la $\Delta 5$ -désaturase surtout mais aussi de la $\Delta 6$ -désaturase de façon dose-dépendante et peu importe le substrat utilisé pour mesurer l'activité enzymatique (acide oléique, LA, ALA) (Sophie JAN, Hervé GUILLOU, Sabine D'ANDREA, Stéphanie DAVAL, Monique BOURIEL, Vincent RIOUX 2004), ce qui n'est pas le cas pour l'acide laurique (C12:0) et l'acide palmitique (C16:0), bien que le métabolisme du C14:0 soit associé à ces deux acides gras (V. Rioux, Catheline, and Legrand 2007). *In vivo*, la proportion d'EPA dans le foie est augmentée de façon dose dépendante en fonction de la quantité d'acide myristique supplémentée dans le régime allant de 0,2% à 1,2% de l'énergie (0,3% d'ALA dans tous les régimes) pendant deux mois chez le rat (Vincent Rioux et al. 2005). Dans une autre étude augmentant les doses d'acide myristique supplémenté dans les mêmes conditions (1% à 6% de l'énergie), la concentration en ALA a augmenté de façon dose-dépendante dans tous les tissus étudiés mais les taux d'EPA et de DHA ont aussi augmenté dans le cerveau et les globules rouges des animaux (V. Rioux et al. 2008). Chez l'homme, un régime contenant 1,2% d'acide myristique pendant 5 semaines a entraîné une augmentation des niveaux plasmatiques d'EPA et de DHA dans les PL et de DHA dans les EC (Dabadie et al. 2005). Dans ces études, aucun effet n'a été retrouvé sur les niveaux d'expression des ARNm de *Fads2*, laissant supposer un mécanisme d'action post-traductionnel de l'acide myristique sur l'augmentation des activités désaturases (Vincent Rioux, Pédrone, and Legrand 2011). Il a tout d'abord été proposé que l'activité de la $\Delta 6$ -désaturase pourrait être médiée par la N-myristoylation de l'enzyme, avant que cette hypothèse soit infirmée par la bio-informatique indiquant que l'enzyme n'était pas N-myristoylée (Beauchamp et al. 2007). Il y a 30 ans, la N-myristoylation de la cytochrome b5-réductase impliquée dans le complexe de désaturation a aussi été proposée mais n'a toujours pas été démontrée (Strittmatter et al. 1974).

Les acides gras à chaîne courtes et moyennes contenant 4 à 12 atomes de carbones sont préférentiellement β -oxydés par rapport à l'ALA ou au LA et peuvent donc contribuer à préserver une partie des précurseurs des AGPI de la β -oxydation, qui est leur principal devenir (P. J. H. Jones 1994; Dyall 2015; den Besten et al. 2013). L'augmentation de la concentration en précurseur entraînerait ensuite une augmentation de dérivés AGPI-LC (**Figure 14**) (Ezanno et al. 2015).

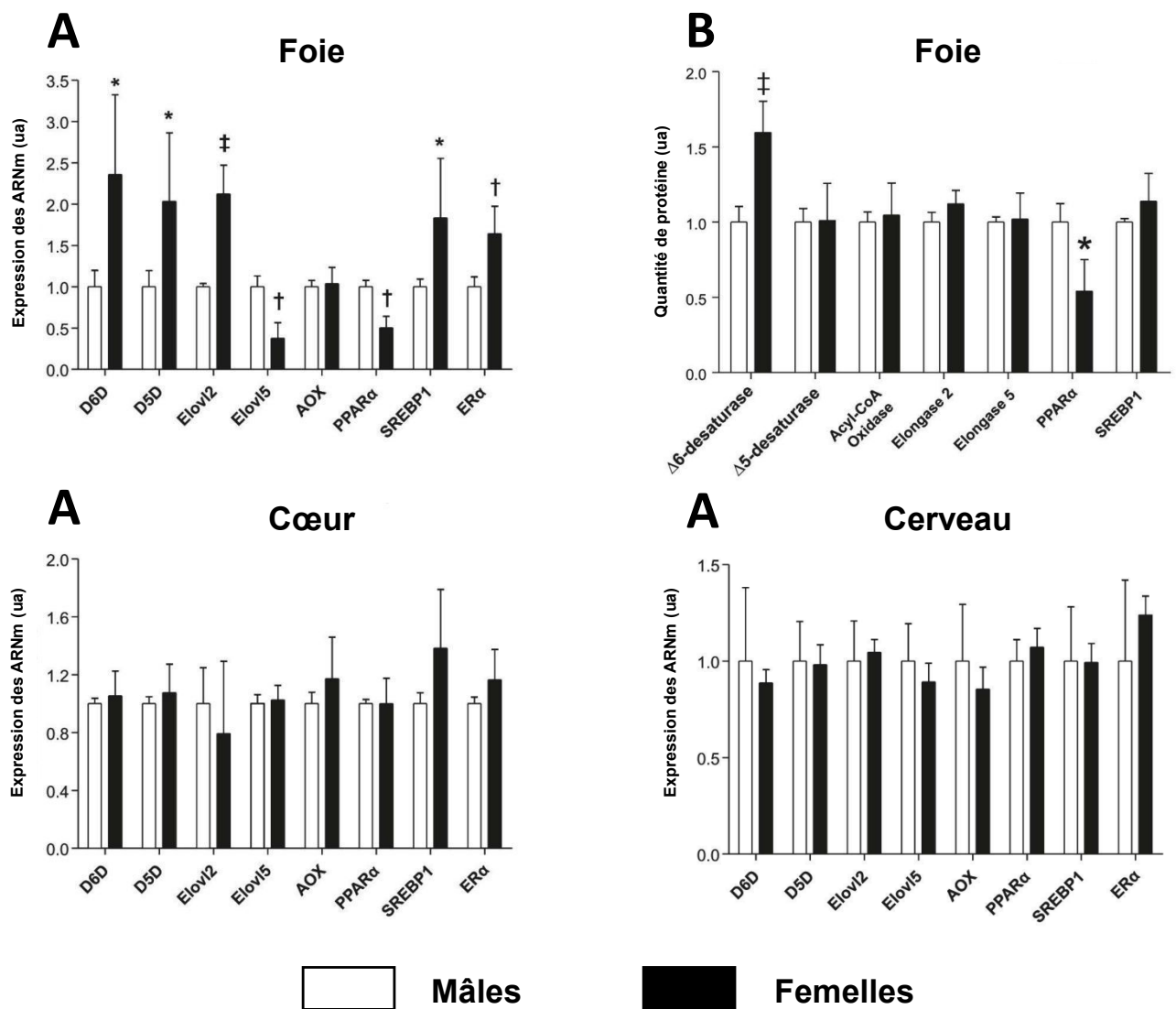


Figure 15. Expression des enzymes et des facteurs de transcription impliqués dans la conversion des AGPI en fonction du sexe

Adapté de *Kitson et al., 2012*.

A) Expression des ARNm et **B)** contenu protéique des enzymes et des facteurs de transcriptions impliqués dans la conversion des AGPI en fonction du sexe chez des rats Sprague Dawley âgés de 10 semaines.

1.3.4 Effet du sexe sur la conversion des AGPI

L'équipe de Burdge s'est principalement intéressée aux différences pouvant exister entre les hommes et les femmes sur le métabolisme des AGPI n-3 en utilisant des traceurs isotopiques. Ainsi, ils ont montré que chez des hommes et des femmes ayant reçus la même dose d'ALA-¹³C, les taux de DHA sanguins étaient plus élevés chez les femmes (Burdge, Jones, and Wootton 2002; Burdge and Wootton 2002; Burdge and Calder 2005b; Childs et al. 2008). Plus précisément, seules les femmes parvenaient à convertir l'ALA jusqu'au DHA alors que la conversion entraînait chez les hommes une augmentation du statut en EPA et en DPA uniquement. Une méta-analyse de 51 publications sur l'humain a ensuite corroboré ces résultats, les femmes ayant des taux tissulaires de DHA et d'ARA plus élevés que les hommes (Lohner et al. 2013). Ainsi, les différences de conversion entre hommes et femmes peuvent s'expliquer de plusieurs façons, en passant par des différences constitutionnelles, hormonales, et de reproduction, principalement associées à la nécessité de subvenir aux besoins en DHA du fœtus puis du nourrisson.

Tout d'abord, la voie de conversion des AGPI est plus active chez les femmes. En effet, la capacité de conversion à partir de l'ALA pour les femme (28 ans) est environ 2 fois supérieure à celle des hommes jusqu'au DHA, et 2,5 fois supérieure jusqu'à l'EPA (Burdge and Wootton 2002). Cette différence entre l'augmentation de la conversion jusqu'au DHA proviendrait d'une conversion plus importante des femmes du DPA vers le DHA (R. Pawlosky et al. 2003). L'augmentation de la conversion à partir du DPA pourrait être associée à une augmentation de la translocation du C24:6 n-3 entre le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (Burdge and Calder 2005b) ainsi qu'à une expression hépatique des *fads1* et *fads2* et de *elovl2* plus importante chez la femme, mais plus basse pour *elovl5* dont l'enzyme est considérée non limitante (Extier et al. 2010; Kitson et al. 2012). L'expression des ARNm des facteurs de transcription impliqués dans la biosynthèse du DHA sont aussi influencés par le sexe, ainsi chez l'animal les femelles ont une expression hépatique plus faible que les mâles pour PPAR α et plus forte pour SREBP1c (**Figure 15**). Néanmoins, en Western Blot, seule la quantité de Δ 6-désaturase augmentait significativement chez la femelle, et PPAR α diminuait (Kitson et al. 2012).

Plus récemment, une étude fait aussi apparaître que l'absorption des AGPI-LC serait plus importante chez les femelles que chez les mâles (Ghasemifard et al. 2015). De plus, les études de Burdge ont montré que la β -oxydation de l'ALA est plus importante chez les hommes (33%)

que chez les femmes (22%) (Burdge and Calder 2005a). Cela peut s'expliquer en raison de la présence d'œstrogènes (R. J. Pawlosky, Hibbeln, and Salem 2007) ainsi que par la masse de tissu adipeux qui sont plus importantes chez les femmes, les tissus maigres comme les muscles squelettiques et le cœur étant bien plus β -oxydants que le tissu adipeux, car consommateurs d'énergie (Ghasemifard et al. 2015). Ainsi, les œstrogènes pourraient augmenter l'activité des enzymes de la voie de conversion, comme le montre des études cliniques contenant des panels de femmes prenant des médicaments contraceptifs à base d'œstrogènes (17 α -éthylnoestradiol) ou d'hormones sexuelles stéroïdes (Extier et al. 2010; J. M. Alessandri et al. 2009). A l'inverse, l'injection de testostérone par des transsexuelles entraîne une diminution du DHA plasmatique (Giltay et al. 2004). De même, des rongeurs ayant subi une ovariectomie et donc ayant des taux d'œstrogènes plus faibles ont des taux plasmatiques et hépatiques de DHA moins importants que des rongeurs non-ovariectomisés (McNamara et al. 2009). Néanmoins, tous les œstrogènes ne permettent pas la régulation du taux de DHA et les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés, bien qu'ils pourraient être associés à une régulation du métabolisme glucidique (Majou 2018), à une facilitation du transport du DHA dans les organes (Schüller et al. 2018), ainsi qu'à une augmentation de l'activité d'ELOVL2 (González-Bengtsson et al. 2016) et d'ELOVL5 (M. Zhang et al. 2017).

Néanmoins, bien que les concentrations plasmatiques de DHA soient plus importantes chez les femelles, ainsi que les taux de DHA dans la plupart des tissus, et que la conversion cérébrale soit plus importante chez les animaux femelles, le taux cérébral de DHA reste le même chez les deux sexes (Extier et al. 2010). Cela renforce l'argumentaire que le DHA cérébral provient plus du DHA préformé que de la synthèse cérébrale à partir du précurseur, et que la majeure partie du DHA converti chez la femelle est sûrement stocké dans le tissu adipeux, d'où il pourra être mobilisé lors de la gestation et de la lactation pour alimenter le fœtus puis le nouveau-né (Sheaff Greiner et al. 1996).

1.3.5 Effet de l'âge et influence épigénétique sur la conversion des AGPI

Chez le fœtus, le foie aussi bien que le cerveau sont capables de convertir le LA et l'ALA en ARA et en DHA, respectivement, en plus de l'apport provenant de la mère par le placenta. Après la naissance, l'activité de la Δ 6-désaturase augmente dans le foie mais diminue dans le cerveau avec un rapport d'activité entre 2 et 3 fois en faveur du cerveau (Bézar et al. 1994). Néanmoins, même chez le fœtus la conversion de l'ALA jusqu'au DHA reste insuffisante pour

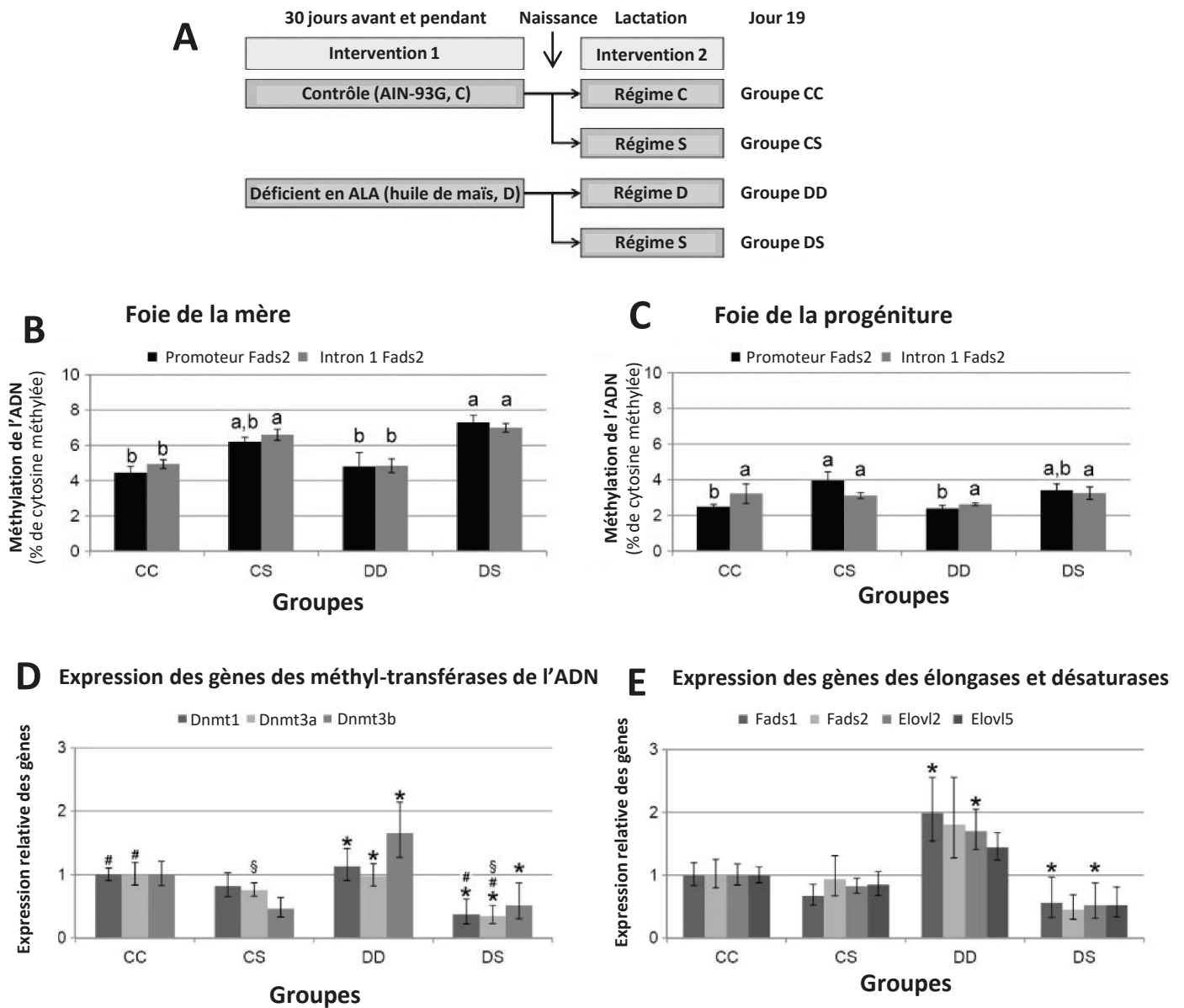


Figure 16. La déficience en ALA module l'expression des enzymes par méthylation de l'ADN

Adapté de *Niculescu et al., 2013.*

(A) Les mères sont nourries avec un régime contrôle ou déficient en ALA pendant la gestation (intervention 1). A la naissance elles sont séparées en deux groupes, une partie des mères est supplémentée en ALA (S) et l'autre continue son régime de base (C et D). (B,C) La supplémentation en ALA induit l'hyperméthylation du promoteur et de l'intron 1 de *Fads2* dans le foie des mères (B) mais aussi dans le foie de la progéniture (C). (D,E) Les mères déficientes en ALA pendant la gestation et la lactation induisent l'expression génique des méthyl-transférases de l'ADN (*Dnmt*) du foie alors que la supplémentation en ALA après la déficience diminue l'expression des *Dnmt*. L'expression génique des enzymes de la voie de conversion des AGPI est globalement augmentée dans le foie des mères après un régime déficient mais la supplémentation en ALA après la naissance entraîne une diminution de l'expression de ces enzymes (E).

maintenir un statut optimal en DHA et le DHA provient donc principalement de la mère (Mennitti et al. 2015).

Plusieurs études montrent que la composition du lait maternel peut influencer aussi bien le statut en AGPI n-3 de la génération suivante mais aussi entraîner une modulation à long terme du métabolisme lipidique et glucidique. Ainsi, un statut élevé en AGPI-LC n-3 dans le régime des souris C57Bl/6 pendant la gestation et la lactation (2,3% d'énergie d'EPA, 2,0% de DHA, 0,3% d'ALA) est associé à un statut hépatique en AGPI-LC n-3 plus élevé chez les souris de 60 jours (Chechi, Herzberg, and Cheema 2010). L'enrichissement du lait en AGPI-LC n-3 régulerait aussi l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et du métabolisme du glucose en diminuant la pyruvate kinase hépatique, l'ATP citrate lyase, la FAS, la SCD1 et l'HMG-CoA Réductase, ainsi qu'en augmentant l'HMG-CoA Synthase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase). Un certain niveau de preuve montre que la composition du lait maternel et la consommation alimentaire en AGPI-LC n-3 pourrait impliquer une régulation épigénétique des enzymes impliquées dans la conversion des AGPI. Ainsi, les mécanismes impliqués dans la régulation épigénétique de la biosynthèse des AGPI chez la progéniture pendant son développement serait associée à des régulations transcriptionnelles de *Fads2* voire de *Fads1* chez la progéniture qui induiraient ensuite des changements de composition des membranes cellulaires sur le long terme (Burdge and Lillycrop 2014). Hoile et collaborateurs ont montré que la méthylation du promoteur de *Fads2* augmente de 20% et est associée à une diminution de l'expression du gène *Fads2* chez la progéniture de 77 jours de ratte exposées à 21% d'AGPI n-3 dans le régime maternel durant la période de développement des petits (Hoile et al. 2013). Une autre étude (**Figure 16**) a montré une hyperméthylation du promoteur de *Fads2* chez des mères ayant des ratons de 19 jours soumises à des régimes avec un statut élevé en ALA par rapport à des mères dont les régimes étaient déficients en ALA (Niculescu, Lupu, and Craciunescu 2013). Il a été proposé que des niveaux réduits de DHA peuvent intervenir dans la régulation du métabolisme du carbone associé au folate et entraîner le détournement des groupes méthyles orientés vers l'ADN dans le placenta (Kulkarni et al. 2011). Ainsi, l'expression des enzymes désaturases et élongases impliquées dans la conversion des AGPI-LC au cours de la vie serait inversement corrélée au statut du régime et du lait maternel en AGPI-LC n-3.

Chez les sujets âgés, le développement des marqueurs isotopiques du DHA ont permis de montrer que le métabolisme du DHA est perturbé pendant le vieillissement. Ainsi, un suivi d'un mois après ingestion d'une dose de ^{13}C -DHA a montré que le ^{13}C -DHA reste plus longtemps

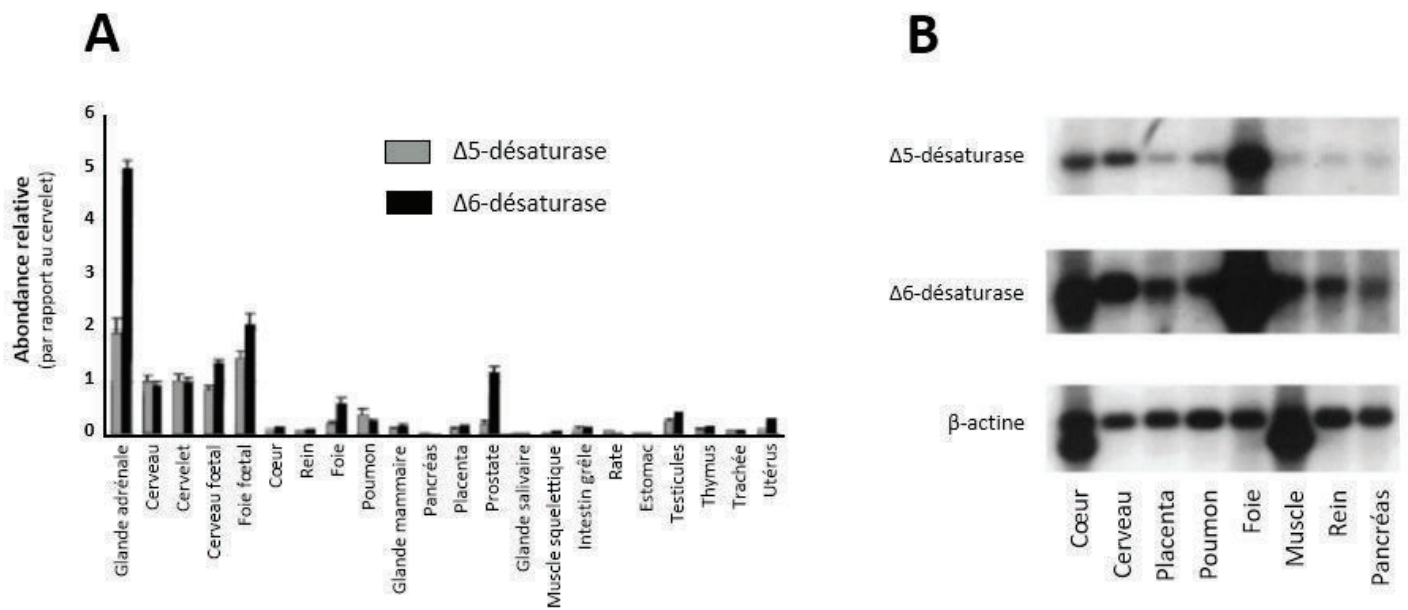


Figure 17. Expression génique des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases dans les tissus humains

Adapté de (A) *Leonard et al., 2000* et de (B) *Cho et al., 1999*.

(A) Les ARNm ont été quantifiés par PCR quantitative ou (B) par Northern Blot.

au sein de la circulation sanguine chez les sujet âgés (76 ans) que chez les jeunes adultes (26 ans). L'homéostasie du DHA diffère aussi entre les classes de lipides plasmatiques comparée aux jeunes adultes : le ^{13}C -DHA enrichit ainsi 4 à 5 fois plus les TG et les acides gras libres (AGL) chez l'homme âgé quelques heures après l'ingestion du ^{13}C -DHA, mais enrichi 2 fois plus les PL et les EC après quelques jours voire quelques semaines suivants l'ingestion du traceur (Plourde et al. 2011). La demi-vie du DHA chez les personnes âgées saines était aussi 77% plus courte chez les porteurs de l'allèle de l'apolipoprotéine E4 (APOE4) par rapport aux non- porteurs. L'APOE4 est connue comme étant l'un des principaux facteurs de risque génétique de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer, la diminution de la demi-vie du DHA chez les porteurs de l'allèle d'APOE4 est associée à une β -oxydation plus élevée du DHA (Samieri et al. 2013).

1.3.6 Des expressions enzymatiques dépendantes du tissu

Chez l'Homme, la quantification par PCR quantitative des transcrits des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases a montré que ces gènes sont particulièrement exprimés dans la glande surrénale, le cerveau et cervelet des adultes, ainsi que dans le foie, principalement au stade foetal (**Figure 16-A**). Les transcrits de la $\Delta 6$ -désaturase sont également abondant dans la prostate, ce qui n'est pas le cas pour la $\Delta 5$ -désaturase (A E Leonard et al. 2000). Par Northern Blot cette fois, Cho a observé que la $\Delta 5$ -désaturase est très exprimée dans le foie alors que les ARNm de la $\Delta 6$ -désaturase sont abondants dans le foie, le cerveau et le cœur (**Figure 16-B**). Dans ces deux études, le foie et le cerveau restent les tissus exprimant le plus les enzymes impliquées dans la conversion vers le DHA. De plus, lors d'une carence en ALA chez le rat, les activités des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases augmentent dans le foie mais pas dans le cerveau. Cela renforce l'hypothèse que le métabolisme des AGPI n-3 localisé dans le foie conditionne la disponibilité du DHA cérébral quand le DHA est absent du régime et que le foie reste tout de même le tissu majoritaire de synthèse des AGPI et du métabolisme lipidique générale (Igarashi et al. 2013). Concernant les espèces, en règle générale les tissus animaux ont une activité de biosynthèse du DHA plus importante que les tissus humains (Bézar et al. 1994).

2 FONCTIONS DES AGPI

2.1 *Fonction énergétique*

Les acides gras, toute familles confondues, sont de bons combustibles énergétiques et sont une source d'énergie importante pour la cellule. En effet, le catabolisme d'un gramme d'acide gras fournit aux cellules environ 9 kilocalories (kcal) d'énergie, contre 4 kcal pour un gramme de protéines ou de glucides. Concernant les AGPI, la β -oxydation mitochondriale est responsable de 70 à 80% de l'utilisation des précurseurs ALA et LA (Burdge and Wootton 2002; Burdge and Calder 2005b), de 80-90% de l'EPA et de 60% du DHA et du DPA (Ghasemifard et al. 2015). Le catabolisme des AGPI est complexe ainsi que le devenir de leurs produits d'oxydation. Ainsi, une partie des acyls-CoA est utilisé pour l'apport d'énergie après être passé par le cycle de Krebs, tandis qu'une partie très minoritaire peut être dérivée en corps cétoniques dans le foie. Cet apport d'énergie supplémentaire par la céto-genèse intervient principalement avant le sevrage chez l'animal ou en cas d'adaptation métabolique à la famine et permet un recyclage des carbones pour la synthèse *de novo* des lipides (Manabu T. Nakamura, Yudell, and Loo 2014). La fonction énergétique des AGPI et leur rendement de catabolisme est un des problème majeur pour augmenter le statut tissulaire en AGPI n-3, les sources tant que la consommation alimentaires étant limitées (Tou et al. 2011).

2.2 *Fonction structurale*

Les lipides membranaires représentent entre 20 et 40 % de la composition des membranes biologiques. Ils sont classés en deux grands groupes (i) les stérols, (ii) et les PL contenant les sphingolipides et les phosphoglycérides. Les AGPI peuvent intervenir dans la synthèse de ces classes mais sont majoritairement présents dans les PL (ADAN et al. 1999). Le LA, l'ARA et le DHA sont les principaux constituants des phospholipides membranaires. Les PL sont constitués d'un squelette glycérol sur lequel est attaché un acide phosphorique et deux acides gras en position sn-1 et sn-2. Communément, les AGPI se trouvent en position sn-2. Ces AGPI modulent l'action de différents acteurs des signalisations inter- et intercellulaires (enzymes, transporteurs, récepteurs, canaux ioniques) de différentes façons. De manière directe, les AGPI constituent un microenvironnement peu ordonné et flexible, favorable à l'activité de protéines intrinsèques. En effet, les insaturations de ces AGPI créent des angles ou « coudes » aux niveaux

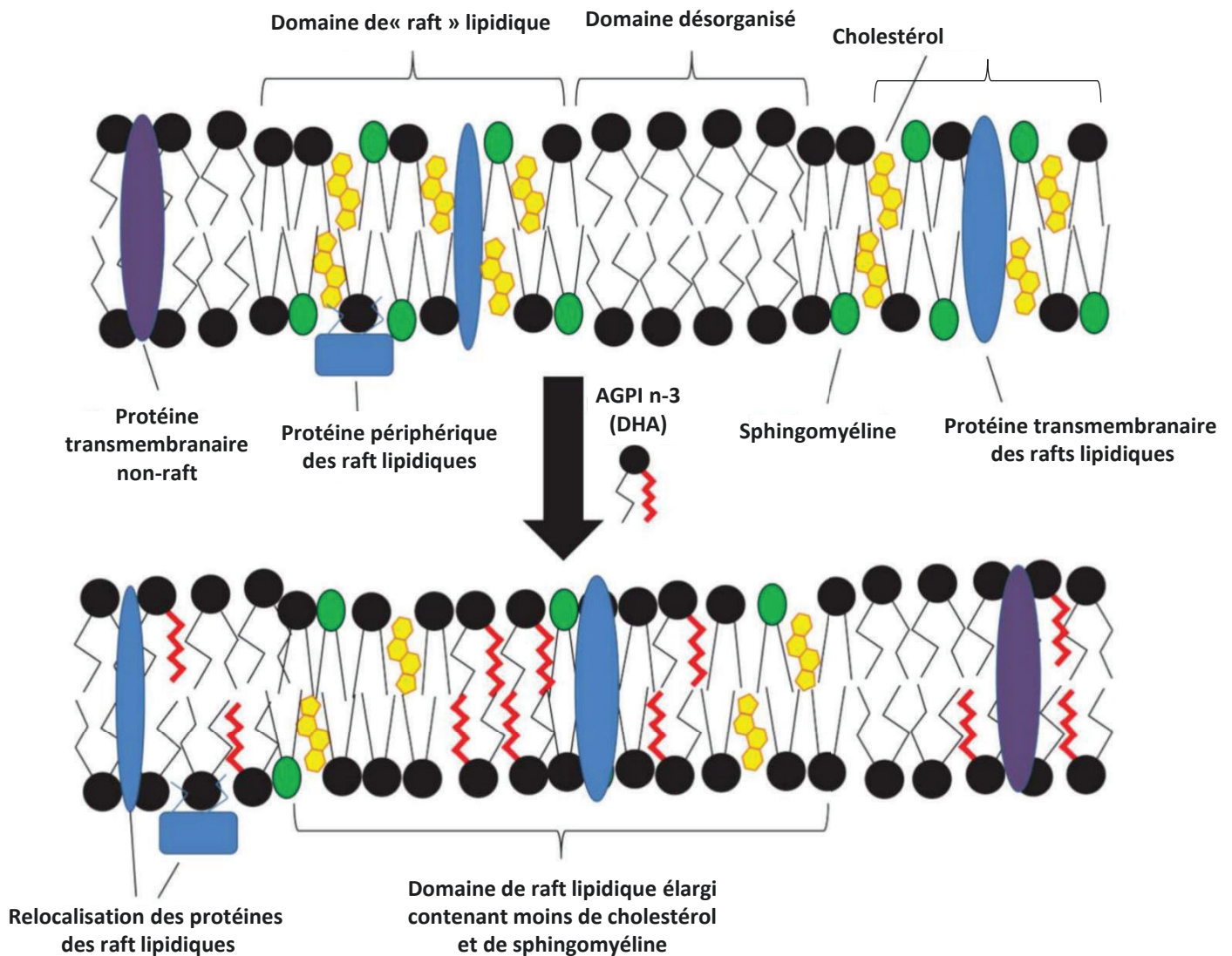


Figure 18. Modèle putatif de l'effet des AGPI n-3 sur les rafts lipidiques

Adapté de *Turk et Chapkin, 2013.*

Les radeaux lipidiques sont des régions nanométriques de la membrane plasmique, enrichies en cholestérol, en sphingomyéline et en phospholipides contenant des chaînes acyles saturées. Les protéines transmembranaires et périphériques peuvent être localisées dans des rafts lipidiques. Après traitement avec des AGPI n-3 ou du DHA uniquement, ces AGPI sont incorporés dans les phospholipides qui sont insérés dans les régions raft et non-raft de la membrane plasmique. Ceci augmente le regroupement des régions de raft lipidiques, qui sont alors appauvries en cholestérol et en sphingomyéline. De plus, de nombreuses protéines associées aux raft lipidiques se relocalisent dans le domaine membranaire non-raft. Ceci entraîne une suppression des processus induits par les rafts lipidiques, y compris l'activation des lymphocytes T et la transduction du signal cellulaire.

des chaînes carbonées limitant la formation de liaisons faibles à l'origine de la rigidité membranaire. Ils permettent ainsi de garder l'intégrité de la membrane, sa perméabilité et sa fluidité nécessaires aux déplacements et changements de conformation des protéines membranaires (Conroy et al. 1986; Quinn, Joo, and Vigh 1989; Stubbs and Smith 1990). Les AGPI interviennent donc en tant que modulateur de l'activité protéique et/ou enzymatique à travers la fluidité membranaire en facilitant la liaison enzyme-substrat (Coskun and Simons 2011; Jaureguiberry et al. 2014). De manière indirecte, les AGPI induisent la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés, enrichis en acides gras saturés, phosphatidylcholines, glycosphingolipides et en cholestérol : les rafts, auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (**Figure 18**) (Wassall and Stillwell 2009; Shaikh et al. 2004; Turk and Chapkin 2013).

2.3 Fonctions spécifiques de précurseurs de médiateurs oxygénés

2.3.1 Les eicosanoïdes

Les AGPI-LC n-6 et n-3 à 20 carbones sont les précurseurs de molécules biologiquement actives de la signalisation cellulaire : les eicosanoïdes. L'entrée des AGPI dans des voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation ou de peroxydation requiert tout d'abord leur obtention à partir des PL membranaires par l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 sous l'action d'une phospholipase de type A2 (PLA2). L'ARA et l'EPA et à moindre échelle l'acide dihomog- γ -linoléique (DGLA, C20:3 n-6) ainsi libérés peuvent emprunter deux voies métaboliques de synthèse principales : la voie des cyclooxygénases (COX) générant les prostanoïdes : prostaglandines (PG), prostacyclines (PGI₂), thromboxanes (TX) ou la voie de la lipoxygénase (LOX) conduisant à la synthèse des acides gras hydroperoxydés et hydroxylés puis aux leucotriènes (LT) (Guesnet et al. 2005). La cytochrome P450 epoxygénase participe également à la synthèse de médiateurs bioactifs, les acides gras hydroperoxydés et époxydés (Harizi, Corcuff, and Gualde 2008). Pour chaque famille de molécules, on distingue différentes séries selon la nature de l'AGPI précurseur (**Figure 19**). De façon générale, la plupart de ces métabolites sont impliqués dans les processus inflammatoires, arythmiques, vasoconstricteurs et dans l'agrégation plaquettaire. Les dérivés issus de l'EPA vont plutôt avoir des actions anti-inflammatoires et les dérivés issus de l'ARA des actions pro-inflammatoires.

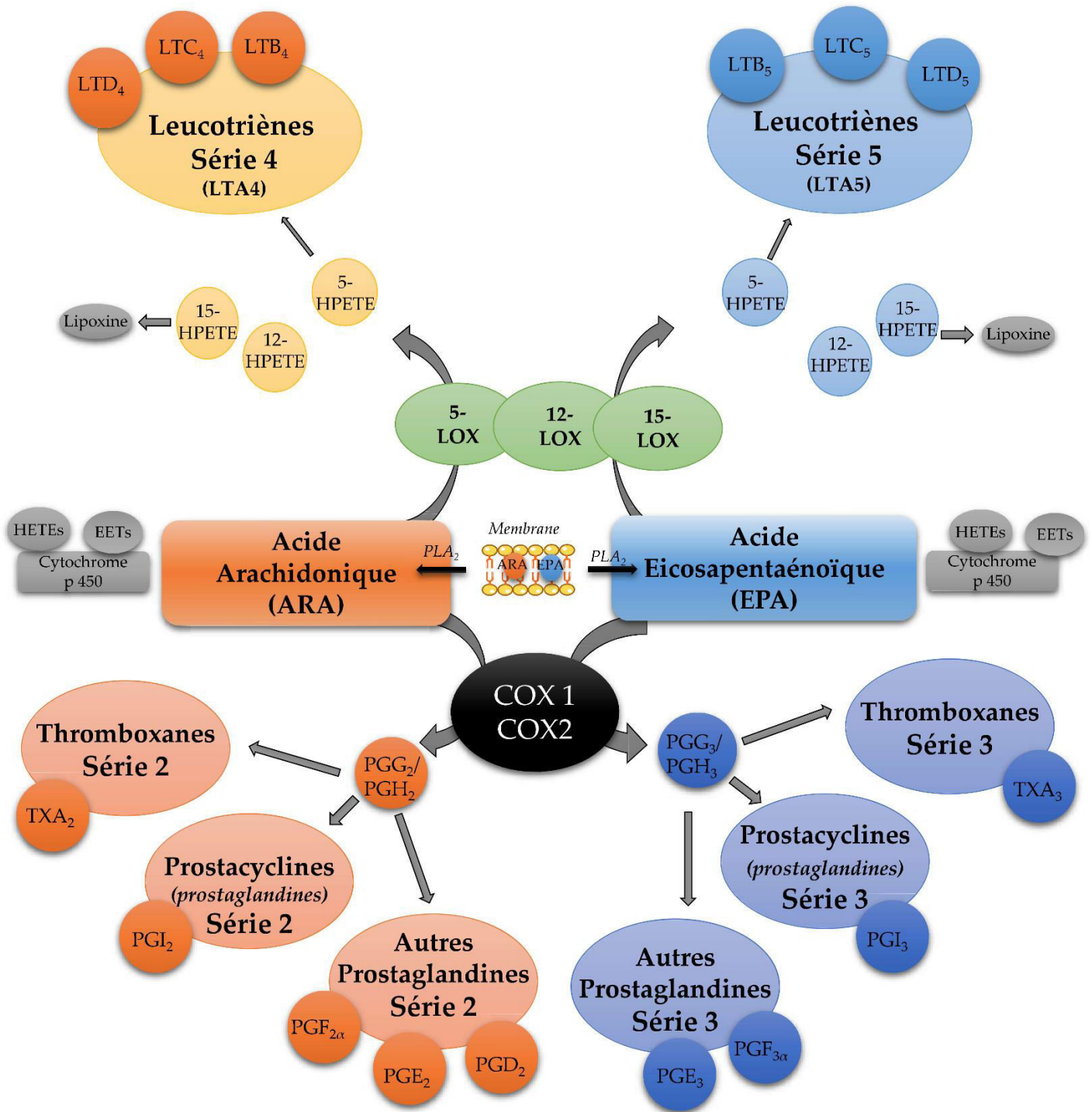


Figure 19. Voie de synthèse des eicosanoïdes

D'après Guesnet et al, 2011.

Métabolisme de l'EPA et de l'ARA par les voies cyclooxygénases (COX) conduisant à la formation des prostanoides et par les voies lipoxygénases (LOX) conduisant à la formation des leucotriènes.

HPETE : acide hydroperoxy-eicosatetraénoïque, EET : acide epoxy-eicosatriénoïque.

Il existe deux isoformes majeurs de COX nommés COX-1 et COX-2. COX-1 est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire, elle permet la production basale des PG actrices de l'homéostasie générale. Au contraire, COX-2 est inductible et répond principalement aux stimuli pro-inflammatoires. Les PG produites par la COX-2 sont associées à la douleur et à l'inflammation impliquées dans diverses pathologies (Rouzer and Marnett 2009). Une troisième isoforme de COX, COX-3 a été identifiée mais son origine et sa fonction restent controversées (Hersh, Lally, and Moore 2005). Les enzymes de conversion des AGPI n-6 et n-3 en dérivés oxygénés étant communes, il existe une compétition inhibitrice entre les substrats des deux familles. Ainsi, une supplémentation ou une suppression du déficit en AGPI n-3 alimentaires pourrait inhiber la production des dérivés de l'ARA (P. Calder 2006).

Les LOX interviennent également dans la synthèse des eicosanoïdes et comportent trois isoformes : 5-, 12- et 15-LOX majoritairement associés aux phénomènes pro-inflammatoires (Tapiero et al. 2002). L'activité de la 5-LOX à partir de l'ARA conduit à la formation de dérivés hydroxylés et hydroperoxydés : l'acide 5- hydroxyeicosatetraénoïque (5-HETE) et l'acide 5-hydroperoxyeicosatetraénoïque (5-HPETE). Les 12/15-LOX participent à la formation des acides 12-/15-HPETE. Ces dérivés produisent à leur tour la série 4 des leucotriènes ainsi que des lipoxines. Les mécanismes d'action des eicosanoïdes mobilisent des récepteurs membranaires couplés à des protéines G spécifiques (GPCRs pour G protein-coupled receptor) (Hall, Shahrokhi, and Jeschke 2012). L'activation des GPCRs conduit à l'augmentation de la concentration d'AMP cyclique et à l'activation de voies de signalisation cellulaire (cascade de la protéine kinase A et de la phospholipase C). Les effets des médiateurs dérivés de l'ARA et de l'EPA mettent également en œuvre l'activation de facteurs de transcription tels que les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes, PPARs, et également pour les docosanoïdes issus du DHA traités dans la partie suivante (Guesnet et al. 2005).

Les eicosanoïdes synthétisés par ces différentes enzymes dérivent majoritairement de l'ARA, plus abondant dans la cellule que l'EPA, en lien avec la nature des lipides alimentaires (Hall, Shahrokhi, and Jeschke 2012). De manière générale, les eicosanoïdes issus de l'ARA sont considérés comme des molécules pro-inflammatoires même si quelques dérivés s'avèrent être neutres ou anti-inflammatoires (Johnson and Fritsche 2012). Néanmoins, ce rôle dans l'inflammation est nécessaire pour réguler l'homéostasie et la réponse inflammatoire suite à des aspects traumatiques de la vie de l'organisme (Ricciotti and Fitzgerald 2011). Par opposition, les eicosanoïdes issus de l'EPA possèdent plutôt des propriétés anti-inflammatoires. Il a été montré que la conversion enzymatique de l'EPA conduit à la formation de dérivés bioactifs :

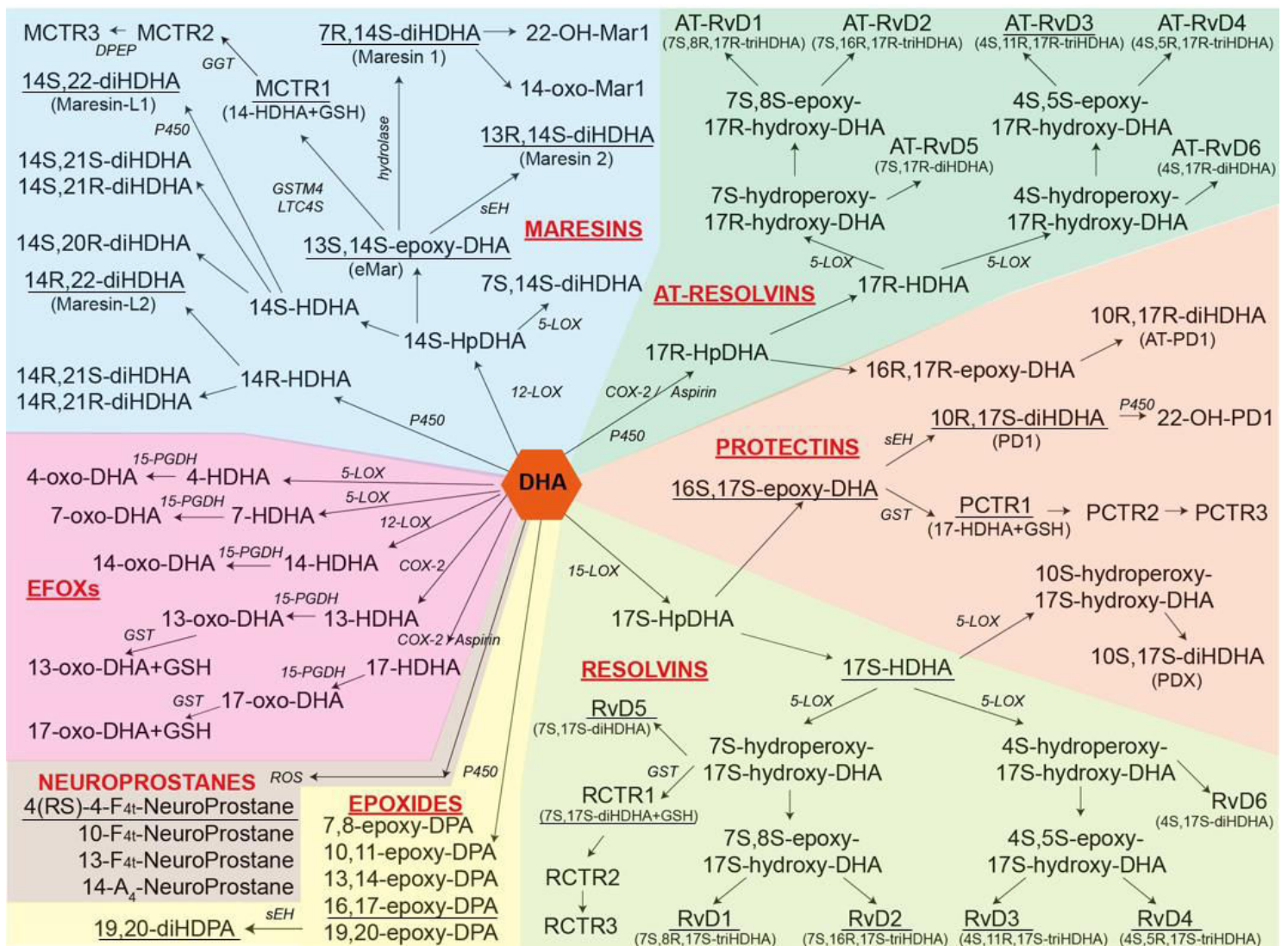


Figure 20. Voie de synthèse des docosanoïdes issus du DHA

Adapté de *Kuda, 2017*.

Les métabolites soulignés ont été documentés chez l'Homme.

Marésines : **diHDHA**, dihydroxydocosahexaenoic acid; **DPEP**, dipeptidase; **eMar**, 13,14-epoxy-maresin; **GGT**, g-glutamyl transferase; **GSH**, glutathione; **GSTM4**, glutathione S-transferase; **HpDHA**, hydroperoxydocosahexaenoic acid; **LOX**, lipoxygénase; **MCTR**, Maresin conjugates in tissue regeneration; **P450**, cytochrome P450; **sEH**, soluble epoxide hydrolase.

Résolvines et protectines : **AT-**, aspirin-triggered-; **COX**, cyclooxygénase; **diHDHA**, dihydroxydocosahexaenoic acid; **GSH**, glutathione; **GST**, glutathione S-transferase; **HpDHA**, hydroperoxydocosahexaenoic acid; **LOX**, lipoxygénase; **P450**, cytochrome P450; **PGDH**, hydroxyprostaglandin dehydrogenase; **PCTR**, Protectin conjugates in tissue regeneration; **PD**, protectin D; **RCTR**, Resolvin conjugates in tissue regeneration; **RvD**, resolvin D; **sEH**, soluble epoxide hydrolase; **triHDHA**, trihydroxydocosahexaenoic acid

EFOXs, neuroprostanes et epoxydes : **13-DHAHLA**, 13-(docosahexaenoyloxy)-hydroxylinoleic acid; **14-DHAHDHA**, 14-(docosahexaenoyloxy)-hydroxydocosahexaenoic acid; **DHEA**, docosahexaenoyl ethanolamine; **DHG**, docosahexaenoyl glycerol; **diHDHEA**, dihydroxy-DHEA; **DPA**, docosapentaenoic acid; **HEDPEA**, hydroxy-epoxy-docosapentaenoyl ethanolamine; **HpDHEA**, hydroperoxy-DHEA; **LOX**, lipoxygénase; **NAPE-PLD**, N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D; **NAT**, N-acyltransferase; **PE**, phosphatidylethanolamine; **P450**, cytochrome P450.

les résolvines de la série E (Schwab et al. 2007; Duvall and Levy 2016). Les résolvines E semblent limiter la réaction inflammatoire et notamment interviennent dans la régulation des cytokines inflammatoires ou encore dans la migration des neutrophiles et leurs infiltrations au niveau des sites inflammatoires (P. C. Calder 2013; Schwab et al. 2007).

2.3.2 Les docosanoïdes

Les docosanoïdes, dérivés des AGPI-LC n-3 et n-6 à 22 carbones ont été découverts plus récemment. Les docosanoïdes utilisent les mêmes voies de synthèses que les eicosanoïdes et regroupent les familles des protectines, des résolvines, des marésines, spécialisé dans la résolution de l'inflammation, mais aussi des époxydes et des dérivés oxo-électrophiles. Les isoprostanes sont des dérivés issus de la peroxydation non-enzymatique des AGPI-LC à 20 carbones (**Figure 20**) (Kuda 2017). Plus de 70 métabolites actifs ont été décrit à ce jour dérivés du DHA et la littérature s'accorde à dire que tous n'ont sûrement pas encore été identifiés (Duvall and Levy 2016). Alors que la PLA2 a globalement plus d'affinité pour les substrats hautement insaturés, cette discrimination ne semble pas s'appliquer entre les AGPI n-3 et n-6 (C. C. Leslie 2004).

Parmi les métabolites oxygénés du DHA, les marésines, dérivés de l'action de la 12-LOX, sont produits principalement par les macrophages. Les marésines vont avoir des effets anti-inflammatoires, analgésiques et cicatrisants. De même, les intermédiaires de synthèse des marésines comme le 7S,14S-dihydroxyDHA (E,Z,E) vont réduire l'infiltration des leucocytes polynucléaires, alors que l'intermédiaire époxyde va intervenir dans la régénération cellulaire (Dalli, Colas, and Serhan 2013; Dalli et al. 2016). Les résolvines partagent un résidu 17-hydroxy introduit sur le DHA par l'action de la 15-LOX et comportent 7 membres dont les résolvines 1-6 et le 17S-HDHA. Elles ont montré des effets bénéfiques sur l'induction de la phagocytose par les macrophages, l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et la cicatrisation (Serhan et al. 2015). Parmi les protectines issus de l'action première de la 15-LOX, la (neuro)protectine D1 (PD1 ; 10R, 17S-diHDHA, E,E,Z) est la plus étudiée pour ses fonctions de neuro-protection, d'immuno-régulation, de protection rénale, de régénération de la cornée, de différenciation des cellules souches neurales, du stimulus cardiaque et plusieurs revues existent sur le sujet (Serhan 2017; Serhan et al. 2015). La PD1 a longtemps été confondue avec son isomère, la PDX (10S, 17S-diHDHA, E,Z,E) qui inhibe l'agrégation plaquettaire, la production de ROX ou encore l'activité COX (Balas et al. 2014). La

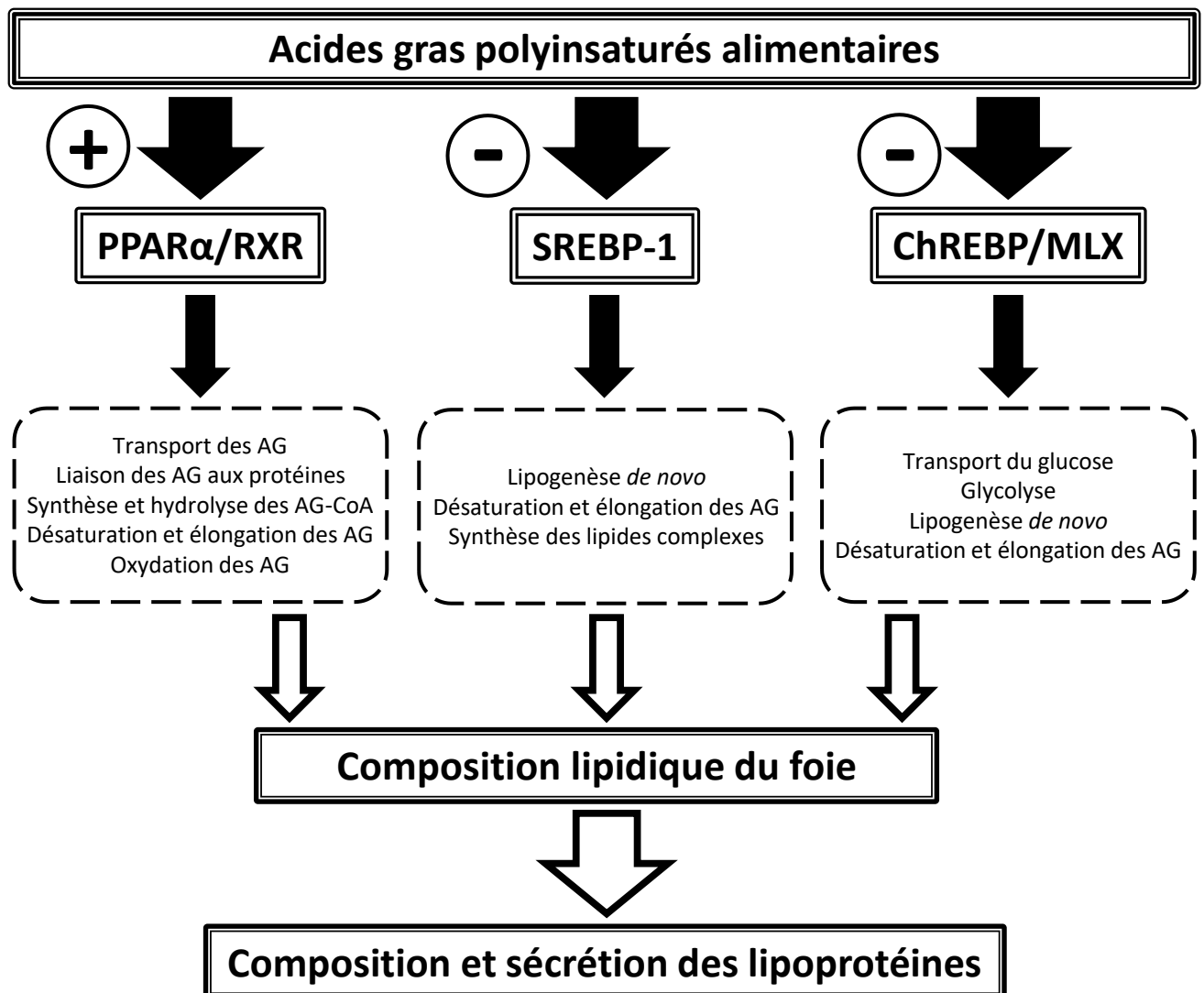


Figure 21. Impact des AGPI alimentaires sur les facteurs de transcription hépatiques et le métabolisme lipidique et glucidique

Adapté de *Jump, 2009*.

Les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 (AGPI) active le récepteur α activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) et le récepteur aux rétinoïdes X (RXR) et inhibe l'abondance nucléaire du Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 (SREBP-1) ainsi que du Carbohydre-Responsive Element-Binding Protein (ChREBP) et du Max-like factor X (MLX). Ces régulations induisent des variations de composition lipidique du foie et affectent la sécrétion et la composition des lipoprotéines, comme une diminution des very low density lipoproteins (VLDL).

stéréochimie est particulièrement importante pour les di- et tri-HDHA et demande encore aujourd'hui la validation des paramètres analytiques des modèles biologiques et des synthèses chimiques de ces molécules (Balas and Durand 2016).

Parmi les autres dérivés hydroxylés, succinctement, les dérivés oxo- du DHA vont avoir des effets anti-inflammatoires et anti-prolifératifs ; les époxydes des effets anti-hypertenseurs et analgésiques ; et les neuroprostanes des effets de cardio-protection et de cicatrisation. La plupart des isoprostanes n'ont été étudiées que *in vitro* (Kuda 2017). Le DHA peut aussi se conjuguer avec différents groupements *via* des liaisons amides et esters pour former plusieurs familles de métabolites comme les N-acyl amides, les esters d'acides gras ramifiés, les acides gras hydroxylés ou les esters d'éthanolamine et de glycérol qui vont avoir des fonctions dans le développement neural et la neurotransmission, l'immunomodulation et la régulation du métabolisme général (Kuda 2017; Serhan et al. 2015; Balas and Durand 2016; Yang et al. 2011). Récemment, des dérivés monohydroxylés à très longues chaînes, les elovanoïdes (27S-hydroxy 32:6 n-3 et 29S-hydroxy 34:6 n-3) ont été retrouvés dans des cellules de rétines pour exercer des effets anti-apoptotiques (Jun et al. 2017).

2.4 Régulateur de l'expression génique

Les acides gras et notamment les AGPI sont aussi des médiateurs importants de la régulation génique, que ce soit dans le foie ou dans les autres tissus (Jump, Tripathy, and Depner 2013; Jump 2008). Les premières études reliant les AGPI à la régulation de l'expression de certains gènes datent des années 70 (Muto et al. 1975), et ont ensuite été largement étudiés montrant que les acides gras peuvent agir comme certaines hormones sur la régulation de l'expression génique (Deckelbaum, Worgall, and Seo 2006). Le foie, organe majeur du métabolisme lipidique, est particulièrement concerné par ces processus de régulation par les AGPI (Jump et al. 2005). En effet, les AGPI n-3 et n-6 sont capables de réguler l'expression de nombreux gènes du métabolisme lipidique et du métabolisme glucidique (glucokinases et pyruvate kinases) qui vont permettre de réguler par exemple les taux de lipoprotéines sanguins (**Figure 21**). Par exemple, il a été montré que les AGPI stimulent la voie catabolique des acides gras par activation de la transcription des protéines de transport des acides gras et des enzymes de la β -oxydation. Les AGPI n-6 et n-3 régulent également l'oxydation des acides gras en modulant l'expression de gènes codant pour des enzymes métaboliques clés comme l'acyl-CoA oxydase et la Carnitine Palmitoyltransferase-1 (CPT-1). En effet, le rôle inducteur des AGPI n-3 en

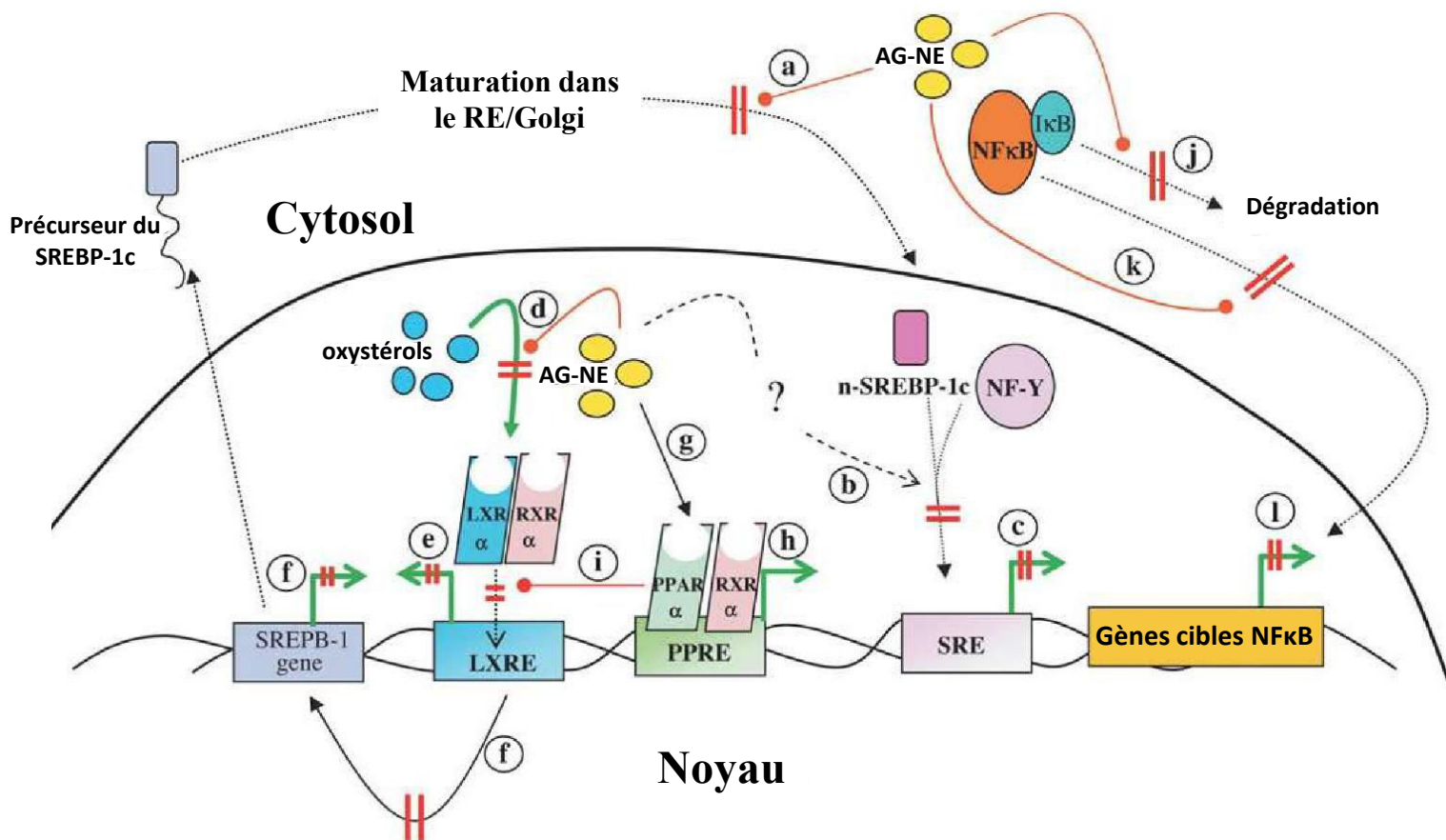


Figure 22. Effet nucléaire des acides gras.

Adapté de *Sampath et Ntambi, 2005*.

Les acides gras non estérifiés (AG-NE) interagissent avec divers médiateurs de la transcription grâce à plusieurs mécanismes permettant de modifier les profils d'expression des gènes. Les acides gras inhibent la maturation protéolytique de SREBP-1 du RE/Golgi (a) et la liaison ultérieure de SREBP et de coactivateurs tels que NFκB ou les SREs (b), diminuant ainsi la transcription des gènes cibles de SRE (c). Les acides gras entrent en compétition avec les oxystérols pour la liaison au LXRα (d), diminuant ainsi la transcription des gènes cibles de LXR (e), y compris SREBP-1 (f). Les acides gras se lient également aux PPAR-α activé (g) induisant la transcription de gènes associés à PPRE (h). L'activation de PPAR-α inhibe aussi la liaison de LXR au LXRE (i) et représente ainsi un autre niveau de régulation dans la transcription des gènes cibles de SREBP-1c et LXR. Les acides gras inhibent aussi la dégradation de l'IκB (j), empêchant ainsi la translocation de NFκB dans le noyau (k) et donc la transactivation des gènes cibles de NFκB (l).

RE, réticulum endoplasmique; **IκB**, inhibiteur κB; **LXRα**, liver X receptor α; **LXRE**, LXR response element; **NFκB**, nuclear factor-κB; **NF-Y**, nuclear factor-Y; **PPARα**, peroxisome proliferator-activated receptor- α; **PPRE**, PPAR response element; **RXRα**, retinoid X receptor α; **SRE**, sterol response element; **SREBP-1**, sterol regulatory element-binding protein-1c

particulier sur les concentrations des ARNm de ces deux enzymes hépatiques a été mis en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* chez le rat (Chatelain et al. 1996; Berthou et al. 1995). En parallèle, les AGPI réduisent l'activité lipogénique *de novo* dans le foie en réprimant la transcription de facteurs et d'enzymes lipogéniques telles que la Fatty Acid Synthase (FAS) (FORETZ, FOUFELLE, and FERRE 1999) et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Girard et al. 1994) modulée par SREBP-1c ou encore l'HMG-CoA Réductase modulée par SREBP-2 (J. D. Horton, Goldstein, and Brown 2002). De même, des études ont montré que les AGPI inhibent la synthèse des TG en réprimant l'expression du gène de la Stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD-1) *in vivo* (Ntambi 1999) et *in vitro* (Jeffcoat and James 1978). En particulier, l'expression du gène *scd1* est sélectivement diminuée par les AGPI dans le foie de souris comparés aux autres AGMI. L'ARA et plus faiblement le LA et l'ALA diminuent fortement les niveaux d'ARNm de SCD-1 (Prostek, Gajewska, and Bałasińska 2016). Néanmoins, d'autres études démontrent une forte capacité d'inhibition des AGPI n-6 sur la régulation des gènes de la lipogénèse dans le foie et dans le tissu adipeux (Sessler et al. 1996; B. H. Jones et al. 1996). Notamment, il a été montré que les AGPI possédant au moins 18 carbones et 2 doubles liaisons en position 9 et 12 sont plus efficaces pour réprimer la lipogénèse hépatique (Clarke and Jump 1994).

La régulation génique s'effectue soit au niveau du noyau cellulaire par interaction directe des AGPI ou de leurs dérivés oxygénés avec des récepteurs nucléaires soit de manière indirecte en agissant sur la transcription du récepteur lui-même (Sampath and Ntambi 2005). Ces mécanismes de régulation vont donc être médiés par de multiples facteurs de transcription dont les principaux sont les récepteurs PPAR et la protéine de liaison à l'élément de régulation des stéroïdes SREBP (**Figure 22**) (Jump 2008).

La famille des PPARs est composée de trois isoformes : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ dont les distributions et les fonctions diffèrent en fonction du tissu (Bensinger and Tontonoz 2008). PPAR α est principalement exprimé dans le foie et régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Bensinger and Tontonoz 2008). Il est également exprimé dans le cœur et les muscles et participe à la β -oxydation des acides gras (Reddy and Hashimoto 2001). Une fois activé par un ligand, PPAR α s'associe avec le récepteur aux rétinoïdes (RXR) pour former un hétérodimère qui se lie ensuite à l'ADN sur une séquence spécifique du promoteur du gène cible PPRE (Chakravarthy et al. 2005). PPAR α participe en grande partie au contrôle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (élongation, désaturation, oxydation) et leur transport (Jump 2011). PPAR α semble jouer un rôle important dans le catabolisme des acides gras en régulant positivement l'expression de nombreux gènes impliqués dans les β -oxydations

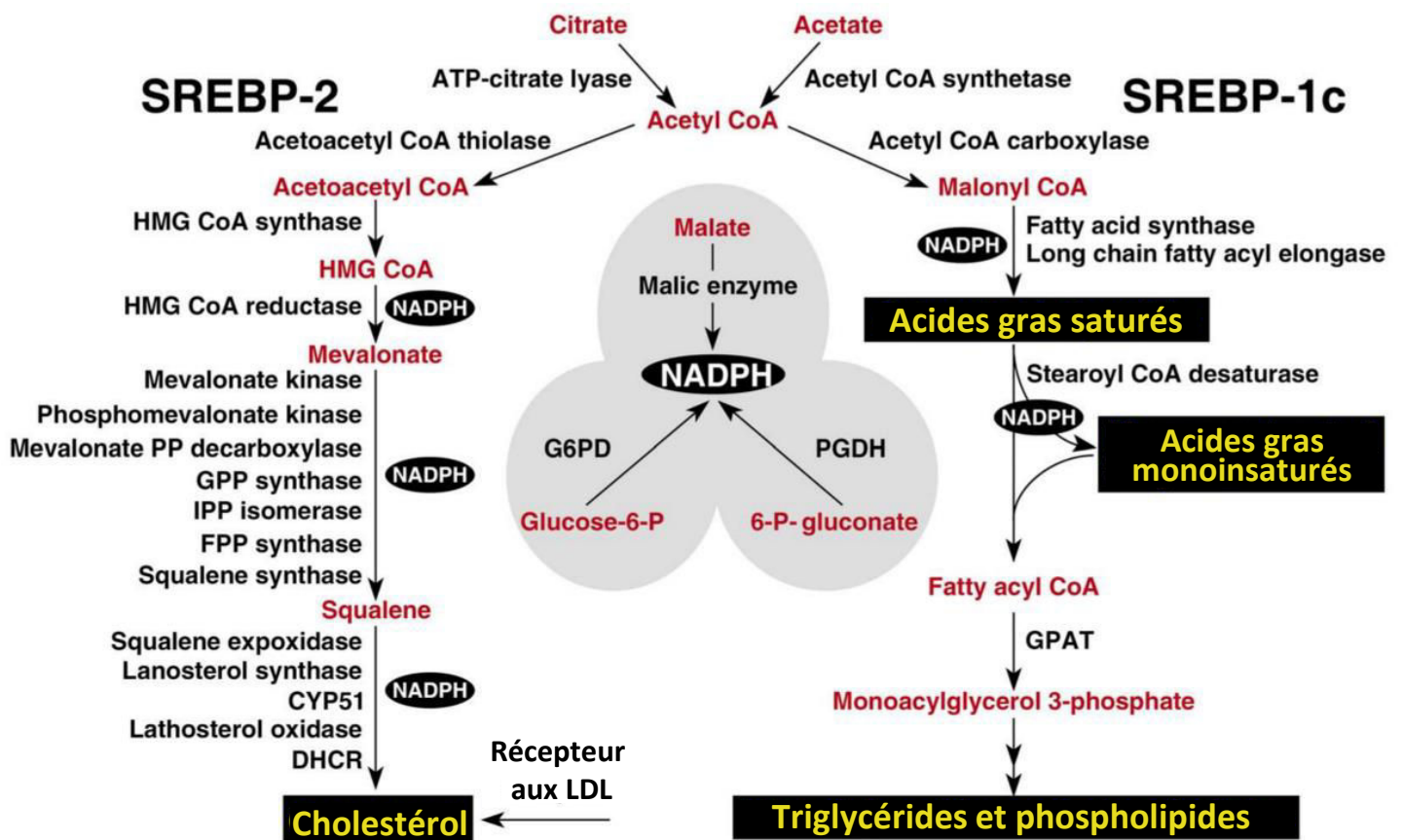


Figure 23. Gènes et enzymes régulés par SREBPs

Adapté de *Horton, Goldstein and Brown, 2002*.

Le diagramme présente les intermédiaires métaboliques majeurs impliqués dans les voies de synthèse du cholestérol, des acides gras et des triglycérides. SREBP-2 active préférentiellement les gènes du métabolisme du cholestérol alors que SREBP-1c active préférentiellement les gènes du métabolisme des acides gras et des triglycérides.

DHCR : 7-Dehydrocholesterol reductase; **FPP** farnesyl diphosphate; **GPP** geranylgeranyl pyrophosphate synthase; **CYP51** lanosterol 14 α -demethylase; **G6PD** glucose-6-phosphate dehydrogenase; **PGDH** 6-phosphogluconate dehydrogenase; **GPAT** glycerol-3-phosphate acyltransferase.

mitochondriales et peroxysomales (Rakhshandehroo et al. 2010). Cependant, son rôle dans le foie humain semble moins important. Par ailleurs, des études *in vivo* ont montré que les AGPI n-3 et leurs dérivés eicosanoïdes, davantage que les AGPI n-6, peuvent activer PPAR α (Hall, Shahrokhi, and Jeschke 2012). Contrairement aux AGPI n-6, la famille des AGPI n-3 limite aussi le développement du tissu adipeux viscéral en réprimant la phase tardive de différenciation des adipocytes (Okuno et al. 1997). Particulièrement actif lors d'un jeûne, ce mécanisme permet de réguler des gènes impliqués dans la β -oxydation peroxysomale tels que l'acyl-CoA oxydase ou dans la β -oxydation mitochondriale tel que le cytochrome p450 (Ren et al. 1997).

PPAR β/δ quant à lui est la forme la plus ubiquitaire et intervient en particulier dans les phases du développement embryonnaire (Y. Wang et al. 2006). PPAR γ (PPAR γ -2) est localisé majoritairement dans le tissu adipeux et intervient principalement dans la différenciation adipocytaire mais aussi dans le stockage des lipides et la lipogenèse (He et al. 2003). Les AGPI et leurs dérivés lipidiques sont des ligands des récepteurs PPAR et plus précisément de PPAR α et de PPAR γ .

Les AGPI-LC peuvent moduler l'expression génique *via* un autre facteur de transcription : SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein). SREBP possèdent plusieurs isoformes : SREBP-1(a et c) qui contrôle l'expression de gènes participant à la synthèse d'acides gras et de TG tandis que SREBP-2 est davantage impliqué dans la régulation de la synthèse du cholestérol (**Figure 23**) (J. D. Horton, Goldstein, and Brown 2002). En particulier, SREBP1c, le transcrite le plus présent au niveau du foie, est le plus « sensible » à la régulation par les acides gras. L'abondance des ARNm de SREBP-1c est régulée par les AGPI par des mécanismes transcriptionnels et majoritairement post-traductionnels (Jump, Tripathy, and Depner 2013). SREBP-1c régule positivement l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* dont FAS (Jump 2008), de la biosynthèse des acides gras (*scd1*, *fads1*, *fads2* et *elovl5/6*) (Matsuzaka et al. 2002; Kumadaki et al. 2008) et de la glycolyse comme la Pyruvate Kinase (Mater et al. 1999). Contrairement aux autres acides gras, les APGI sont capables d'inhiber l'expression hépatique de SREBP-1c et par conséquent l'expression des gènes cibles qu'ils régulent. Plus précisément, les AGPI n-3 apparaissent comme de plus puissants inhibiteurs que les AGPI n-6 (Schmitz and Ecker 2008). Les AGPI-LC sont donc spécifiquement capables de limiter la lipogenèse hépatique même s'ils ne permettent pas d'inhiber totalement l'action de SREBP-1c. En inhibant la maturation et l'activation de SREBP-1c, les AGPI-LC régulent donc le métabolisme lipidique du foie et répriment ainsi la lipogenèse hépatique (Clarke and Jump

1994). Par ailleurs, des études ont montré que l'inactivation du gène hépatique SREBP-1c conduit à la réduction de l'activité de l'enzyme FAS (Jing Xu et al. 1999) permettant ainsi une moindre accumulation des lipides dans le foie (Schmitz and Ecker 2008). D'autres travaux suggèrent également son implication dans la régulation de la transcription de la lipoprotéine lipase et d'apolipoprotéines HDL et VLDL (Guesnet et al. 2005).

PPAR et SREBP-1 apparaissent également comme inhibiteur de la voie Nuclear Factor (NF)- κ B (Szanto and Nagy 2008) et certaines études suggèrent également une interaction entre PPAR α , PPAR γ et le facteur de transcription NF- κ (P. C. Calder 2013). Présent dans de nombreux types cellulaires, NF- κ B joue un rôle clé dans le processus d'inflammation (P. Calder 2006). En effet, NF- κ B régule l'expression de nombreux gènes codant pour des molécules proinflammatoires incluant les cytokines comme l'interleukine (IL)-6 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α). Ainsi, il a été montré que l'EPA et le DHA inhibent l'activité de NF- κ B et réduisent l'expression de cytokines inflammatoires (Novak, Keller, and Innis 2012; Perkins 2007). Le mécanisme d'action envisagé pour l'inhibition de NF- κ B par les AGPI n-3 suppose (i) l'inhibition des récepteurs membranaires susceptibles d'activer NF- κ B : les toll-like récepteurs (TLR4), (ii) l'activation de PPAR α ou (iii) la suppression de la production de sous unités NF- κ B p50 (Jump, Tripathy, and Depner 2013). De plus, ces effets ne sont pas observés avec les AGPI n-6 qui ont une action plutôt inflammatoire (M. Y. Abeywardena, Jablonskis, and Head 2001).

Enfin, si les facteurs de transcription PPAR et SREBP-1c sont les principaux effecteurs de la régulation génique par les AGPI, d'autres mécanismes ont également été décrits. Les AGPI semblent notamment interagir avec le récepteur nucléaire Liver X Receptor α (LXR α) (Matsuzaka et al. 2002)v. LXR α régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse biliaire, le métabolisme des stérols et du glucose ou encore de la lipogenèse (Howell et al. 2009). Néanmoins, le mécanisme d'action des AGPI sur LXR α est controversé car si leur effet inhibiteur a été montré *in vitro* sur des cellules issues d'hépatomes, il n'a pu être confirmé *in vivo* (Pawar and Jump 2003). Le rôle de LXR reste encore peu connu bien que certaines études suggèrent également une interaction avec SREBP-1c (Sampath and Ntambi 2005) ou PPAR (Matsuzaka et al. 2002). Les AGPI peuvent également réguler le métabolisme glucidique par inhibition du facteur de transcription ChREBP impliqué dans le métabolisme glucidique (Dentin et al. 2005). L'activation de ChREBP par formation d'un hétérodimère avec le Max-like factor X (MLX) intervient dans la régulation hépatique du transport du glucose, de la glycolyse mais aussi de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse des AGMI (Jump et al. 2008;

Dentin et al. 2005). Les AGPI semblent également interagir avec les facteurs nucléaires hépatiques HFN4 (hepatic nuclear factor 4), le récepteur aux rétinoïdes RXR α et le récepteur hépatique X LXR α (Jump et al. 2005; Sampath and Ntambi 2005).

Toutes ces régulations ont été particulièrement étudiées dans des conditions non physiologiques (jeûne, renutrition) et la répartition entre les différentes voies géniques restent encore mal décrites dans des conditions physiologiques normales. Par exemple, les AGPI vont activé PPAR dans un état à jeun alors qu'ils vont plutôt inhiber SREBP-1c à l'état nourri (Sampath and Ntambi 2005). Cependant, la régulation de l'expression génique par les AGPI et leurs dérivés est considérée comme l'un des facteurs intervenant dans la régulation du développement de certaines pathologies associées au syndrome métabolique ainsi qu'aux risques de maladies cardio-vasculaires.

2.5 Fonction tissu dépendante

2.5.1 Cerveau

La croissance et la réorganisation structurelle du cerveau va intervenir principalement pendant les deux premières années de vie puis s'atténuer avant de se stabiliser à la fin de l'enfance. Le DHA va principalement s'accumuler jusqu'à l'âge de 5 ans (S. M. Innis 2009). Le DHA intégré dans la bicouche lipidique des membranes neuronales va déterminer la structure et les propriétés physico-chimiques du tissu cérébral, conditionnant son activité fonctionnelle (W. Lukiw and Bazan 2008). Les membranes riches en AGPI-LC n-3 vont être caractérisées par des températures de transition de phase basse qui va leur conférer une grande fluidité (Saiz and Klein 2001). La fluidité membranaire va faciliter les échanges ioniques transmembranaires, la formation et la fusion des vésicules et ainsi conditionner le transfert de l'influx nerveux (Crawford 2006). La réduction de l'épaisseur des membranes et l'augmentation de la flexibilité membranaire va faciliter les interactions avec les protéines la vitesse de transduction du signal et la neurotransmission (S. Innis 2007). Le conditionnement de la distribution et de l'abondance des rafts lipidiques pourrait aussi moduler les mécanismes impliqués dans la neurodégénération (Allen, Halverson-Tamboli, and Rasenick 2007). Les suppléments en AGPI-LC n-3 des enfants *via* les formules infantiles vont impacter le développement du cerveau en fonction du ratio DHA/ARA, néanmoins les bénéfices à long terme de ces suppléments restent incertains et font l'objet de nombreuses revues (Davis-Bruno and Tassinari 2011; Martin, Ling,

and Blackburn 2016; Freemantle et al. 2006; Cardoso, Afonso, and Bandarra 2016; Sun et al. 2016; J. D. Mann et al. 2018). En outre, le maintien d'un statut adéquat est essentiel pour la survie, la croissance et le neurodéveloppement.

Le cerveau étant très riche en AGPI-LC, il est particulièrement sensible à la peroxydation lipidique qui augmente lors du vieillissement. Ainsi le changement de composition des lipides cérébraux est impliqué dans le vieillissement normal aussi bien que pathologique (Bowen, Smith, and Davison 1973). La maladie d'Alzheimer est associée à une diminution plus importante des concentrations de PE et de PC par rapport à des sujets sains (Söderberg et al. 1991; Brenna and D'haeseleer 2007). Néanmoins, le lien de causalité entre la maladie d'Alzheimer et une diminution spécifique du DHA n'est pas totalement établie comme la diminution du DHA n'est pas toujours rapportée dans les études (Skinner et al. 1993). Pour autant, le DHA est toujours diminué dans l'hippocampe chez les sujets atteints d'Alzheimer, structure cérébrale impliquée dans la mémoire (W. J. Lukiw et al. 2005). Ainsi, les études montrent que le DHA et ses métabolites pourraient exercer des fonctions neuroprotectrices contre des modifications neuropathologiques comme l'accumulation de peptide β -amyloïde, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau ou la perte synaptique (Salem, Vandal, and Calon 2015; Boudrault, Bazinet, and Ma 2009; Calon and Cole 2007). Néanmoins la plupart des études d'intervention chez l'Homme ne permettent pas pour le moment de démontrer une amélioration significative du déclin cognitif associée à une supplémentation en AGPI-LC n-3 après apparition des premiers symptômes (Vellas et al. 2014; Pan, Khalil, and Nicolazzo 2015; Cardoso, Afonso, and Bandarra 2016).

2.5.2 Rétines

Le système visuel du nouveau-né n'est pas encore mature et va se développer très rapidement pendant la première année après la naissance jusqu'à ce que le système visuel atteigne sa maturation vers l'âge de 5 ans, lors duquel la capacité visuelle de l'adulte est atteinte (J P SanGiovanni et al. 2000; Uauy et al. 2001, 2003). Le DHA est l'acide gras qui s'accumule le plus dans les structures rétiniennes, atteignant environ 50% des acides gras totaux des segments externes des cellules coniques et des cellules à bâtonnets (Stillwell and Wassall 2003). De ce fait, les apports nutritionnels en AGPI sont critiques pendant cette période et notamment pendant la première année. Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la concentration de DHA du lait maternel ou de l'enfant et l'acuité visuelle (Lauritzen et al. 2001;

S. M. Innis 2009). Même si ces effets restent nuancés chez l'Homme que ce soit dans des études de supplémentation en DHA des mères allaitantes ou des formules infantiles (Simmer, Patole, and Rao 2008), ces limitations semblent rester principalement méthodologiques (Molloy et al. 2012).

Au niveau des cellules photoréceptrices de la rétine, le DHA membranaire participe à la fluidité membranaire nécessaire aux modifications conformationnelles de la rhodopsine (J.-M. Alessandri et al. 2004; D. C. Mitchell, Niu, and Litman 2012), pigment rétinien essentiel à la vision dont l'activation est proportionnelle au nombre d'insaturation des acides gras présents dans les phospholipides membranaires (Acar 2007) et favorise également la ségrégation des rafts (Shaikh et al. 2004). Le rôle structural du DHA dans la modulation des voies de signalisation comme les protéines kinases et l'apoptose induite *in vitro* a également été mis en évidence (H.-Y. Kim, Bigelow, and Kevala 2004).

La littérature est abondante sur la protection de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) par les AGPI-LC n-3, de par leur rôle anti-inflammatoire, anti-angiogénique, anti-apoptotique, protecteur de la neurotoxicité, de la peroxydation au sein de la rétine ainsi qu'au maintien de l'épithélium pigmentaire de la rétine (John Paul SanGiovanni and Chew 2005; Querques, Forte, and Souied 2011; Souied et al. 2016). L'enrichissement des rétines au plus jeune âge préviendrait aussi la rétinopathie associée au diabète (Tikhonenko et al. 2013). Néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets du DHA dans les fonctions visuelles ne sont pas encore bien éclaircis, comme l'influence des enzymes de synthèse et de maintien du niveau de DHA dans les PL ou comme l'acyltransférase 3 de l'acide lysophosphatidique (LPAAT3) dans le maintien de la structure et des fonctions des cellules photoréceptrices (Shindou et al. 2017).

2.5.3 Système cardiovasculaire

Les propriétés bénéfiques des AGPI-LC n-3 sur la diminution du risque de maladies cardiovasculaires sont très documentées comme les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans le monde. Globalement, les AGPI-LC n-3 vont pouvoir intervenir au niveau de multiples voies métaboliques dont: la régulation de la réponse inflammatoire en réduisant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires; la régulation de l'agrégation plaquettaire en régulant leur activation et leur adhésion en modulant l'activité du thromboxane A2 et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1; la régulation des voies de

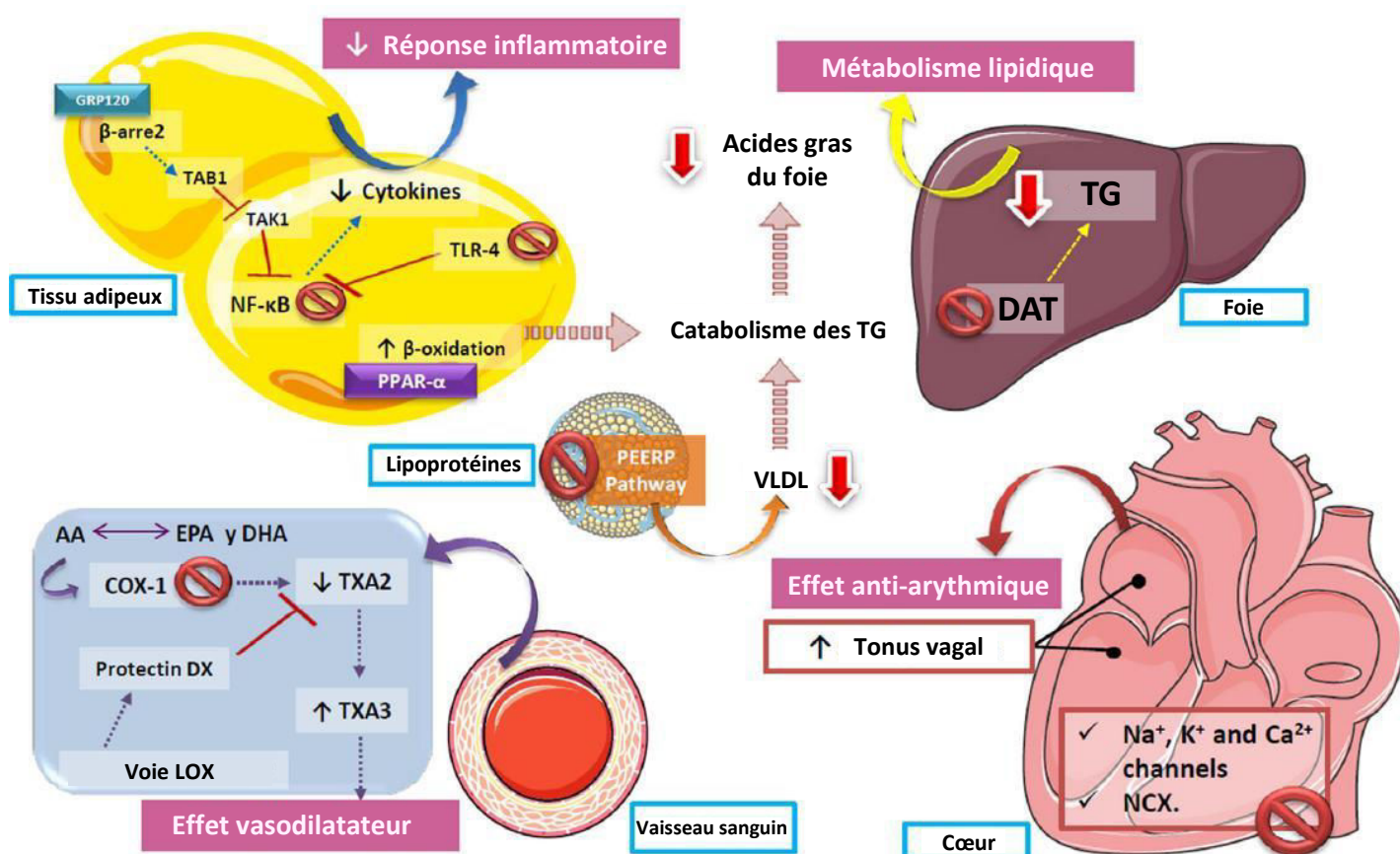


Figure 24. Rôle des AGPI n-3 dans la fonction cardiovasculaire.

Adapté de Calvo et al, 2017.

Rôle des acides gras polyinsaturés dans la fonction cardiovasculaire. Les actions des AGPI-LC n-3 sont diverses, incluant la diminution de la réponse inflammatoire *via* l'inhibition de NF-κB, ainsi qu'une augmentation de la β-oxydation, provoquant le catabolisme des triglycérides (TG) et contribuant à la diminution des lipides stockés dans le foie et les parois des vaisseaux sanguins. De plus, en augmentant la production de TXA3 dans les parois des vaisseaux, les PUFA diminuent la résistance vasculaire et réduisent la tension artérielle. Par ailleurs, l'un des effets les plus décrits des AGPI-LC n3 est leur action sur l'arythmie cardiaque, en inhibant les canaux ioniques voltage-dépendants et les échangeurs, ainsi que l'augmentation du tonus vagal des oreillettes et des ventricules, ce qui conduit à rythme cardiaque moins élevé.

COX-1: cyclooxygénase 1; **DAT:** 1,2 diglyceride acyltransferase; **LOX :** lipoxygénase **NCX:** échangeur d'ions sodium-calcium ; **NF-κB:** nuclear factor kappa B; **PPAR :** Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes ; **TLR-4:** toll-like receptor 4; **TXA2:** thromboxane A2; **TXA3:** thromboxane A3; **VLDL:** very low-density lipoproteins;

coagulation en réduisant la carboxylation des facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K; l'amélioration de la fonction endothéliale étant donné leurs effets sur la synthèse des prostaglandines et l'oxyde nitrique synthase endothéliale; la réduction des lipides sériques à travers leurs effets sur la synthèse hépatique des TG, la β -oxydation des acides gras et le catabolisme des lipoprotéines; l'amélioration de la fonction myocardique par leurs effets de stabilisation de la membrane, ainsi qu'une augmentation de la fluidité, de la taille et de la distribution des radeaux lipidiques membranaires. Néanmoins, ces effets semblent varier en fonction du type d'AGPI ingéré, des sources alimentaires, des doses quotidiennes et des facteurs individuels inhérents au sujet. Ainsi, les méta-analyses récentes prônent que d'autres études sont nécessaires pour déterminer la supplémentation idéale pour chaque type de patient et chaque type d'acide gras (**Figure 24**). (Rhee et al. 2017; Maehre et al. 2015; Calvo et al. 2017; J. H. Lee et al. 2009; M. Miller et al. 2011; Tortosa-Caparrós et al. 2017; Elagizi et al. 2018).

Concernant les lipides sériques, les AGPI-LC n-3 vont diminuer les TG circulants, qui sont des marqueurs de risque cardiovasculaire, principalement suite à l'augmentation de la lipolyse et la β -oxydation par activation des PPAR (M. Miller et al. 2011). Cependant, l'influence des AGPI-LC n-3 sur les taux de cholestérols LDL ou HDL, qui sont des facteurs de risques majeurs de l'athérosclérose, semble plus limitée. Globalement, les dernières méta-analyses sur le sujet rapportent que les AGPI-LC n-3 n'impactent pas ou très peu la concentration plasmatique de cholestérol total car ils augmentent aussi bien les taux de cholestérols HDL que LDL, néanmoins les VLDL sont diminuées (Innes and Calder 2018). La prévention de l'athérosclérose serait donc plus associée aux effets anti-inflammatoire des AGPI-LC n-3 (Thies et al. 2003). De même, plusieurs études s'intéressent au lien entre risque de maladies cardiovasculaires et le déclin cognitif, comme une des hypothèses de l'apparition de la maladie d'Alzheimer est qu'elle pourrait survenir secondairement à l'athérosclérose de vaisseaux intra- ou extra-cérébraux (Stampfer 2006; Casserly and Topol 2004). Plus récemment, l'intérêt se porte sur les effets indépendants et synergique que peuvent exercer l'EPA et le DHA dans la modulation du facteur de risque cardiovasculaire. Ainsi le DHA a un effet hypotriglycéridémiant, hypotenseur et diminue le rythme cardiaque de façon plus importante que l'EPA (Innes and Calder 2018; Xiao fei Guo et al. 2017; AbuMweis et al. 2018; Cottin, Sanders, and Hall 2011).

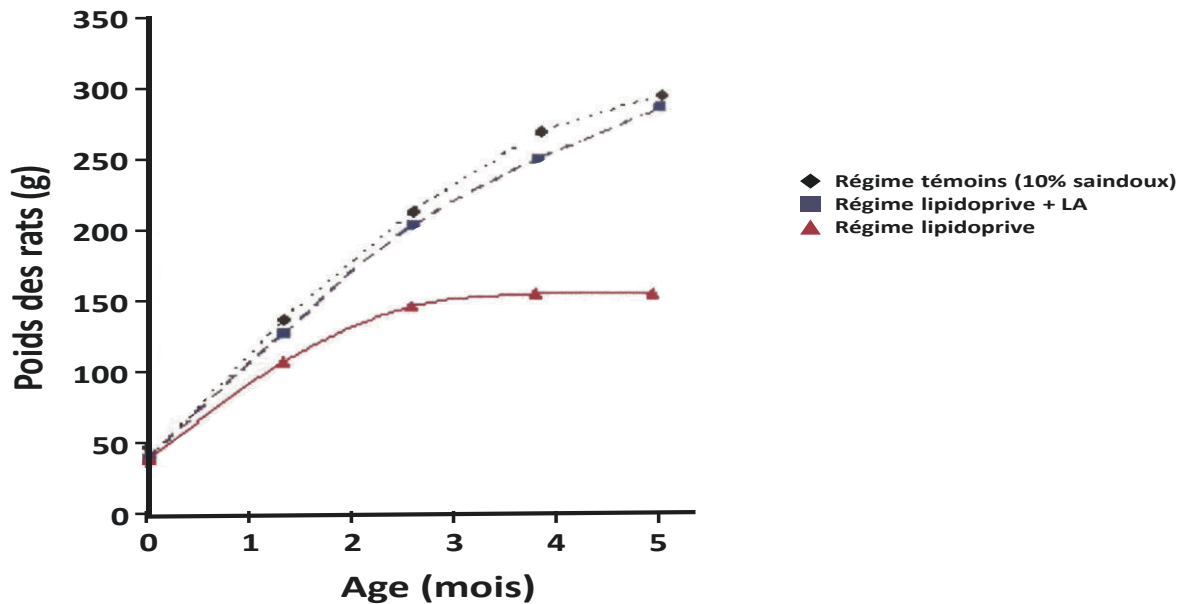


Figure 25. Influence de l'acide linoléique (LA) sur la croissance du rat

Adapté de Burr et Burr, 1929.

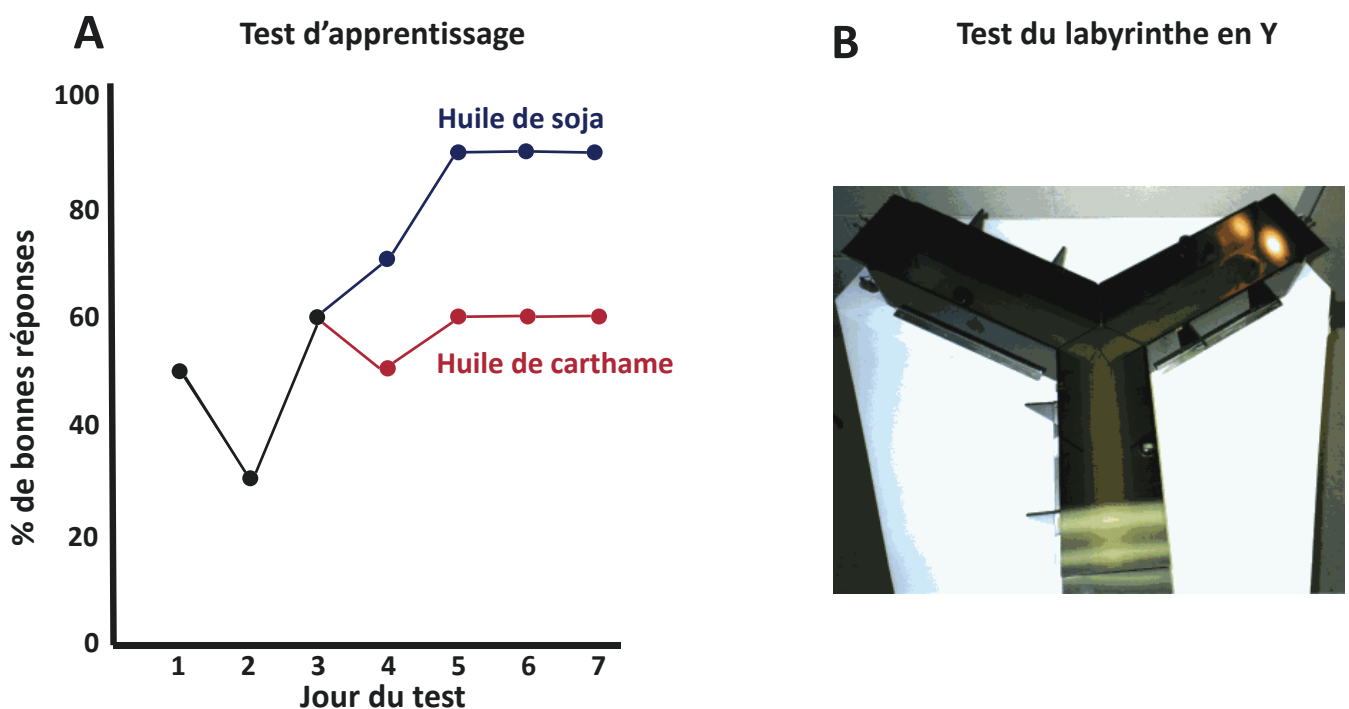


Figure 26. Influence de l'ALA sur l'apprentissage

Adapté de (A) Lamptey et Walker, 1975 et de (B) faculty.virginia.edu.

Après trois jours d'entraînement au test du labyrinthe en Y, par rapport aux rats nourris avec de l'huile de soja à haute teneur en ALA (8,4% d'ALA, ratio LA/ALA=258), les rats nourris avec un régime dont la part lipidique est composée d'huile de carthame « déficiente » en ALA (0,3% d'ALA, ratio LA/ALA=6) ont un taux de bonnes réponses moins élevé, associé à un ralentissement des fonctions cognitives.

3 LES AGPI : ENTRE INTÉRÊTS NUTRITIONNELS ET ENJEUX DE SANTÉ

3.1 *Essentialité, recommandations, consommation et sources des AGPI*

3.1.1 Essentialité des AGPI

D'un point de vue physiologique, une distinction est faite entre les acides gras essentiels regroupant les acides gras indispensables et conditionnellement indispensables, et les acides gras non essentiels (notamment l'acide oléique et les acides gras saturés) (Cunnane 2003). Les acides gras essentiels sont nécessaires au développement et au bon fonctionnement de l'organisme. En particulier, les précurseurs des AGPI n-6 et n-3 sont considérés comme indispensables car non synthétisés par l'Homme ou l'animal. En effet, le LA et l'ALA sont synthétisés chez les végétaux à partir de l'acide oléique par les $\Delta 12$ - et $\Delta 15$ -désaturases qui introduisent les doubles liaisons vers l'extrémité méthyle. La première preuve d'essentialité des acides gras a été démontrée en premier lieu pour le LA. En 1929, Burr et Burr mettent en évidence des altérations physiologiques (retard de croissance, chute des poils, dermatite) et des altérations de la reproduction chez le rat suite à une alimentation totalement dépourvue en acides gras (**Figure 25**) (Burr George O and Burr Mildred M 1929). Une supplémentation en LA permet de corriger ces symptômes alors que l'enrichissement en ALA ne les améliore que partiellement. À la suite de cette expérience, les acides gras (particulièrement le LA) considérés comme des molécules énergétiques ont reçu un tout autre intérêt du fait de leurs propriétés comparables à celles des vitamines (Evans, Lepkovsky, and Murphy 1934; R. T. Holman 1971).

L'attribution du caractère d'acide gras essentiel est apparue plus tardivement pour l'ALA. Entre les années 1975 et 1990, plusieurs études ont démontré qu'une carence en ALA conduit à un ralentissement des fonctions visuelles et cognitives chez les rongeurs ou encore chez les primates (**Figure 26**) (Lauritzen et al. 2001; Lamptey and Walker 1976; Tinoco 1982). Chez l'Homme, le cas d'une jeune fille nourrie par voie parentérale avec une émulsion dépourvue d'ALA a permis de confirmer l'importance des AGPI n-3 (T. Holman and Hatch 1981). En effet, chez l'enfant, l'absence d'ALA conduit au développement de troubles de la mobilité (engourdissement, faiblesse) et de la vision qui peuvent être corrigés par une supplémentation en ALA. Le caractère indispensable des AGPI n-3 pour l'homme sera admis en 1985 (AFFSA 2011). Les études animales et ces cas de carences chez l'Homme ont donc permis de mettre en

Comité d'expertise	Année	Population	Recommandation journalière
American Heart Association	2011	Santé cardiaque	2 portions de poisson journalière pour la prévention primaire
Heart Foundation Australia	2008	Santé cardiaque	500mg EPA/DHA pour la prévention primaire
FAO/WHO Expert Consultation	2010	Santé générale	250mg EPA/DHA
European Food Safety Authority	2010	Santé générale	250mg EPA/DHA
Japanese Ministry of Health	2009	Santé générale	> 1g EPA/DHA
Health Council Netherlands	2006	Santé générale	450mg EPA/DHA
Australia New Zealand National Health and Medical Research Council	2006	Maladies chroniques	610mg AGPI-LC n-3 pour les hommes et 430mg pour les femmes
Belgian Superior Health Council	2009	Santé cardiaque	Lipides issus du poisson quotidien ou capsule d'1g
ANSES (France)	2011	Santé générale	500 mg EPA/DHA

Tableau 2. Recommandations nutritionnelles des AGPI-LC n-3 des comités d'experts internationaux pour l'adulte

évidence l'essentialité du LA et ALA et ces acides gras doivent donc obligatoirement être apportés par l'alimentation. Comme les Mammifères peuvent ensuite convertir ces deux acides gras indispensables en leurs dérivés respectifs, le DHA, l'EPA et l'ARA sont appelés « conditionnellement indispensables » car rigoureusement requis uniquement si les précurseurs sont absents.

3.1.2 Recommandations et ANC

3.1.2.1 *Nutrition générale*

Les apports nutritionnels conseillés sont définis en France par l'Agence Nationale de la Sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (ANSES) et ont été réévalués en 2010. Chez l'adulte, le besoin minimal en ALA pour l'Homme a été déterminé à 0,8% de l'apport énergétique totale (AET) soit 1,8g/j pour un AET de 2000 kcal/j. L'apport nutritionnel conseillé (ANC) a été fixé chez l'Homme à 1% de l'AET. Concernant le DHA, l'ANC est placé à 250 mg/j soit 0,1% de l'AET. L'ANSES préconise également un apport de 250mg/j d'EPA, montant ainsi l'apport total d'AGPI-LC n-3 à 500mg/j. Cet ANC est motivé historiquement par le caractère cardioprotecteur de ces AGPI-LC n-3 mais surtout par les besoins liés au développement du cerveau et à son fonctionnement optimal, ainsi qu'à la prévention des maladies neurodégénératives comme la maladie Alzheimer (AFFSA 2011).

Les recommandations pour les AGPI n-6 concernent exclusivement le LA, bien que son besoin suscite de nombreuses questions comme c'est l'AGPI prédominant dans l'alimentation. L'ANC déterminé pour le LA en France a été établi à 4% de l'AET, soit 8,8 g/j pour un AET de 2000 kcal/j. Cette valeur provient d'un consensus entre le souci d'atteindre un total d'AGPI n-6 suffisant et le point d'équilibre des apports pour respecter un ratio LA/ALA inférieur à 4 (AFFSA 2011).

D'un point de vue international, les différentes agences de santé s'accordent sur l'indispensabilité des AGPI-LC n-3 et la plupart des recommandations vont de 250 à 1000 mg/j (**Tableau 2**). Ainsi la France se situe dans la médiane des recommandations mondiales pour les AGPI-LC n-3 (M. Miller et al. 2011; Nhmrc 2005; World Health Organization 2008; European Food Safety Authority 2010; Uenishi 2007; AFFSA 2011; Gezondheidsraad 2006; Conseil Supérieur de la Santé 2016).

Il n'existe pas de recommandation générale chez le rongeur, qui présente une conversion des AGPI-LC n-3 plus importante et donc un besoin physiologique sûrement moins élevé que chez l'Homme. Chez le rongeur, les seuls AGPI présent dans les régime standardisés AIN93 sont l'ALA et le LA et leurs taux ont été définis principalement à partir d'études chez la souris. Le régime AIN93M (régime de maintien chez l'adulte) contient 2,7 g/kg d'ALA (0,7% de l'AET) et 10,4 g/kg de LA (2,6% de l'AET) et le régime AIN93G (régime pour la croissance, la gestation et la lactation) contient 4,8 g/kg d'ALA (1,1% de l'AET) et 35,7 g/kg de LA (8,5% de l'AET) au minimum (Reeves, Nielsen, and Fahey 1993). Chez le rat et en présence d'ALA, le besoin en LA a été réévalué chez le rat à 1,5% de l'AET si le régime contient 0,5% d'ALA de l'AET (Choque et al. 2015).

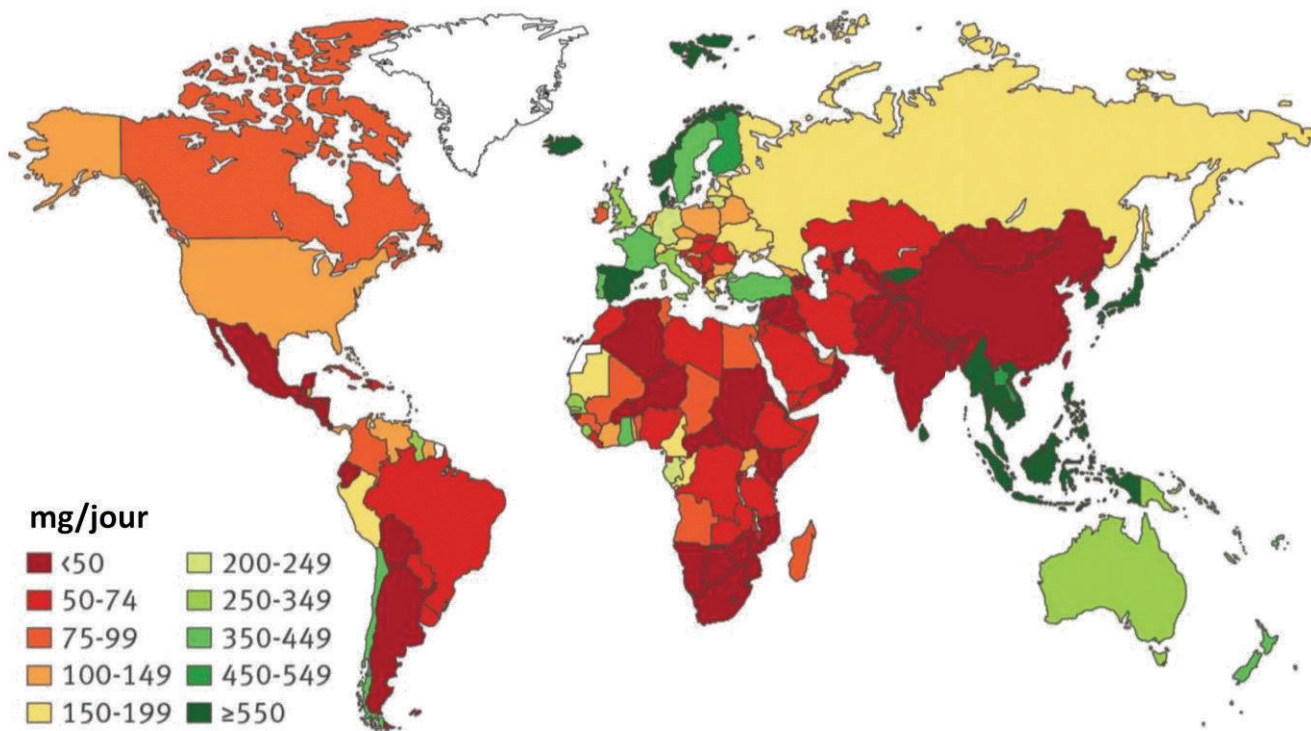
3.1.2.2 *Nutrition infantile*

L'allaitement maternel exclusif est préconisé au cours des 6 premiers mois de vie pour les nourrissons nés à terme et en bonne santé pour leur permettre un développement et une croissance optimaux, c'est-à-dire sans consommation d'autre nourriture ou boisson, même l'eau. Après 6 mois, l'allaitement non exclusif est conseillé jusqu'à 2 ans ou plus, tout en diversifiant l'alimentation (Organization 1995; Turck et al. 2013).

Quand l'enfant ne peut pas être allaité, son alimentation est basée sur les préparations pour nourrissons (aliments lactés 1^{er} âge, de 0 à 6 mois) puis sur les préparations de suite (aliments lactés 2^{ème} âge, de 6 mois à 2 ans). En Europe, les recommandations pour ces aliments ont été mises à jour en 2016, avec une mise en application pour 2020 (Serrano-Cinca, Fuertes-Callén, and Mar-Molinero 2005). Les préparations pour nourrissons comme les préparations de suite doivent contenir 60-70 kcal/100mL d'énergie, 4,4-6,0 g/100kcal de lipides, 500-1200 mg/100kcal de LA, 50-100 mg/100kcal d'ALA et 20-50 mg/100kcal de DHA, moins de 2 g/L de phospholipides. De plus, l'ajout d'autres AGPI-LC ne doit pas dépasser 2% de la teneur en matière grasse, l'ARA ne doit pas dépasser 1% et la teneur en EPA doit être inférieure à la teneur en DHA. La nouveauté majeure apportée par cette directive est l'obligation d'ajouter du DHA au sein des formules, provenant principalement des évidences des bénéfices des AGPI-LC n-3 sur l'acuité visuelle (Agostoni et al. 2011; Hojsak et al. 2018).

Pour les enfants et les adolescents de 2 à 18 ans, le manque de données de la littérature sur l'apport en AGPI et sur ces différentes populations font que les recommandations sont principalement adaptées de celles de l'adultes (European Food Safety Authority 2010). Les

Consommation d'Omega-3 issus des produits de la mer pour les adultes > 20 ans



Consommation d'Omega-3 issus des végétaux pour les adultes > 20 ans

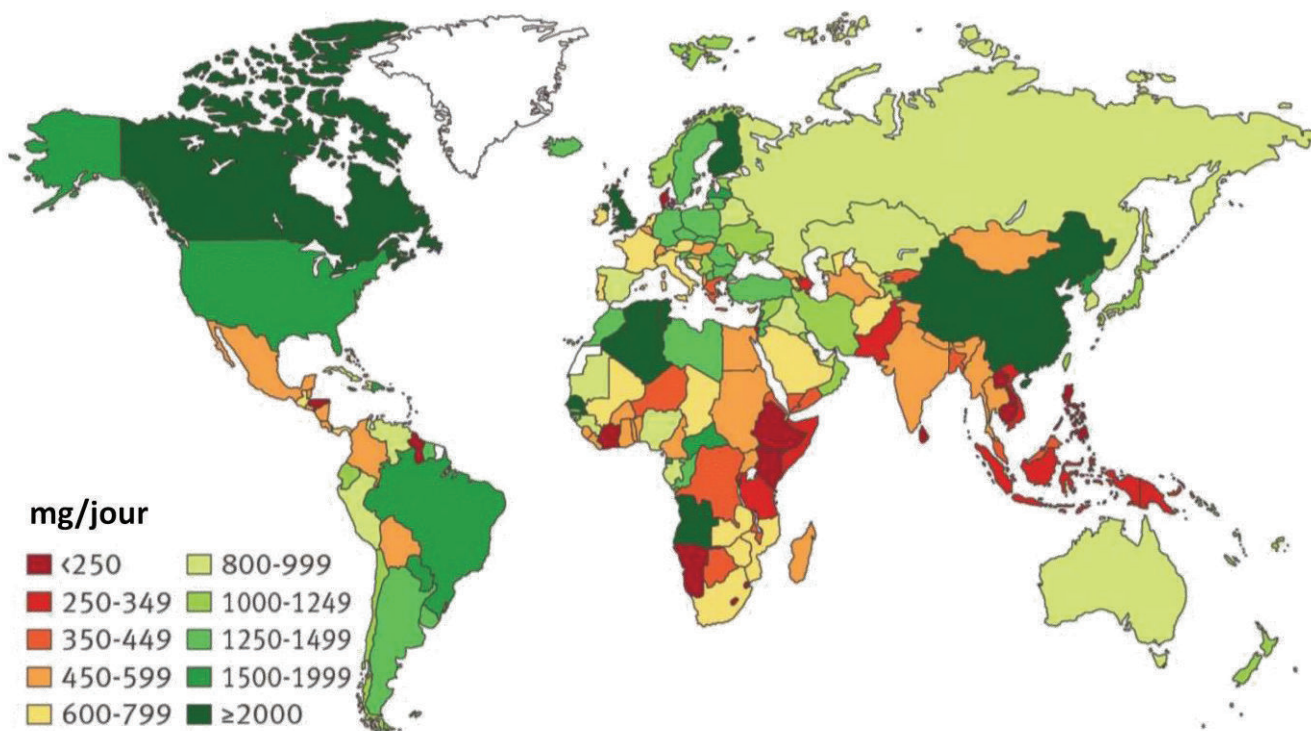


Figure 27. Carte de la consommation mondiale d'Omega-3

Adapté de *Micha et al., 2014*

recommandations en France sont :

(i) de 6 mois-3 ans : 0,45% de l'énergie d'ALA et 70mg/jour de DHA

(ii) de 3-9 ans : 1,0% de l'énergie d'ALA et 250mg/jour d'EPA+DHA avec EPA<DHA

(iii) de 10-18 ans : 1,0% de l'énergie d'ALA et 500mg/jour d'EPA+DHA (AFFSA 2011)

Néanmoins il n'y a pas de consensus entre les différents pays, ainsi les USA n'ont pas de recommandation en AGPI-LC n-3 pour ces catégories d'âges et leurs recommandations en ALA sont exprimées en g/jour et sont différentes pour les garçons et les filles (Flock, Harris, and Kris-Etherton 2013). En Europe, l'EFSA recommande 0,5% de l'énergie en ALA et 250mg d'AGPI-LC n-3 de 2 à 18 ans (European Food Safety Authority 2010).

3.1.3 Consommation alimentaire

3.1.3.1 *Nutrition générale*

Dans la société occidentale, l'alimentation étant principalement végétale, ce sont les précurseurs LA et ALA qui sont majoritairement consommés. Mais le régime occidental est riche en n-6 et pauvre en n-3, entraînant donc une réduction de la synthèse d'AGPI-LC n-3. Plusieurs études se sont intéressées à la consommation globale et mondiale en Oméga-3, dont l'analyse systématique des 266 pays des niveaux de consommations en lipides alimentaires entre 1990 et 2010 (**Figure 27**) (Micha et al. 2014). La consommation globale d'Oméga-3 issus de produits de la mer était de 163 mg/jour avec de grandes variations régionales (de 50 à 700 mg/jour) et nationales (de 5 à 3886 mg/jour) ainsi qu'en fonction du sexe, de l'âge et de la classe sociale. Les pays avec la plus haute consommation étant les îles du Pacifique, le Danemark, le Japon et la Corée du Sud ; les plus bas étant les pays d'Afrique. Sur les 187 pays dont les données étaient suffisantes pour être exploitables, 45 avaient un apport > 250 mg/jour mais 100 pays avec une consommation < 100 mg/jour avec 66,8% de la population mondiale représentée. La consommation d'Oméga-3 végétaux était environ 10 fois plus importante, néanmoins seulement 52 des 187 pays atteignaient le niveau de consommation recommandé par l'OMS (1100 mg pour 2000 kcal/jour), et 17,8% de la population mondiale avait un apport < 500 mg/jour, soit 61 pays (Micha et al. 2014). En 2016, Stark et collaborateurs ont ensuite réalisé une revue systématique au niveau mondiale de l'index Oméga-3 (EPA+DHA des globules rouges). Comme suspectée, la carte de consommation des Oméga-3 issus des produits

ACIDES GRAS (% des acides gras totaux)		Lait maternel		Préparations pour nourrissons			
				Mélanges d'huiles végétales			Mélanges de lipides laitiers et d'huiles végétales
				À l'huile de palme	Sans huile de palme		Sans huile de palme
				Avec huile de coco	Sans huile de coco	Avec huile de coco	Sans huile de coco
n	Intervalle	ARA / DHA ajouté : n = 4 / non ajouté : n = 2	ARA / DHA ajouté : n = 4 / non ajouté : n = 1	ARA / DHA ajouté : n = 2 / non ajouté : n = 1	ARA / DHA ajouté : n = 1 / non ajouté : n = 3		
SATURÉS		9	33,8 - 46,9	41 - 50,3	31,5 - 35,6	33,2 - 34,3	35,1 - 38,0
Acide butyrique	C4:0			ND	ND	ND	0,6 - 0,7
Acide caproïque	C6:0	4	0,03 - 0,79	0,1	ND	ND - 0,1	0,6
Acide caprylique	C8:0	10	0,08 - 0,61	1,0 - 1,5	ND	1,6 - 1,7	0,4
Acide caprique	C10:0	12	0,72 - 1,71	0,9 - 1,3	ND - 0,1	1,4 - 1,5	1,1 - 1,2
Acide laurique	C12:0	18	2,31 - 6,74	7,8 - 11,5	0,1 - 0,2	12,0 - 12,6	1,3 - 1,6
Acide myristique	C14:0	19	3,98 - 8,67	4,0 - 5,5	0,7 - 0,8	5,1 - 5,6	5,0 - 5,5
Acide palmitique	C16:0	19	16,6 - 25	18,2 - 25,4	26,1 - 29,5	8,1 - 8,9	16,5 - 20,4
Acide stéarique	C18:0	19	3,39 - 6,89	3,5 - 4,0	3,3 - 4,1	2,6 - 3,5	5,4 - 6,1
Acid arachidique	C20:0	15	0,13 - 0,83	0,3 - 0,4	3,3 - 4,1	0,3 - 0,4	0,3
Acide lignocérique	C24:0	13	0,04 - 0,61	0,1	0,1	0,1 - 0,2	0,1
MONOUNSATURÉS		9	30,8 - 42,9	28,7 - 41,7	43,3 - 46,7	41,3 - 47,6	41,7 - 43,6
Acide palmitoléique	C16:1 n-7	16	1,62 - 5,2	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	0,1 - 0,2	1,0 - 1,1
Acide oléique	C18:1 n-9	19	26,5 - 35,6	28,4 - 40,8	42,3 - 45,5	40,9 - 47,1	39,1 - 41,2
Acide nervonique	C24:1 n-9	11	0,03 - 1,21	ND - 0,1	0,1	ND - 0,1	0,1
POLY-INSATURÉS				16,4 - 20,4	20,4 - 21,0	18,0 - 23,8	19,7 - 19,5
AGPI n-6		12	11,6 - 26	13,6 - 18,5	17,3 - 18,2	15,7 - 21,9	16,1 - 16,5
Acide linoléique	C18:2 n-6	19	10,1 - 24,3	13,3 - 18,5	16,8 - 17,8	15,2 - 21,5	15,6 - 16,3
Acide γ-linoléique	C18:3 n-6	13	0,06 - 0,23	ND	ND	ND	ND
Acide arachidonique	C20:4 n-6	19	0,45 - 0,86	Ajouté : 0,2 - 0,6 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,2 - 0,6 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,2 - 0,6 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,2 - 0,6 / non ajouté : ND
Acide adrénique	C22:4 n-6	9	0,04 - 0,47	ND	ND	ND	ND
AGPI n-3		12	0,85 - 3,57	1,9 - 2,8	2,2 - 3,7	1,9 - 2,7	2,5 - 3,0
Acide α-linolénique	C18:3 n-3	19	0,67 - 1,9	1,6 - 2,4	1,9 - 3,4	1,8 - 2,7	2,4 - 2,5
Acide stéaridonique	C18:4 n-3	4	0,23 - 0,68	ND	ND	ND	ND
Acide eicosatriénoïque	C20:3 n-3	9	0,05 - 0,4	ND	ND	ND	ND
Acide eicosapentaénoïque	C20:5 n-3	16	0,06 - 0,33	ND - 0,1	ND - 0,1	ND - 0,1	ND - 0,1
Acide docosapentaénoïque	C22:5 n-3	12	0,16 - 0,54	ND	ND	ND	ND - 0,1
Acide docosahexaénoïque	C22:6 n-3	18	0,09 - 1,03	Ajouté : 0,2 - 0,3 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,2 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,1 - 0,3 / non ajouté : ND	Ajouté : 0,3 / non ajouté : ND
RATIO LA/ALA		5	3,45 - 11,9	5,5 - 10,6	4,9 - 9,4	7,5 - 11,9	6,2 - 6,7
RATIO ARA/DHA (Quand ajout d'ARA/DHA)		4	1,47 - 3,43	1,0 - 2,0	1,5 - 2,0	1,3 - 4,0	1,0

Tableau 3. Composition en acides gras du lait maternel et des préparations pour nourrissons.

Traduit de *Delplanque et al., 2015*.

*: Les données sur les acides gras dans le lait maternel ont été calculées à partir d'une recherche exhaustive de la littérature originale publiée à partir de 2009. Pour chaque acide gras, lorsque moins de 10 sondages ont été trouvés, les valeurs indiquées sont la moyenne la plus petite (min) et la plus élevée (max). Lorsque 10 enquêtes ou plus ont été trouvées ($n \geq 10$), les 10ème et 90ème percentiles des moyennes sont donnés.

** : Les acides gras ont été analysés dans des préparations pour nourrissons présentes sur le marché en 2013 et provenant de différents fabricants et détaillants du monde entier. Les analyses ont été effectuées par un laboratoire certifié, en utilisant des méthodes accréditées. ND: quantité non quantifiable ($< 0,05\%$)

de la mer est très similaire à la carte de l'index Oméga-3. Néanmoins certaines différences apparaissent mais semblent plus associées au manque de données ainsi qu'à un manque d'homogénéité dans les mesures des taux d'acides gras sanguins (Stark, Van Elswyk, et al. 2016).

Concernant plus spécifiquement la consommation d'AGPI-LC en France, chez l'adulte la consommation moyenne est de 273 mg/jour de DHA, 150 mg/j d'EPA avec des consommations maximales (95^{ème} percentile) de 574 mg/j pour les femmes et 668 mg/j pour les hommes de DHA et 308mg d'EPA selon le dernier rapport européen (Enti, Opi, and On 2012; European Food Safety Authority 2010). L'étude individuelle nationale sur les consommations alimentaires 2 (INCA2) présente un apport moyen quotidien chez l'adulte de 137mg de DHA et de 102mg d'EPA (AFSSA 2009). Ainsi, seul 14,6% de la population adulte atteignait les recommandations pour le DHA et 7,8% pour l'EPA (Tressou et al. 2016).

Chez le jeune enfant (0-3 ans), il n'existe pas de données plausibles accessibles pour l'Europe. Chez l'enfant (3-13 ans), la consommation d'EPA+DHA est de 62-66 mg/j (Allemagne). Chez l'adolescent (13-19 ans), les consommations des AGPI-LC individuelles sont disponibles uniquement en Belgique et sont de 111 mg/jour pour le DHA et de 56 mg/jour pour l'EPA.

3.1.3.2 Nutrition infantile

La part lipidique de lait humain est la source majeure d'énergie pour l'enfant en croissance et procure approximativement 45 à 55% de l'énergie totale (Martin, Ling, and Blackburn 2016). Le lait maternel contient entre 3 et 5% de lipides, constitués principalement de TG (>95%), de PL (0,8%) provenant principalement du relargage des acides gras du tissu adipeux. Le lait maternel contient aussi du cholestérol (0,5%, 100-150mg/j), nécessaire à la croissance et à l'intégrité des membranes cellulaires. La composition en acide gras et la quantité de lipides contenu dans le lait maternel change en fonction du cycle circadien et de la période de lactation (SINHA, SARAN, and SINHA 1959; J. Kim and Friel 2012). Néanmoins, la majorité des acides gras du lait maternel sont des AGS, principalement de l'acide palmitique, puis des AGMI, principalement de l'acide oléique (C18:1 n-9) (**Tableau 3**) (Bernadette Delplanque et al. 2015). Parmi les AGPI-LC, le taux de DHA du lait maternel est très variable parmi les populations, variant de 0,1% aux USA à 1% au Japon, alors que la proportion d'ARA est plus stable et ne varie que de 0,1 à 0,2%. Les quantités moyenne d'EPA et de DPA sont de 0,2% et de 0,3%, respectivement, et semblent rester assez stables (Yuhas, Pramuk, and Lien 2006). Le LA

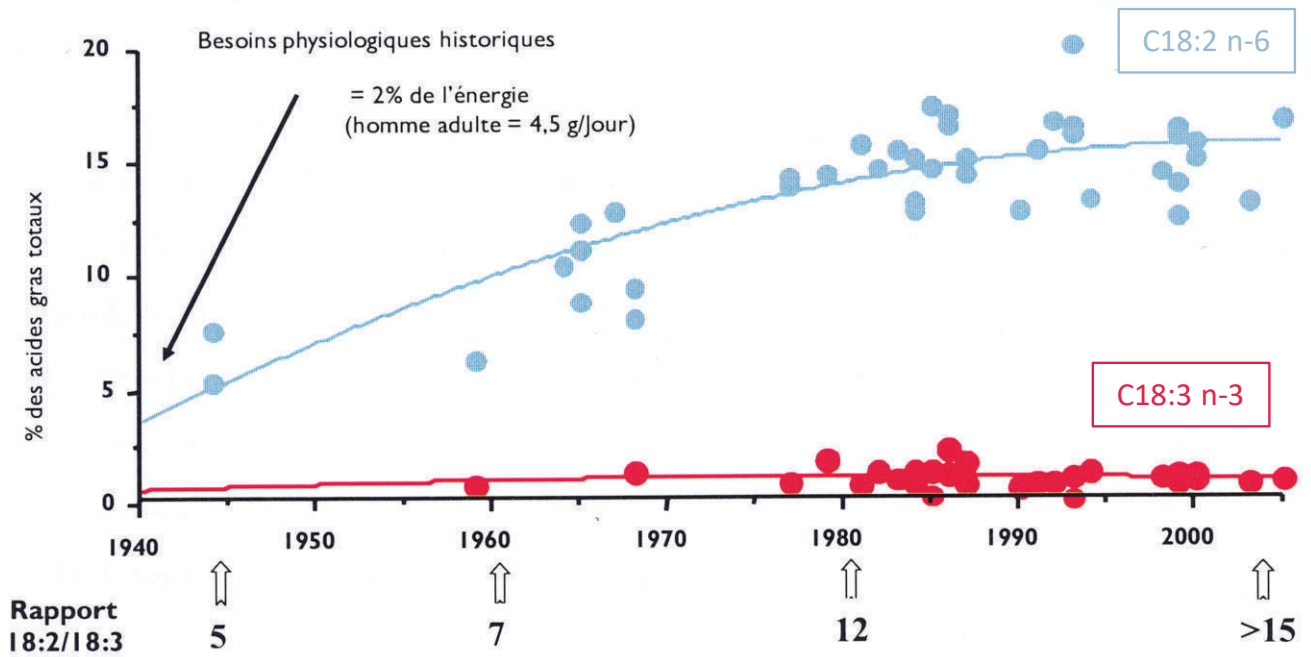


Figure 28. Evolution de la teneur en LA et en ALA dans le lait maternel de femmes américaines

D'après Aihaud et al, 2006.

représente en moyenne dans les pays occidentaux 12 à 15% des acides gras totaux du lait de femme. Néanmoins, la teneur en LA du lait humain s'est considérablement accrue au cours de ces 50 dernières années, augmentant de 6% à 15% environ chez les américaines. (Ailhaud et al. 2006). Depuis 2005 cette teneur en LA semble rester stable vers 16%, néanmoins la teneur en ALA du lait maternel n'a elle presque pas évolué, ce qui a entraîné une augmentation du ratio LA/ALA de 5 à plus de 15, légèrement inférieur en Europe (**Figure 28**).

Quand les nourrissons ne peuvent pas être allaités, leur alimentation est basée sur des formules infantiles. La composition de ces formules est en constante évolution en fonction des avancées des connaissances sur les besoins spécifiques des populations concernées ainsi que sur les potentiels bénéfices santé de certains constituants présents dans le lait maternel. Ces évolutions n'impactent bien sûr pas que la part lipidique mais aussi les parts glucidique (ex : les « Human Milk Oligosaccharides »), protéique (ex : la qualité des protéines, les peptides bioactifs), vitaminique, minérale et plus récemment les pré- et probiotiques (Berthold Koletzko et al. 2005). En considérant les lipides, après avoir retiré la part lipidique de provenance animale au sein des formules infantiles dans les années 60 en France en faveur de l'huile végétale (palme principalement), les entreprises utilisent maintenant des mélanges d'huiles végétales pour atteindre les recommandations. Les acides gras sont ainsi apportés presque exclusivement sous la forme de TG. L'augmentation de la diversité du mélange d'huiles végétales (palme, maïs, colza, soja, olive, tournesol, coprah, coco...) ainsi que la volonté de se rapprocher de plus en plus de la composition du lait maternel a sûrement fait que certaines formules contiennent aujourd'hui des lipides d'origine laitière comme part de leur base lipidique (Martin, Ling, and Blackburn 2016). L'ajout de matière grasse laitière (MGL) dans les formules infantiles pourrait être bénéfique par son statut en acide gras plus proche de celui du lait maternel, notamment en AGCC et en AGS, mais aussi par la structure des lipides (PL, C16:0 en position sn-2, globule gras) et par la présence de cholestérol dans la MGL. Certaines formules sont aussi supplémentées en DHA et/ou en ARA, l'ARA étant indispensable pour la croissance du fait de l'action de ses dérivés comme le thromboxane (**Tableau 3**).

3.1.4 Sources et durabilité des AGPI

Si les AGPI n-6 sont d'utilisation courante dans l'alimentation, l'apport alimentaire des AGPI n-3 est plus restreint. Alors que le précurseur LA va être apporté essentiellement par les matières grasses végétales (MGV), en France 75% de l'ALA provient des lipides d'origine animale

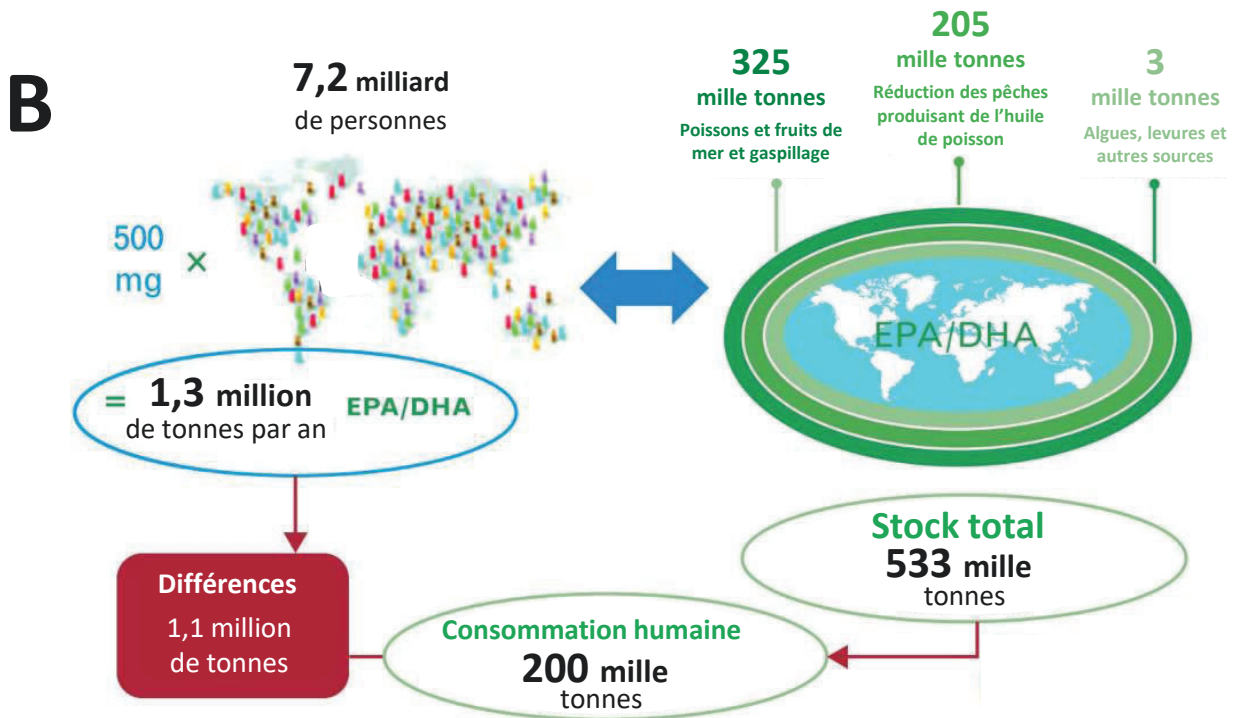
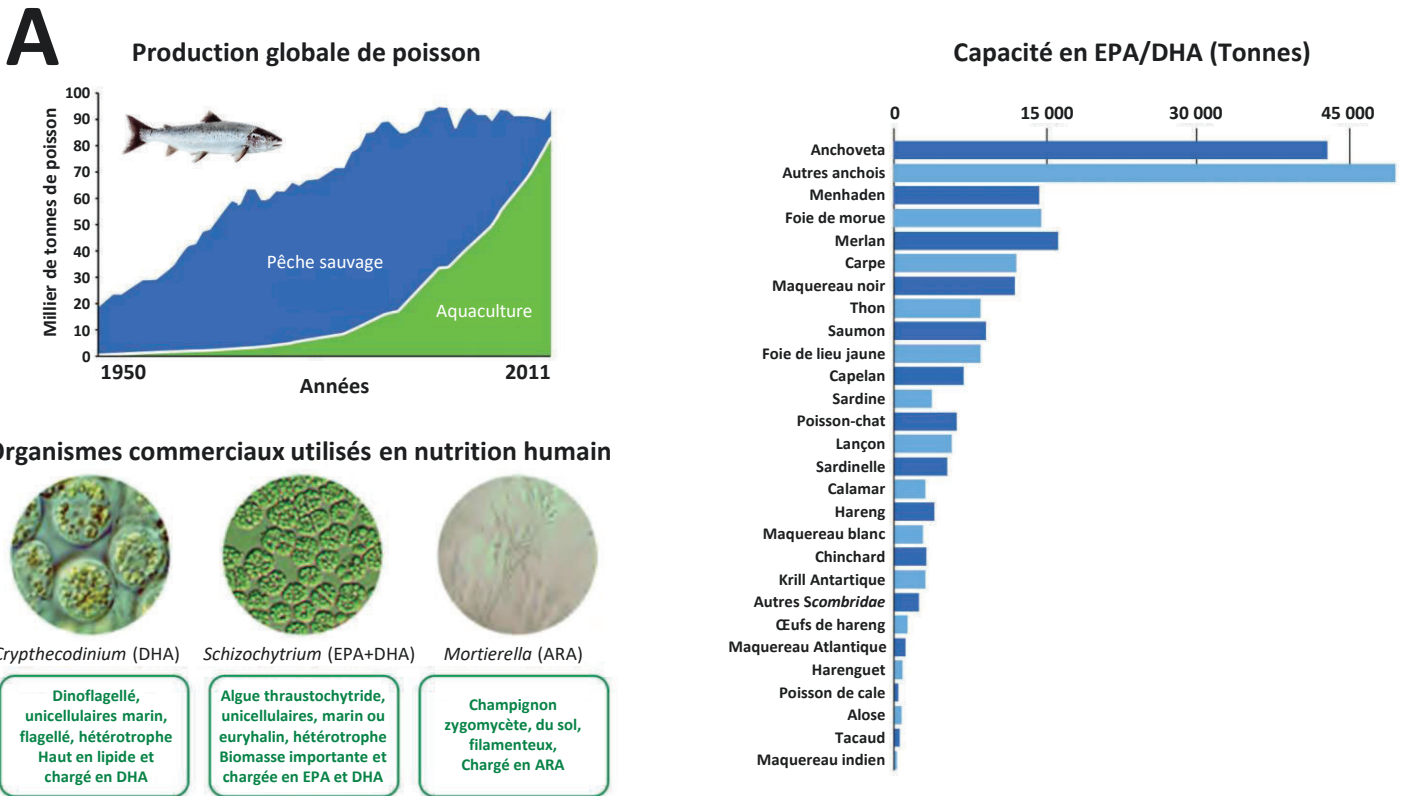


Figure 29. Sources des AGPI-LC n-3 et leur durabilité

Adapté de *Salen et Eggersdorfer, 2015*.

(A) Sources d'EPA et de DHA et exemple de sources alternatives aux poissons. (B) Schématisation du problème de durabilité d'une consommation alimentaire en AGPI-LC n-3 mondiale suivant les recommandations de l'OMS (500 mg/j EPA+DHA).

(Combe and Boué-Vaysse 2004; Tressou et al. 2016). Le LA va être particulièrement présent dans les huiles de carthame ($\approx 75\%$), de pépin de raisin ($\approx 70\%$), de tournesol ($\approx 65\%$), de maïs ($\approx 55\%$) et d'arachide ($\approx 20\%$). L'ALA est présent majoritairement dans les huiles de lin ($\approx 65\%$), de noix ($\approx 15\%$), de colza ($\approx 8\%$) ou de soja ($\approx 5\%$) (J. H. Lee et al. 2009; Philippe Legrand 2004).

Les AGPI-LC n-3 proviennent principalement des produits de la mer et principalement des poissons gras en fin de la chaîne alimentaire qui stockent dans leur tissu adipeux les AGPI-LC n-3 provenant zooplancton qui biosynthétisent les AGPI-LC dont l'EPA et le DHA, se nourrissant eux-mêmes de phytoplancton (FAO 2013). La conversion de l'ALA jusqu'à l'EPA et en plus jusqu'au DHA étant insuffisante chez l'Homme pour atteindre des taux tissulaires suffisants pour exercer des effets bénéfiques, l'apport direct des AGPI-LC n-3 est donc nécessaire (Stark, Van Elswyk, et al. 2016). Ainsi, la production mondiale de poisson a dû augmenter pour subvenir aux besoins des populations. Le tonnage de poisson de pêche étant resté stable à partir des années 90, l'aquaculture s'est fortement développée et continue encore de croître (**Figure 29-A**). Les anchois sont la principale source d'AGPI-LC n-3, mais leur utilisation principale reste la production d'huiles et de protéines pour l'aquaculture. Il se pose donc les questions de la durabilité, de la capacité de production et de l'accessibilité, tant d'un point de vue de consommation alimentaire, qu'économique ou écologique vis-à-vis des ressources en AGPI-LC n-3. En effet, aujourd'hui la production mondiale ne permettrait de fournir que 10% des besoins en AGPI-LC n-3, en considérant les recommandations de l'OMS (**Figure 29-B**). Ainsi, il devient nécessaire de trouver des sources alternatives d'apport en AGPI-LC pour l'Homme, et les algues semblent être pour le moment la piste la plus durable.

3.1.5 Stratégies d'optimisation du statut en AGPI-LC n-3 chez l'Homme

3.1.5.1 *Augmenter les apports*

Pour augmenter le statut en AGPI-LC n-3, le principal objectif a été d'augmenter les apports directs aussi bien de l'ALA pour induire la conversion, que de ses dérivés EPA et DHA comme la conversion à partir du précurseur est limitée. Les sources de poissons gras sous leur forme naturelle étant d'accès limitées, ou peu consommées, de nombreux produits et stratégies d'apports des AGPI n-3 sous d'autres formes sont apparus sur le marché (Philippe Legrand 2004). Ainsi, des produits directement supplémentés en AGPI-LC n-3 sont retrouvés comme

Source	Forme chimique
	Acides gras libres
Microalgues et poissons	<p>Lié dans les TG, principalement en position sn-2</p> <p>AGPI-LC n-3</p>
Huiles de poisson raffinées Huiles d'esters éthyliques de poisson	<p>AGPI-LC n-3 - éthyl</p> <p>^a Lié au TGr (55-60%), aléatoirement en position sn-2 et sn-1/3</p>
Préparations de triglycérides réestérifiés à base d'huile de poisson	<p>Lié au DAG (38-42%)</p> <p>AGPI-LC n-3</p>
	<p>Lié au MAG (1-3%)</p> <p>AGPI-LC n-3</p>
	Acides gras libres
Huile de krill	<p>Lié dans les TG, DAG, MAG et dans les PL en position sn-2</p> <p>AGPI-LC n-3</p>

Tableau 4. Formes chimiques des AGPI-LC n-3 dans les différentes sources alimentaires

Adapté de *Schuchardt et Hahn, 2013*.

TG : triglycérides, DAG : diglycérides, MAG : monoglycérides, TGr : triglycérides ré-estérifiés, PL : phospholipides, R : autres acides gras.

^a 45% d'EPA et de DHA minimum lié aux TG et 60% d'AGPI n-3 minimum selon l'European Pharmacopoeia

des beurres et des margarines, des produits laitiers, le lait et les formules infantiles ou encore des jus de fruits, des barres de céréales, du pain et des pâtes, des plats préparés (Jay Whelan and Rust 2006). Néanmoins l'ajout d'AGPI-LC dans ces produits provient encore majoritairement d'huiles de poissons purifiées. En effet, les huiles enrichies en AGPI-LC provenant des algues marines ont encore des rendements assez faibles et des coûts plus élevés mais restent une piste très prometteuses (G. Singh and Patidar 2018). L'huile de krill représente aussi un contributeur possible assez récent qui ne contribue pour le moment qu'à 0,3% de la consommation mondiale d'AGPI n-3 mais est estimée dans le futur comme pouvant subvenir à entre 8-9% des besoins de la population (Kwantes and Grundmann 2015). Les organismes génétiquement modifiés, soit végétaux dans lesquels sont insérés les gènes pour les élongases et les désaturases de mammifères, soit animaux après insertion de désaturases plus actives, sont aussi une piste d'apport. Néanmoins ces produits restent encore très régulés et font face à beaucoup de résistance, principalement dans les pays occidentalisés (Stark, Van Elswyk, et al. 2016; Jay Whelan and Rust 2006).

Différents compléments alimentaire contenant des huiles enrichies en AGPI-LC n-3 ont aussi fait leur apparition sur le marché. Ces huiles peuvent être sous différentes formes : TG (la principale), TG ré-estérifiés (provenant d'un processus de ré-estérification industriel), AGL, EE, PL (provenant principalement de l'huile de krill), encapsulées ou micro-encapsulées, ce qui peut leur donner des biodisponibilités voir des propriétés physiologiques associées différentes (**Tableau 4**) (Schuchardt and Hahn 2013).

L'enrichissement des produits d'élevage et particulièrement l'introduction de graines de lin extrudées riches en ALA dans l'alimentation d'animaux d'élevage conduit à un doublement des taux d'ALA dans le sérum de sujets ayant consommés les produits issus de ces animaux (Ward and Singh 2005; Weill et al. 2002; Philippe Legrand, Schmitt, et al. 2010). Cela est particulièrement utile dans des pays comme l'Australie où la consommation de poisson est faible, ainsi la majorité de leur apport en DHA provient des œufs enrichis en DHA (50-150 mg de DHA par œuf enrichis contre 4 mg de DHA dans un œuf « normal »), ainsi que de la viande de bœuf, qui contient majoritairement des AGS à cause de l'hydrogénation ruminale des acides gras, mais contribuent à 22,3% de l'apport en AGPI-LC chez l'adulte par rapport à la volaille (10%), à l'agneau (5,9%) et au porc (3,9%) (Howe et al. 2006; Davis and Kris-Etherton 2003). L'acide stéaridonique (C18:4 n-3) est peu présent dans l'alimentation occidentale, et sa supplémentation augmente le statut en EPA 4 fois plus que la même supplémentation en ALA (Walker, Jebb, and Calder 2013; Harris 2012; Kawabata et al. 2013).

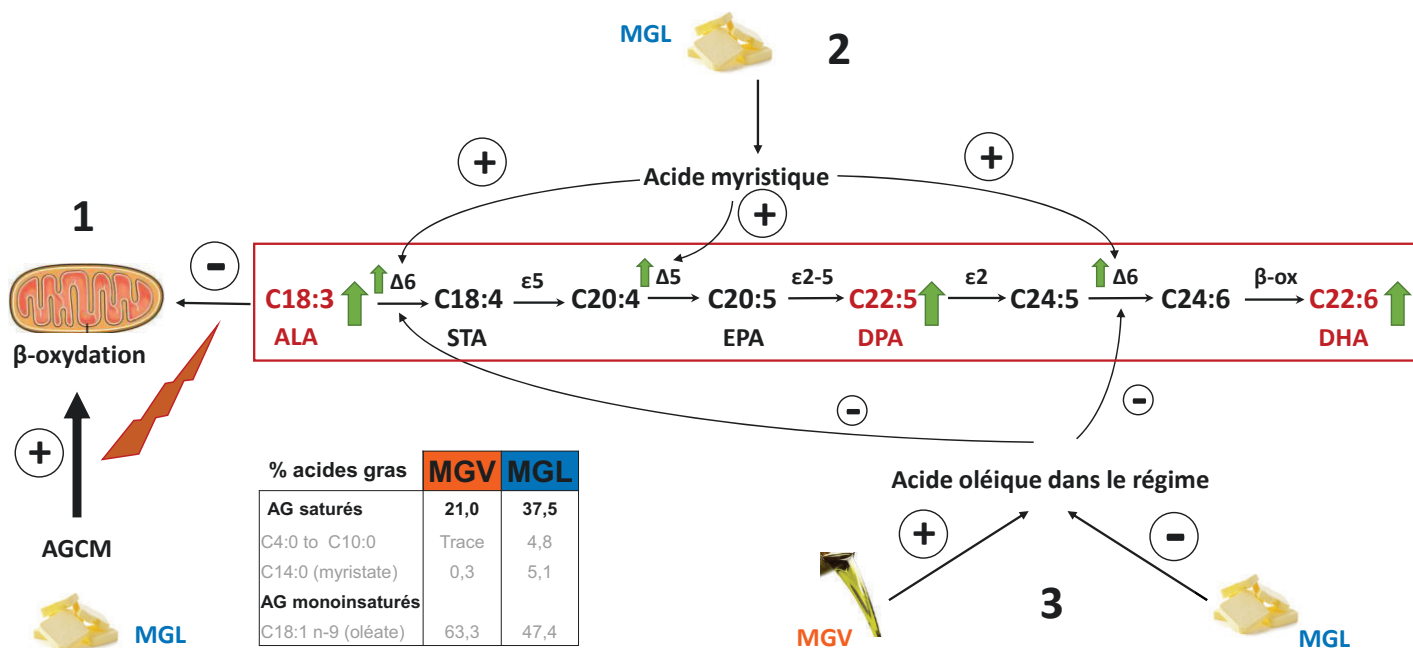


Figure 30. Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la voie de conversion des AGPI n-3 avec la matière grasse laitière.

AGCM : acides gras à chaînes courtes et moyennes, MGL ; matière grasse laitière, MGV : matière grasse végétale.

3.1.5.2 Induire la conversion à partir du précurseur

Alors que la voie de conversion des AGPI n-3 est insuffisante chez l'homme adulte comme chez le jeune enfant pour satisfaire au besoin en AGPI-LC-n-3, un grand nombre d'étude a chercher sans succès à augmenter la conversion de l'ALA jusqu'au DHA. Certaines études ont montré dans différentes conditions nutritionnelle et physiologique que l'incorporation partielle de matière grasse laitière (MGL) dans le régime augmente le statut tissulaire en AGPI-LC n-3, et parfois au même niveau que des groupes contrôle directement supplémentés en DHA (Gianni et al. 2018; Du et al. 2012; Bernadette Delplanque et al. 2011; Diné et al. 2016; Ezanno et al. 2015; Priego et al. 2013), alors que d'autres études n'ont pas retrouvé d'effet sur le statut en DHA suite à l'addition de MGL dans le régime (Aidoud et al. 2018). Ces études s'insèrent souvent dans un contexte de nutrition infantile, période pendant laquelle l'accrétion du DHA dans les tissus est maximale, et comparent souvent la MGL à un contrôle dont le régime est composé d'un mélange de matières grasses végétales (MGV), enrichis ou non directement en DHA et/ou en ARA. La MGL pourrait induire la voie de conversion selon plusieurs mécanismes associés aux différences d'acides gras entrant dans sa composition, par rapport aux MGV (**Figure 30**). En effet, il a été rapporté que la substitution de l'huile d'olive par de la MGL contenant des AGCM augmente la concentration d'ALA dans le tissu adipeux, le plasma et le foie, la concentration d'EPA dans le tissu adipeux et les globules rouges, ainsi que la concentration en DPA dans le foie, le cœur et la rétine chez le rat (Philippe Legrand, Beauchamp, et al. 2010; Priego et al. 2013). Ces résultats suggèrent que les AGCM préserveraient l'ALA de la β -oxydation mitochondriale et permettraient ainsi une meilleure conversion de l'ALA jusqu'au DHA (Ezanno et al. 2015). La MGL contient aussi de l'acide myristique pouvant augmenter l'activité des enzymes désaturases (voir 1.2.2). Enfin, les régimes à base de MGL peuvent contenir moins d'acide oléique que les régimes MGV. L'acide oléique est aussi un substrat de la Δ -6 désaturase, il pourrait donc y avoir moins de compétition pour la Δ -6 désaturase avec l'ALA chez des individus nourris avec un régime MGL.

La communication et l'éducation nutritionnelle est aussi primordiale pour engendrer une diminution de la consommation alimentaire d'AGPI n-6, aussi bien qu'une augmentation des AGPI n-3, et ainsi faire redescendre le ratio LA/ALA et permettre d'augmenter la bioconversion des AGPI-LC n-3 (Ian Givens and Gibbs 2008).

3.2 De la consommation alimentaire à l'incorporation dans les tissus

3.2.1 Biomarqueurs de la consommation alimentaire des acides gras

Chez l'Homme, l'évaluation de la consommation alimentaire des matières grasses par les méthodes traditionnelles comme les rappels de trois jours, les questionnaires de fréquence alimentaire et les suivis de consommation alimentaire est soumise à des erreurs liées à la très grande dispersion des matières grasses dans l'alimentation ainsi qu'à l'existence de graisses cachées, qui engendrent la possibilité de sous-déclaration, en particulier chez les individus en surpoids ou obèses qui ont tendance à sous-estimer volontairement ou non la part de graisses consommées (Johansson et al. 1998; Bingham et al. 2003; Arab and Akbar 2002). L'utilisation de biomarqueurs de la consommation de matières grasses pour estimer l'exposition nutritionnelle, en complément des mesures de consommation et de suivi, est donc particulièrement utile pour mieux appréhender l'implication des matières grasses dans certaines pathologies.

Les concentrations tissulaires en acides gras peuvent servir de biomarqueurs de la consommation alimentaire, bien qu'elles soient également le reflet de leur absorption, de leur métabolisme et de leur utilisation (Mains, Sulston, and Wood 1990). L'utilisation des statuts tissulaires en acides gras comme biomarqueurs de la consommation alimentaire s'applique particulièrement dans le cas des AGPI n-3. Tout d'abord car de nombreuses études ont montré que l'accumulation des AGPI n-3 augmente dans certains tissus, dont le tissu sanguin, en fonction de l'apport alimentaire en ALA, en EPA ou en DHA (Tu et al. 2013). Ensuite et surtout parce que ces acides gras sont indispensables et que la source alimentaire, et non la voie de biosynthèse, reste donc la principale source d'obtention de ces acides gras chez l'Homme (Bézar et al. 1994). Par exemple, les résultats issus de la cohorte EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) ont montré que les concentrations plasmatiques en AGPI-LC n-3 mesurées chez plus de 3000 sujets étaient fortement corrélées à la consommation de poisson ($r^2=0,78$) (Saadatian-elahi et al. 2009). Parmi les marqueurs tissulaires disponibles, les profils en acides gras du tissu adipeux sont des marqueurs de la consommation alimentaire à très long terme, à l'échelle d'une à plusieurs années chez l'Homme et de plusieurs semaines chez le rongeur (Katan et al. 1997; Hodson, Skeaff, and Fielding 2008). Dans le sang, les acides gras peuvent être mesurés dans différents compartiments correspondant aux différentes structures lipidiques de support et peuvent être des marqueurs de différentes durées de la

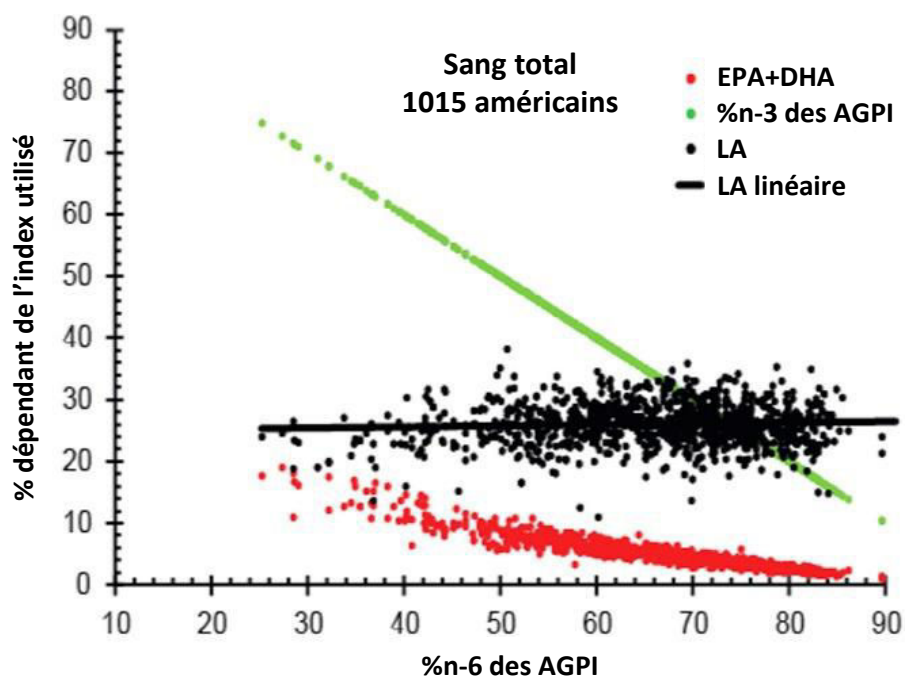


Figure 31. Comparaison des biomarqueurs des AGPI-LC n-3

Adapté de *Lands et al., 2016*.

Chaque point représente un individu. L'index Omega-3 (EPA+DHA, rouge) entraîne plus de variabilité interindividuelle que l'expression des taux d'AGPI n-3 en pourcentage des AGPI totaux (vert), pour des individus ayant le même taux de LA sanguin.

consommation alimentaire en fonction de la demi-vie des composants des compartiments sanguins. En effet, chaque compartiment sanguin est caractérisé par un profil spécifique en acides gras, notamment en AGPI (Boberg et al. 1985).

Chez l'Homme, la mesure des acides gras dans le compartiment sanguin total englobe l'ensemble des fractions : globules rouges (GR), plasma, plaquettes et cellules mononuclées issues du sang total PBMC. La composition du sang total reflète donc la consommation alimentaire à moyen terme de quelques jours. La durée de vie d'un GR est de 120 jours, la composition en acides gras de la membrane des GR est donc un marqueur de la consommation des graisses alimentaires des derniers 2 mois environ chez l'Homme, et des 30 derniers jours chez le rat pour lequel le renouvellement des GR est de 60 jours. La composition des plaquettes sont des marqueurs à court terme (1 semaine), de même que certaines espèces du plasma comme les PL, en particulier les PE et les PC, ainsi que dans les esters de cholestérol. La fraction libre du sérum ou les triglycérides circulants sont quant à eux des marqueurs à très court terme de la consommation alimentaire, reflétant les quelques dernières heures (Katan et al. 1997; Mains, Sulston, and Wood 1990).

Plusieurs marqueurs chez l'homme sont utilisés couramment pour les Oméga-3. Ainsi chez l'Homme, « l'index Oméga-3 » correspond à la somme EPA+DHA des globules rouges et est inversement associé au risque de maladies cardiovasculaires quand il est supérieur à 8% des acides gras totaux et positivement corrélé quand il est inférieur à 4 (Harris and Von Schacky 2004; Stark, Van Elswyk, et al. 2016). Même si cet intervalle demande encore confirmation selon ces mêmes auteurs, il a été confirmé et ajusté par l'analyse de 10 études de cohorte chez l'Homme pour des valeurs < à 4% et > à 8-12% (Harris, Del Gobbo, and Tintle 2017). Ils existent de nombreux autres rapports et index qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, et d'autres qui continuent à être définis. Encore aujourd'hui, rien que les unités de représentation des AGPI dans le compartiment sanguin restent sujettes à débat. Certains auteurs prônent d'utiliser les proportions d'AGPI en pourcentage des seuls AGPI totaux et non pas en pourcentage des acides gras totaux. Ceci donnerait un meilleur indice de l'évaluation des eicosanoïdes formés, à cause de la compétition entre les AGPI n-3 et n-6 pour la PLA2 (Bibus and Lands 2015; Stark, Aristizabal Henao, et al. 2016). L'utilisation de ce ratio AGPI n-3 / AGPI total permettrait aussi de réduire la variabilité interindividuelle observée avec l'index Oméga-3 (**Figure 31**). Longtemps utilisé, le ratio AGPI n-6 / AGPI n-3 est de plus en plus critiqué, en faveur de l'index Oméga-3 (Harris 2018).

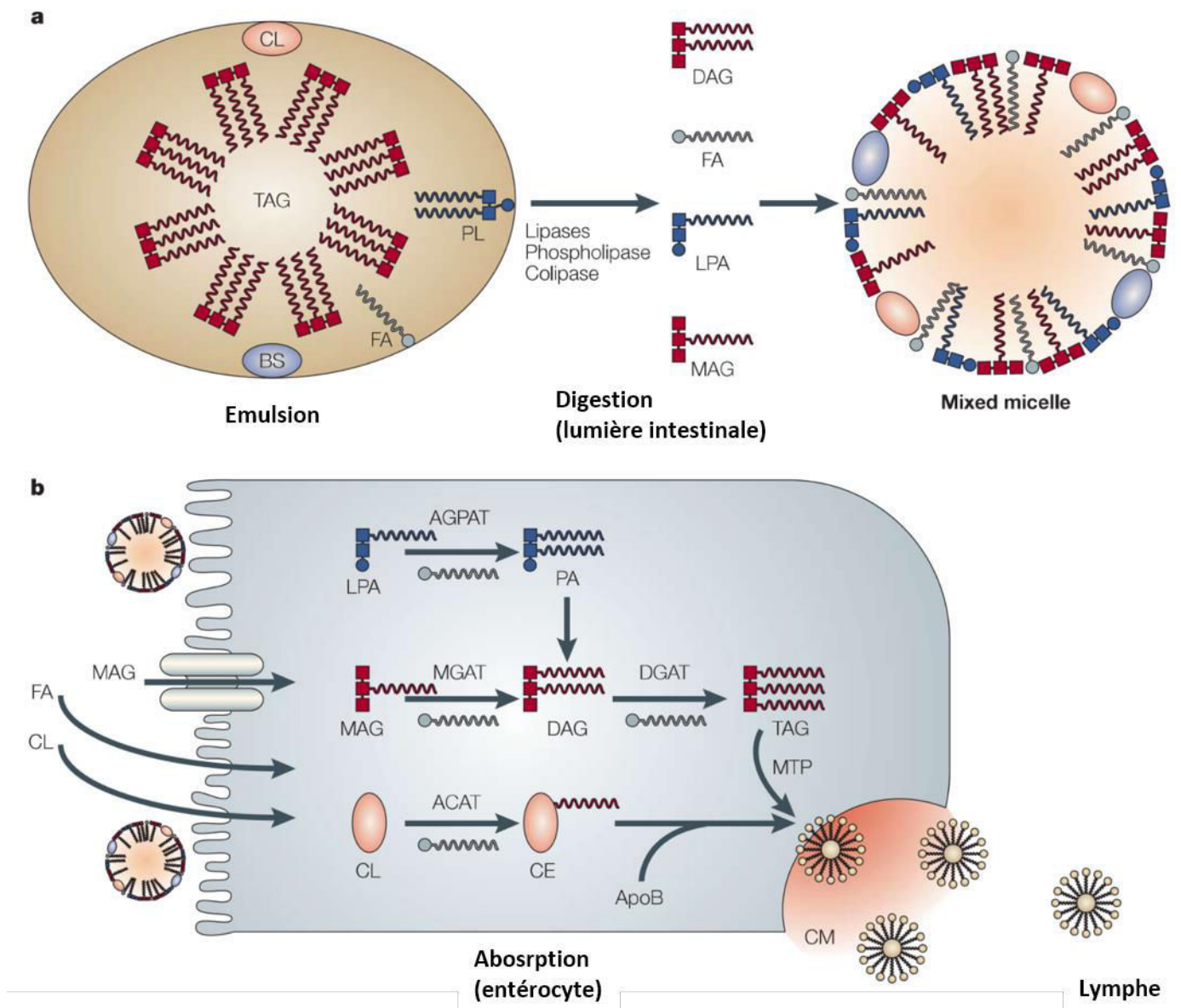


Figure 32. Processus de digestion et d'absorption des lipides alimentaires

Adapté de *Shi et al., 2004*.

a/ La digestion alimentaire des lipides débute dans l'estomac où les lipides sont partiellement hydrolysés par la lipase gastrique et forment des globules gras constitués d'un cœur hydrophobe de triglycérides (**TAG**) entouré de molécules polaires : phospholipides (**PL**), cholestérol (**CL**), et d'acides gras (**FA**). La digestion se poursuit dans la lumière intestinale où les globules gras sont mélangés aux sels biliaires (**BS**) et au jus pancréatique contenant les enzymes digestives, formant une suspension aqueuse de petites gouttelettes lipidiques dont la structure permet d'optimiser l'exposition des lipides aux lipases pancréatiques pour l'hydrolyse. Les monoacylglycérols (**MAG**), diacylglycérols (**DAG**) et acides gras libres (**FA**) libérés par hydrolyse des lipides s'associent aux **BS**, **CL**, acide lysophosphatidique et vitamines hydrosolubles pour former des micelles mixtes. Les micelles mixtes transportent les produits issus de la digestion vers la bordure en brosse des entérocytes pour l'absorption.

b/ Les **FA** et **MAG** entrent dans les entérocytes par diffusion passive, facilitée par certains transporteurs. Ils sont ensuite ré-estérifiés dans le réticulum endoplasmique entérocytaire par des acyltransférases (**MGAT**, **DGAT**) pour reformer des **TAG**. Les **PL** provenant du régime et de la bile (**LPA** principalement) sont acylés en acide phosphatidique (**PA**) qui est converti en **TAG**, et le **CL** est estérifié en esters de cholestérol (**CE**). Les **TAG** et les **CE** se couplent à l'apolipoprotéine B (**ApoB**) pour former des chylomicrons (**CM**), qui rejoignent la circulation générale par le réseau lymphatique.

ACAT : acyl-CoA : cholestérol transférase ; **ApoB** : Apolipoprotéine B ; **AGPAT** : 1-acyl-glycerol-3-phosphate-acyltransférase ; **DGAT** : DAG acyltransférase ; **FA** : acides gras ; **LPA** : acide lysophosphatidique; **MGAT** : MAG acyltransférase ; **MTP** : microsomal triglyceride transfer protein;

Les produits laitiers représentent un des groupes majeurs de la consommation alimentaire humaine qui sont souvent sous-estimés dans les suivis de consommation auto-déclarés (B. Jenkins, West, and Koulman 2015). Les concentrations tissulaires d'acides gras à chaîne impaire, dont certains sont présents quasi-exclusivement dans les produits laitiers, constituent donc de bons biomarqueurs de la consommation alimentaires des lipides laitiers (Albani et al. 2016; AFFSA 2011). Le C15:0 contenu dans le tissu adipeux est le biomarqueur le plus spécifique et fiable qui reflète la consommation de produits laitiers. Il a aussi été mis en évidence que le C15:0 circulant, et dans une moindre mesure le C17:0 circulant reflétaient les habitudes alimentaires ainsi que les changements de consommation de produits laitiers (Risérus and Marklund 2017). Les acides gras à chaîne branchée sont aussi principalement retrouvés dans les produits laitiers et pourraient être des marqueurs de leur consommation alimentaire (Ran-Ressler et al. 2011).

3.2.2 Biodisponibilité et digestibilité des acides gras

La biodisponibilité des acides gras correspond à la part d'ingestion de l'acide gras assimilée par l'organisme et retrouvée dans la circulation sanguine ou dans un tissu sous sa forme d'origine, ou sous une forme transformée. En nutrition, et encore plus dans le domaine des lipides qui sont des nutriments fortement absorbés, la biodisponibilité est souvent associée par abus de langage à la digestibilité, qui correspond à l'activité d'hydrolyse des lipides alimentaire dans le tractus digestif puis à l'absorption des acides gras principalement par l'intestin. La digestibilité des AGPI est de 75 à 95% en fonction de la dose, de la source, et de la matrice alimentaire dans lequel les AGPI sont inclus (Ghasemifard et al. 2015). Pour une même dose, la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 selon leur forme d'apport pourrait se classer ainsi : AGL \approx PL (huile de krill) > TG ré-estérifiés > TG > ester éthyliques d'acides gras (EE) (Schuchardt and Hahn 2013). Selon leurs formules galéniques, les émulsions sont plus assimilées que les huiles sous forme de TG (Garaiova et al. 2007), et les huiles micro-encapsulées plus que les huiles brutes (A. Wakil et al. 2010). Il est aussi souvent conseillé d'ingérer les capsules d'AGPI-LC n-3 sous forme d'EE ou d'AGL pendant le repas car les AGPI-LC n-3 seraient mieux digérés quand l'estomac n'est pas vide, sûrement à cause de la stimulation des lipases pancréatiques par l'ingestion de graisses alimentaires (Davidson et al. 2012). Néanmoins très peu d'études existent sur les comparaisons des matrices alimentaires au sein desquelles les AGPI-LC n-3 sont ingérés et les résultats sont encore contradictoires (Schuchardt and Hahn 2013).

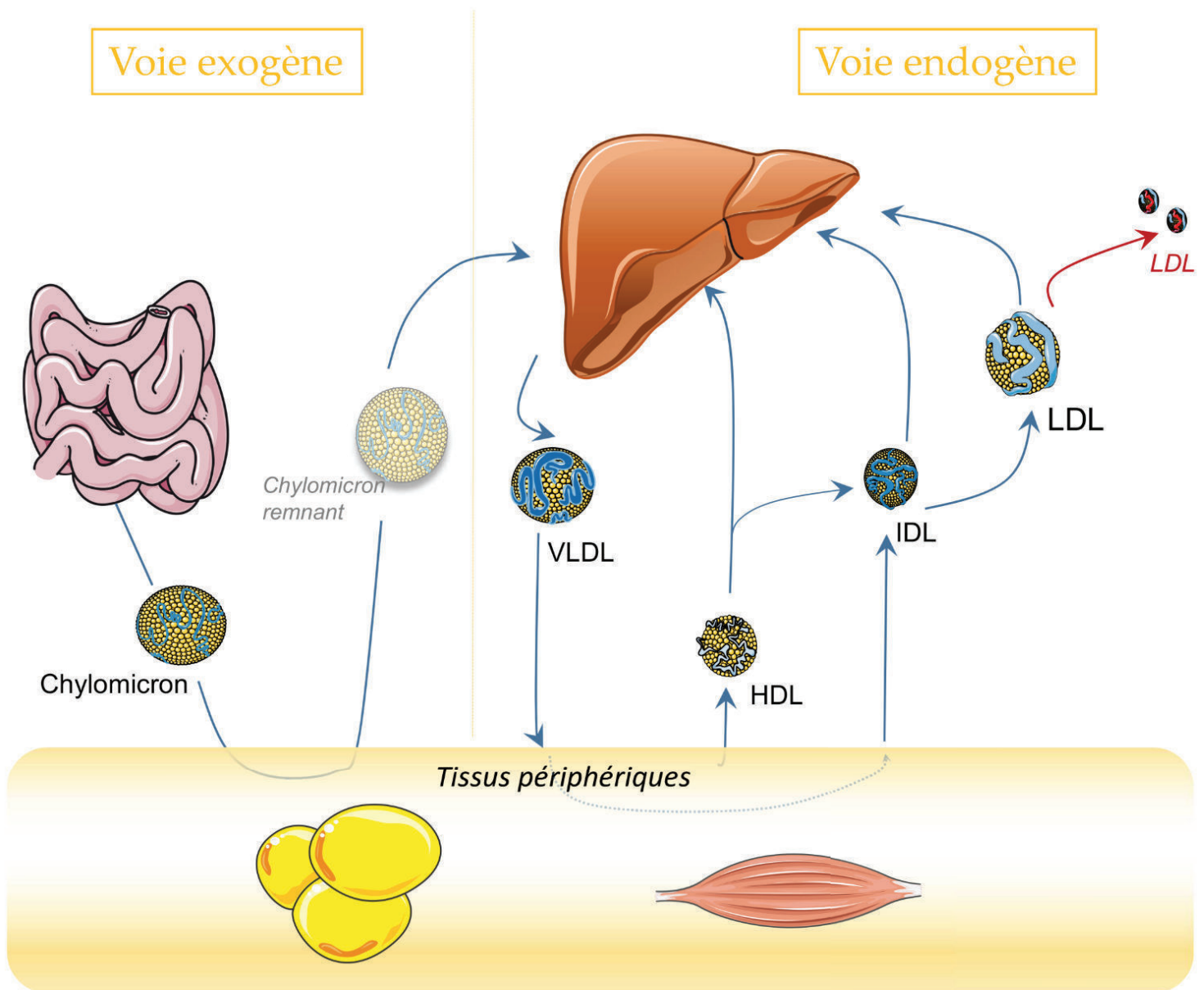


Figure 33. Transport des acides gras dans l'organisme

Les acides gras sont transportés dans l'organisme par des lipoprotéines par la circulation sanguine. La voie exogène correspond au transport des acides gras alimentaires jusqu'aux tissus périphériques par les chylomicrons puis jusqu'au foie par les chylomicrons remnants. La voie endogène correspond à la redistribution des acides gras dans l'organisme.

VLDL : Very low density protein ; **HDL** : High density protein ; **IDL** : Intermediate density lipoprotein ; **LDL** low density protein

Les lipides alimentaires sont composés à plus de 90% de TG, mais sont aussi composés d'environ 4,5% de PL et de 0,5% d'EC. Les TG sont composés d'une molécule de glycérol et de trois esters d'acides gras situés en position sn-1 à sn-3. Les PL ont une structure comparable à celle des TG dans laquelle la position sn-3 est remplacée par un groupement phosphate, lui-même lié à un alcool aminé ou non (choline, éthanolamine, inositol, glycérol) (Guesnet et al. 2005). Les acides gras saturés sont positionnés principalement sur les positions sn-1 et sn-3 des TG alors que les AGPI sont prédominants sur les positions sn-2 des PL.

Dans un premier temps, les AGPI provenant de l'alimentation sont absorbés dans l'intestin puis véhiculés par la lymphe puis par le sang jusqu'aux tissus utilisateurs (foie, cœur, muscle, tissus adipeux, cerveau...) : on parle de voie exogène. La digestion des acides gras est initiée dans l'estomac, où les TG sont partiellement hydrolysés en sn-1,2diacylglycerol et en acides gras libres par les lipases linguale et pancréatique (Carrière et al. 1993) (**Figure 32**). Les AGPI se retrouvent dans l'intestin sous forme de micelles mixtes contenant des acides gras, des monoglycérides et des lysophospholipides. Au niveau des entérocytes, les acides gras sont absorbés grâce à des protéines spécifiques de transport qui les acheminent dans le réticulum endoplasmique lisse. Différentes protéines telles que les Fatty Acid Transporter protein (FATP) ou les Fatty Acid Transporter CD36 (FAT/CD36) seraient impliquées dans le transport des acides gras (Stahl 2004; Mansbach and Gorelick 2007). L'entrée des monoglycérides se fait par diffusion passive dans le réticulum lisse. Le cholestérol exogène peut également être absorbé grâce à une protéine spécifique de transport, Niemann-Pick C1 Like 1 protein. Les acides gras sont ensuite ré-estérifiés par les enzymes du réticulum endoplasmique dont la protéine mitochondriale trifonctionnelle (mitochondrial trifunctional protein), associés sous forme de chylomicrons puis véhiculés *via* les circuits lymphatiques puis le circuit sanguin jusqu'aux tissus utilisateurs. Les chylomicrons résiduels, ou remnants, alors déchargés d'une grande partie de leurs lipides, sont capturés par le foie. Le relargage du DHA est moins rapide que celui de l'ARA, néanmoins son relargage est juste retardé et ne diminue pas en comparaison à celui de l'ARA (Bézar et al. 1994).

D'autre part, les acides gras sont métabolisés ou synthétisés par le foie et redistribués dans l'ensemble de l'organisme constituant ainsi la voie endogène (**Figure 33**). Cette voie concerne les différents acides gras néoformés ou modifiés dans le foie ainsi que le cholestérol. Deux circuits existent : le circuit hépatofuge assurant le transport des TG et du cholestérol vers les tissus extra-hépatiques et le circuit hépatopète ramenant seulement le cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie. Enfin, les acides gras synthétisés ou stockés par le tissu

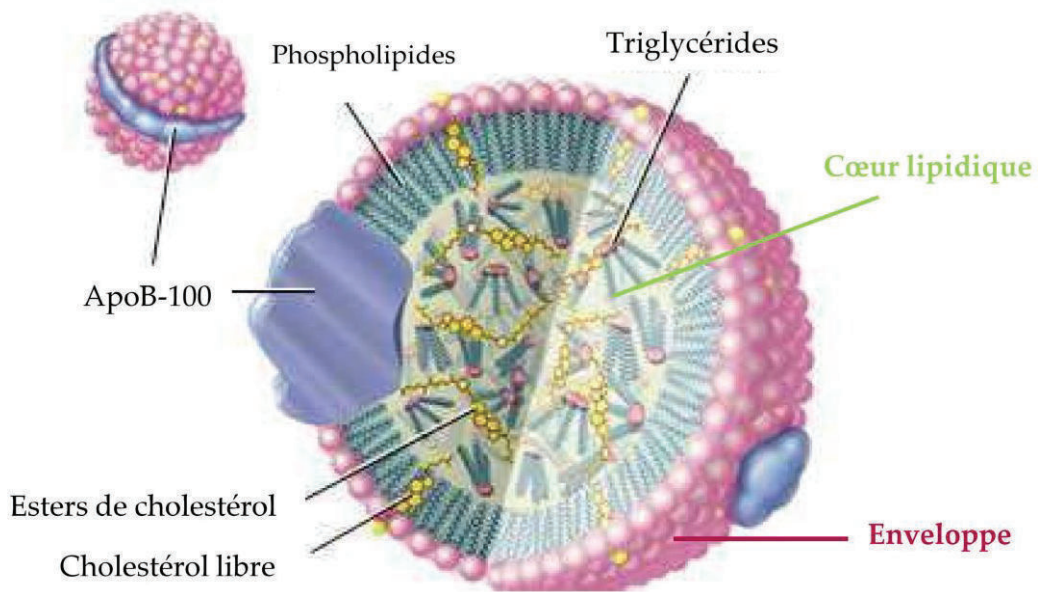


Figure 34. Structure générale d'une lipoprotéine

D'après *Salvayre, 2002*.

Exemple d'une lipoprotéine LDL (low density protéine) riche en cholestérol et en triglycérides apoB-100 : apolipoprotéine B-100

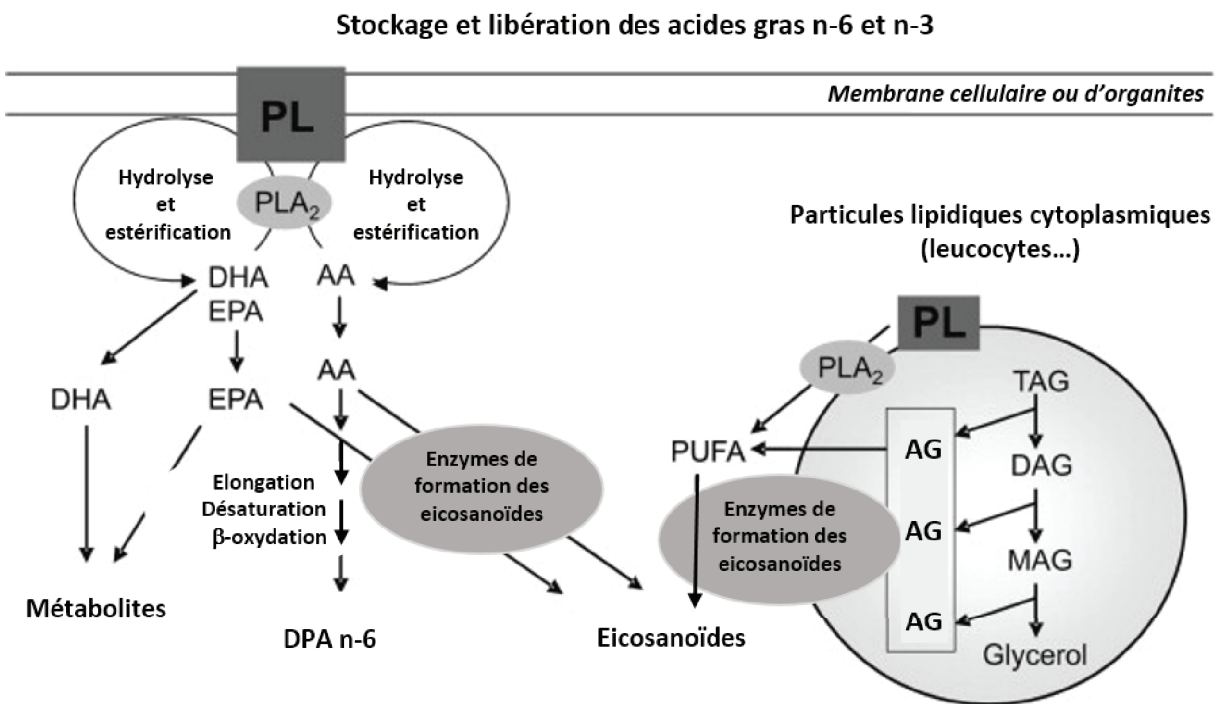


Figure 35. Stockage et relargage tissulaire des AGPI

D'après *Schmitz, 2002*.

adipeux peuvent être transportés dans le sang cette fois en liaison à l'albumine et distribués au muscle ou ramenés au foie

Qu'ils soient néoformés au niveau du foie ou d'origine digestive, les acides gras sont véhiculés dans la circulation sanguine sous la forme de lipoprotéines ou portés par l'albumine. Les lipoprotéines sont des structures globulaires composées d'un cœur hydrophobe contenant essentiellement des TG et des EC enveloppés d'une monocouche de lipides plus polaires contenant des PL, du cholestérol libre et des protéines spécifiques (**Figure 34**). Ces protéines spécifiques nommées apoprotéines, présentes à la surface des lipoprotéines, assurent la stabilité de cette macromolécule et en contrôlent son devenir métabolique. Initialement isolées en fonction de leur densité, chaque lipoprotéine se caractérise à la fois par la proportion des différents lipides qui la compose et par les apoprotéines de surface. On distingue ainsi :

- Les chylomicrons synthétisés par les entérocytes, riches en lipides d'origine exogène.
- Les VLDL (very low density lipoproteins) synthétisées dans le foie, riches en lipides (principalement TG) d'origine endogène.
- Les LDL (low density lipoproteins) obtenues dans le sang à partir des VLDL (après passage par le stade intermédiaire d'IDL (intermediate density lipoprotein)). Les LDL transportent le cholestérol vers les tissus périphériques.
- Les HDL (high density lipoproteins) ramenant le cholestérol vers le foie.

Les TG sont donc transportés principalement par les chylomicrons et les VLDL tandis que le cholestérol et les PL sont transportés majoritairement par les LDL et HDL. À l'état postprandial, les acides gras sont véhiculés dans le sang par les chylomicrons. On les retrouve aussi sous forme de lipoprotéines issues du foie. À l'inverse, en période de jeûne, les acides gras du sang proviennent essentiellement du tissu adipeux (TA) par un mécanisme de lipolyse des TG de stockage (Phillips 2013).

Au niveau des tissus, les acides gras qui sont intégrés dans les phospholipides des membranes cellulaires et dans les lipoprotéines vont pouvoir subir l'action de la phospholipase A2 et être libéré sous forme d'acides gras libres dans le cytosol au sein duquel ils pourront entrer dans la voie énergétique, être transformés en métabolite oxygénés par l'action des enzymes COX et LOX ou agir en tant que facteur de transcription de certains gènes (Schmitz and Ecker 2008) (**Figure 35**).

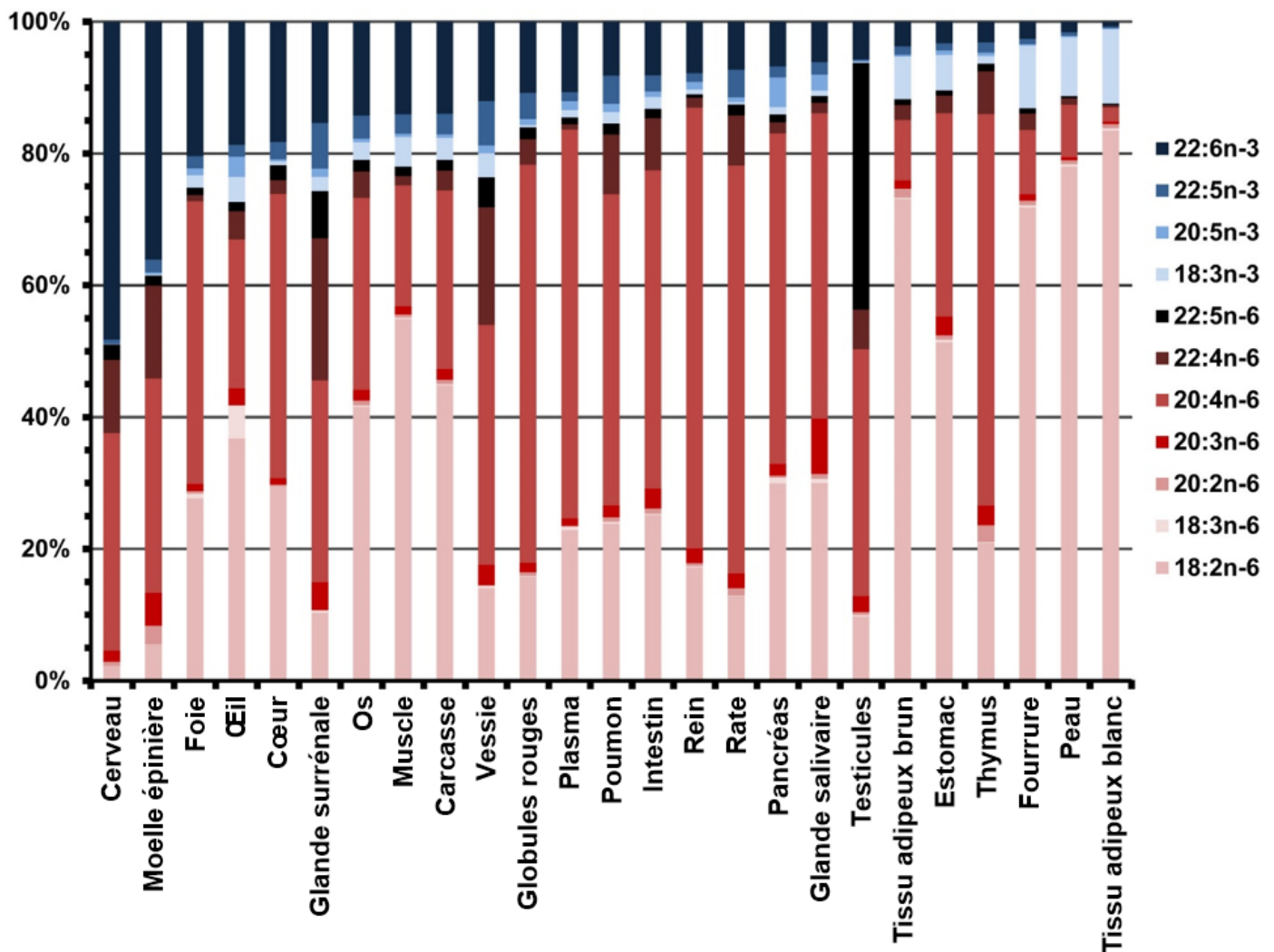


Figure 36. Distribution tissulaire des AGPI n-3 et n-6 dans 25 compartiments

D'après Salem et al., 2015.

Pourcentage massique des AGPI n-3 et n-6 dans chaque compartiment issu de rat (n=9). Les compartiments sont classés en fonction du taux de DHA de la gauche vers la droite. Les AGPI n-3 sont en nuances de bleus et les AGPI n-6 sont en nuances de rouges.

3.2.3 Distribution tissulaire des AGPI

Les acides gras les plus abondants dans le plasma sont pour les AGS l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), pour les AGM l'acide oléique (C18:1 n-9) et pour les AGPI n-6 le précurseur LA (C18:2 n-6) et l'ARA (C20 :4 n-6). Les AGPI n-3 les plus abondants dans le régime alimentaire, mais aussi dans le plasma et dans la plupart des tissus, sont le précurseur ALA (C18:3 n-3), et les trois dérivés à longue-chaîne EPA (C20:5 n-3), DPA (C22 :5 n-3) et DHA (C22:6 n-3). Le DHA est en outre l'AGPI dont la concentration est la plus variable en fonction des organes (Browning et al. 2012). Alors que de minimes quantités d'ALA, de DPA et d'EPA sont présentes dans la plupart des tissus, les quantités de DHA représentent en moyenne 5 à 30 fois celles de l'EPA dans la plupart des tissus, et 100 fois celles de l'EPA dans le cerveau, la moelle épinière et la rétine (**Figure 36**).

Dans le tissu adipeux, constitué principalement d'acides gras stockés sous la forme de TG, l'AGPI le plus abondant est le LA (C18 :2 n-6). Les quantités d'EPA et de DHA sont très faibles dans le tissu adipeux et sont très bien corrélées à l'apport alimentaire, ce qui confirme que les AGPI n-3 à longue chaîne sont très peu stockés et doivent être apportés par l'alimentation (Arterburn, Hall, and Oken 2006). Le tissu adipeux est aussi le principal tissu de stockage de l'ALA. L'ARA est l'AGPI-LC n-6 le plus abondant dans la plupart des tissus, mais sa distribution tissulaire est différente de celle du DHA qui est principalement riche dans les tissus d'origine nerveuse.

3.2.4 Le cerveau : un tissu riche en AGPI dont le niveau est fortement régulé

3.2.4.1 *Composition cérébrale en AGPI*

Les lipides membranaires constituent 50 à 60 % de la masse solide du cerveau et sont majoritairement sous la forme de PL (Brien and Sampson 1965). La majeure proportion de ces PL cérébraux est constituée d'AGP-LC, d'AGPI n-6, principalement l'AA, et d'AGPI n-3, principalement le DHA. Les AGPI constituent environ 50 % de la membrane neuronale et 70 % de la gaine de myéline (Hooijmans and Kiliaan 2008). Le DHA est l'AGPI prédominant dans le cortex cérébral et la rétine. Le cerveau et les rétines sont les deux tissus les plus riches en DHA: jusqu'à 60% de tous les acides gras estérifiés dans les PL de la membrane neuronale sont constitués de DHA (Guesnet and Alessandri 2011).

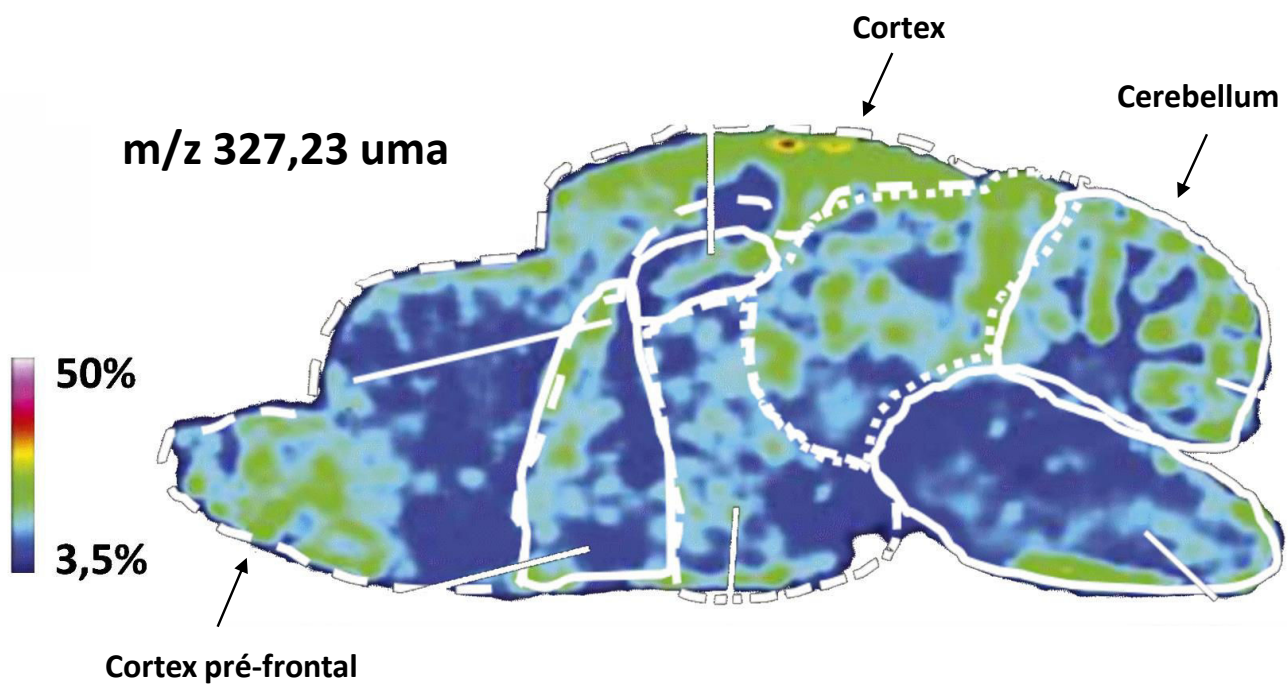


Figure 37. Distribution cérébrale du DHA

Adapté de *Aidoud et al., 2018*.

La distribution des régions riches en DHA (bleu < vert < jaune < rouge) a été déterminée par imagerie par spectrométrie de masse. Le % de DHA représente le pourcentage de DHA dans les régions sélectionnées après normalisation du DHA dans chaque zone de la section sagittale à 100. Le cortex pré-frontal, le cortex et le cervelet sont les régions cérébrales les plus riches en DHA.

Au sein du pool d'acides gras, la proportion de DHA dans le cerveau et la rétine est environ 10 fois supérieure à celle du DHA plasmatique. L'incorporation d'AGPI dans la membrane de la cellule nerveuse du cerveau et de la rétine est une étape majeure de la maturation fonctionnelle du système nerveux central au cours du développement périnatal (W. Lukiw and Bazan 2008). L'incorporation préférentielle du DHA dans le système nerveux central, par rapport aux autres tissus, est constante au cours de l'évolution des espèces (J.-M. Alessandri et al. 2004).

La distribution du DHA au sein du cerveau diffère aussi bien au niveau des espèces portant le DHA qu'au niveau des régions cérébrales. Les proportions très élevées de DHA dans les PE et les PC principalement mais aussi dans les plasmalogènes et les phosphatidylsérines cérébraux, atteignent 35% des acides gras dans la membrane synaptique et représente une caractéristique du cerveau de mammifère, quelle que soit la concentration de DHA dans le plasma ou le foie (S. Innis 2007; Taha et al. 2013). La distribution cérébrale du DHA n'est pas homogène (**Figure 37**). Le taux de DHA du cortex frontal est supérieur à toutes les autres régions cérébrales, qu'il soit mesuré par extraction des phospholipides des différentes régions du cerveau chez la souris (Hedley and McGhee 2004) ou mesurée par imagerie MS (Aidoud et al. 2018). Le cortex et le cerebellum sont aussi des régions riches en DHA (Aidoud et al. 2018). La diminution du taux de DHA dans ces régions cérébrales est compensée par une augmentation du DPA n-6 (Dyall 2015; García-Calatayud et al. 2005; Garcia et al. 2002).

3.2.4.2 *Transport du DHA jusqu'au tissu cérébral*

Le niveau cérébral des acides gras dépend de l'équilibre entre (i) l'incorporation des acides gras provenant de la circulation sanguine et ayant traversés la barrière hématoencéphalique (BHE), (ii) la conversion cérébrale des AGPI à partir des précurseurs, (iii) le stockage et de l'incorporation des acides gras dans les PL membranaires, (iv) le relargage des acides gras du cerveau dans la circulation sanguine, (v) et l'utilisation des acides gras au sein de cerveau pour l'énergie ou la synthèse de métabolites oxygénés. Bien que les études *in vitro* suggèrent que le DHA peut être synthétisé dans le cerveau par les cellules gliales et endothéliales à partir des précurseurs, la majorité du DHA cérébral provient probablement du plasma (Salem et al. 2001; Galli and Risé 2006). Ainsi, le maintien de l'équilibre du taux cérébral de DHA impliquerait surtout les mécanismes de transport associés aux AGPI. De plus, les concentrations plasmatiques en DHA sont faibles chez la plupart des mammifères, ce qui suggère qu'il existe des mécanismes permettant de concentrer le DHA dans le tissu cérébral. Cela renforce

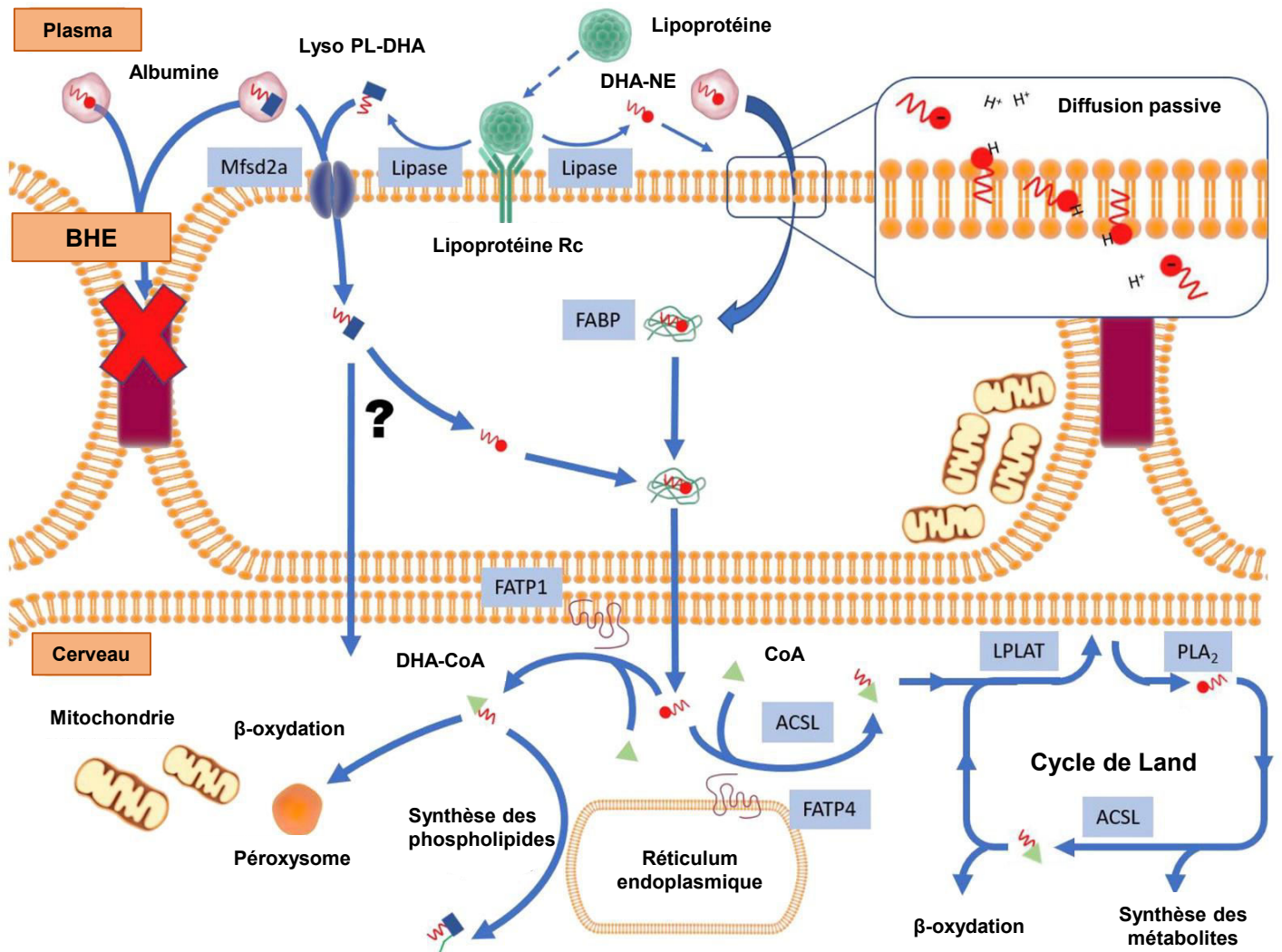


Figure 38. Incorporation du DHA dans le cerveau

Adapté de *Lacombe et al., 2018*.

La DHA-NE complexée à l'albumine dans le plasma peut diffuser passivement à travers la membrane plasmique luminale de la BHE. Afin de diffuser, le DHA-NE se dissocie de l'albumine plasmatique et s'intègre dans le feuillet exo-facial de la membrane plasmique luminale endothéliale. L'extrémité carboxylique chargée négativement est ensuite neutralisée, ce qui contribue à faciliter la « bascule » de DHA-NE vers la valve cytosolique où elle peut se répartir dans le cytosol (voir encadré). Le NE et le LysoPL-DHA peuvent être produits localement au niveau de l'endothélium cérébral par l'hydrolyse des lipoprotéines par l'action des lipases associées à la membrane. L'incorporation de LysoPL-DHA dans le cerveau peut être facilitée par l'activité de Mfsd2a. Une fois dans l'endothélium de la BHE, on ne sait pas si le DHA est clivé de la LysoPL ou s'il passe directement dans les cellules du parenchyme cérébral. Dans les cellules endothéliales, la DHA-NE est solubilisé et transporté à travers le cytosol en se liant à la FABP. La solubilisation par liaison à la FABP faciliterait la dissociation de la DHA-NE du feuillet cytosolique de la membrane plasmique endothéliale. L'activation de la DHA-NE par la FATP et l'ACSL forme du DHA-CoA qui abaisse le gradient de concentration pour le flux de DHA-NE dans le cerveau. Après son activation, le DHA-CoA entre dans diverses voies métaboliques, dont les voies de synthèse des phospholipides et le recyclage *via* le cycle de Land. Grâce à l'activité contrôlée des enzymes LPLAT et PLA2, la majorité du DHA qui entre dans les phospholipides membranaires est recyclé.

Abréviations : ACSL, acyl-CoA synthétase à longue chaîne; BHE, barrière hématoencéphalique; CoA, coenzyme A; DHA, acide docosahexaénoïque; FABP, protéine de liaison aux acides gras; FATP, protéine de transport des acides gras; LPLAT, lysophospholipide acyltransférase; LysoPL, lysophospholipide; Mfsd2a, Major facilitator superfamily domain-containing protein 2; NE, non estérifié; PLA2, phospholipase A2; Rc, récepteur;.

l'importance de la conversion hépatique du précurseur ALA jusqu'au DHA, puis de la forme de transfert du DHA dans la circulation sanguine et enfin de l'accessibilité du DHA plasmatique au niveau de la membrane des cellules nerveuses (Lacombe, Chouinard-Watkins, and Bazinet 2018).

Les mécanismes de transfert des AGPI à travers la BHE ne sont pas encore bien élucidés (**Figure 38**) (Pan, Khalil, and Nicolazzo 2015; Freund Levi et al. 2014). Le flux d'AGPI traversant la BHE est plus important pour les AGPI liés à l'albumine que pour les AGPI circulants au sein des lipoprotéines (Hamilton and Brunaldi 2007). La concentration plasmatique d'acide gras liés à l'albumine est régulé par le ratio acides gras libres / acides gras liés à l'albumine, mais l'effet de cette régulation est négligeable dans des conditions physiologiques (Edmond et al. 1998). Les AGPI vont être transporté à travers la BHE par diffusion passive principalement, mais aussi par un transport facilité par différentes protéines transmembranaires comme la FAT/CD36 et FATP (R. W. Mitchell and Hatch 2011). Dans les cerveau de rats et de souris adultes, la FATP est abondamment exprimée, alors que les ARNm de la FAT/CD3 n'ont pas été détectés (Utsunomiya et al. 1997). De plus, plusieurs études montrent que le DHA porté sur les lysophosphatidylcholines (LPC) pourraient traverser la BHE plus efficacement que le DHA libre ou complexé aux lipoprotéines (Lagarde et al. 2001; Subbaiah et al. 2016; Lacombe, Chouinard-Watkins, and Bazinet 2018). L'apport de DHA alimentaire directement sous la forme de LPC permettrait d'enrichir le cerveau en DHA d'un facteur 2 et d'améliorer la mémoire de souris adultes, ce qui n'est pas le cas d'une supplémentation en DHA sous forme d'acide gras libre (Sugasini et al. 2017). Néanmoins ces résultats restent controversés, et d'autres études montrent que c'est la forme non estérifiée du DHA (DHA-NE) qui permettrait d'augmenter au mieux le statut cérébral en DHA. Ainsi, les résultats retrouvés pour la LPC-DHA pourraient être associés à la demi-vie et à l'exposition dans le cerveau plus importante des LPC-DHA par rapport au DHA-NE (C. T. Chen et al. 2015; Rapoport 2013).

L'incorporation du DHA (et des AGPI) dans les membranes et les structures cérébrales demande une thioestérification d'acides gras, catalysée par l'acyl-CoA-synthétase (ACSL) et nécessitant du CoA pour former de l'acyl-CoA. Le transfert du groupement acyle de l'acyl-CoA à un accepteur de lysophospholipides conduit à la synthèse des PL. Cette réaction est catalysée par l'acyl-CoA lysophospholipide acyltransférase (LPLAT) (**Figure 38**). Il a été montré que plusieurs LPLAT se trouvent dans le tissu cérébral. Elles jouent un rôle important dans la réalisation des espèces moléculaires appropriées de PL dans les membranes neurales. Le DHA

et l'ARA entrent en compétition pour l'incorporation dans les glycérophospholipides des membranes neuronales ; des niveaux accrus de DHA / EPA dans les neurones entraînant une diminution du taux d'ARA dans les PL et une réduction de la synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'ARA. L'incorporation de DHA marqué diffère de celle de l'ARA, il est incorporé en plus grandes proportions dans les phosphatidyléthanolamines que l'ARA. Une division supplémentaire des glycérophospholipides d'éthanolamine en types diacyl, alkylacyl et alcénylacyl indique que l'incorporation élevée de DHA radioactif dans les phosphatidyléthanolamine est principalement due à son incorporation rapide dans les diacyl- et alkylacyl-glycérophospholipides (Lacombe, Chouinard-Watkins, and Bazinet 2018).

3.2.4.3 Turn-over et provenance des AGPI cérébraux

Plusieurs études se sont intéressées à l'incorporation du DHA dans les PL des rétines (Stinson, Wiegand, and Anderson 1991) et du cerveau de rats (DeMar et al. 2004), en utilisant des animaux carencés en DHA ou ayant un statut adéquat en DHA et en utilisant du DHA radiomarqué (Igarashi et al. 2007, 2013). Dans le cerveau de rat, la demi-vie du DHA intégré dans les PL est de 33 jours environ et varie de 23 à 58 jours en fonction de l'espèce de PL dans laquelle le DHA est intégré et en fonction du statut en DHA du cerveau des animaux. La demi-vie du DHA est de 23 jours dans les PC, de 32 jours dans les PE, de 24 jours dans les phosphatidylinositols et de 58 jours dans les phosphatidylsérines. De plus, la demi-vie du DHA cérébral est multipliée par 2 ou plus, laissant supposer que des mécanismes existent pour minimiser la perte de DHA cérébral (DeMar et al. 2004). Dans le cerveau de rat carencés en AGPI n-3, le taux de récupération du statut cérébral en DHA n'est que partiel par rapport à des rats non carencés, même 8 semaines après la réinsertion de DHA dans le régime. Au contraire, les statuts plasmatique et hépatique de rats carencés en n-3 retrouvent leur niveau d'origine 2 semaines après la réinsertion de DHA dans le régime (Moriguchi et al. 2004). Cela laisse entendre que des mécanismes de transports spécifiques pourraient limiter le taux de recouvrement du DHA du système nerveux. La mise en place de ces mécanismes seraient entre autres associée au taux d'AGPI n-6 et principalement de DPA n-6 cérébral (Ikemoto et al. 2001; Farooqui 2009). Dans les rétines, la demi-vie du DHA intégré dans les PL est de 19 jours (Stinson, Wiegand, and Anderson 1991), et la réversion du statut en DHA des rétines de rats initialement carencés en AGPI n-3 est plus rapide et plus important que celle du cerveau (Moriguchi et al. 2004; Farooqui 2009).

Il est donc tentant de spéculer que la composition des graisses alimentaires peut influencer l'activité des enzymes impliquées dans la conversion hépatique des acides gras, leur acylation, leur transport, leur stockage et leur utilisation dans les tissus cérébraux. Une étude de marquage de l'ALA sur un modèle de rats nourris artificiellement avec de l'ALA marqué au deutérium (ALA-d5), supplémenté ou non en DHA, a montré que l'ajout de DHA dans le régime entraînait une diminution de la quantité de DHA biosynthétisée dans le foie et accumulée dans le foie et le cerveau. De plus, environ 40% du DHA cérébral nouvellement formé pendant l'expérimentation n'était pas marqué et ne provenait donc pas de l'ALA-d5 alimentaire, mais sûrement du relargage des précurseurs n-3 du DHA du tissu adipeux ou d'autres tissus. Ainsi, le stockage des précurseurs du DHA dans le tissu adipeux pourrait être une source significative de DHA cérébral pour des individus nourris avec de l'ALA comme seule source d'AGPI n-3 (Lefkowitz et al. 2005).

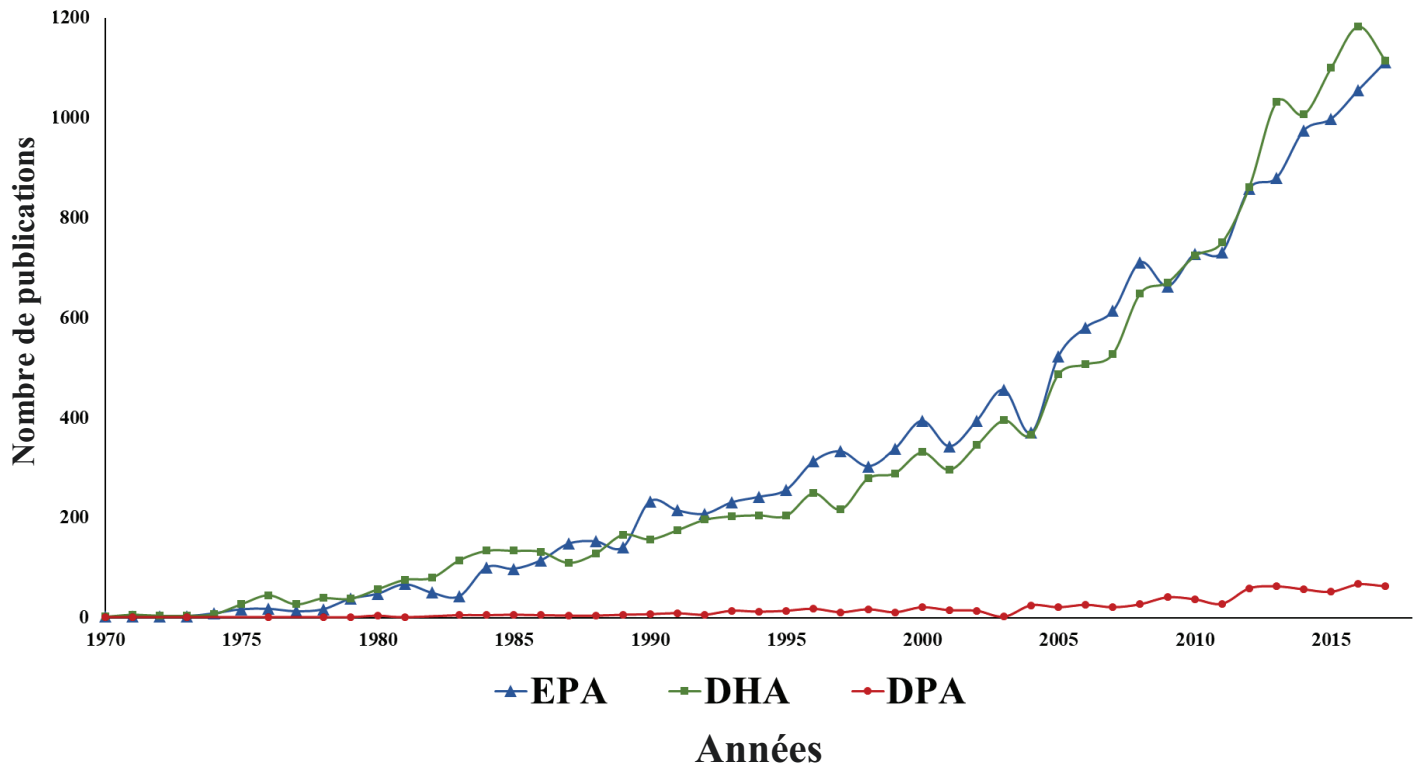


Figure 39. Evolution temporelle du nombre de publications associées à l'EPA, au DPA ou au DHA

Les courbes ont été créés à partir d'une recherche PubMed avec les mots clés EPA ou DHA et leurs dénominations associées en recherche dans les titres et dans les résumés. Pour le DPA, la recherche a été réalisée en enlevant les termes « DPA n-6 » et les dénominations associées.

4 FOCUS SUR L'ACIDE DOCOSAPENTAÉNOÏQUE N-3 (DPA)

Une revue générale sur le DPA a été soumise au journal Biochimie après l'édition de la première version de ce manuscrit. Cette revue est présentée en **Annexe I** de ce manuscrit.

4.1 *Le DPA, un AGPI-LC peu étudié et peu disponible commercialement*

Le DPA a été très peu étudié par rapport à l'EPA et au DHA (**Figure 39**). Tout d'abord car parmi les AGPI-LC n-3 composant les huiles de poissons, l'EPA et le DHA en sont les composants majoritaires, et ensuite à cause de la faible disponibilité commerciale du DPA en quantité suffisante à haute pureté (>98%) et à un prix abordable (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015). Par exemple, les fournisseurs comme Sigma Aldrich, Fisher Scientific ou Larodan qui proposent du DPA à la vente (200-240€ HT / 100mg, pureté > 98-99%) sont incapables de fournir à la demande des quantités de DPA supérieures à 5g, avec un délai d'attente de plusieurs semaines voir de plusieurs mois (communications personnelles, 2016). Ainsi les études s'intéressant au DPA sont souvent *in vitro*, ou *in vivo* mais en utilisant du DPA avec un taux de pureté moyen (entre 40 et 90%) qui contient donc aussi principalement du DHA et du DPAn-6 (Xiao fei Guo et al. 2017; Kaur, Guo, and Sinclair 2016; Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015; Kaur, Cameron-Smith, et al. 2011). De plus, le DPA radiomarqué ¹⁴C est peu demandé et reste lui aussi très coûteux (ARC, ¹⁴C-DPA, 10μCi, 12000€, 2015) et donc peu accessible, même si une étude a rapporté son utilisation (Kaur et al. 2013). Quelques études, principalement associées à l'équipe de Sinclair en Australie, utilisent néanmoins du DPA hautement purifié, dont une étude chez l'Homme qui a nécessité 120g de DPA (E. Miller et al. 2013; Markworth et al. 2016). Ces études utilisent la plupart du temps comme source de DPA des huiles purifiées à partir d'algues ou de poissons dont la purification est réalisée par des entreprises ou des *start up*, dont nous n'avons pas réussi à retrouver l'existence ou qui ont aujourd'hui fermées (communication personnelle des laboratoires de Sehran et Sinclair), ou pour lesquelles les produits finis ne sont pas enrichis à plus de 15% des AGPI-LC n-3 (Super DPA Fish oil®, Swanson, USA, 2018). Le DPA a tout du moins été au centre des considérations lors d'un symposium de l'ISFFAL en 2014 à Stockholm (Congress 2014), pendant lequel la synthèse chimique du DPA et de son dérivé hydroxylé (PD1_{DPAn-3}) ont été proposées, puis publiées (Hansen, Dalli, and Serhan 2017). Le DPA a fait l'objet ainsi que ses dérivés oxygénés de plusieurs revues (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015; Yazdi 2014; Kaur, Cameron-Smith, et al. 2011; Dyall 2015; Kaur, Guo, and Sinclair 2016; Vik, Dalli, and Hansen 2017; Weylandt 2016).

4.2 Sources alimentaires, consommation et biodisponibilité

4.2.1 Sources, consommation alimentaire, recommandations et marqueurs du DPA

La source majeure de DPA est évidemment les produits de la mer, dont les poissons de la famille des clupéidés qui ont donné au DPA sa dénomination commune : l'acide clupanodonique (USDA, 2014). Les données sur le DPA sont principalement américaines et australiennes. Ainsi, pour 100g de portion, le saumon va contenir 393mg de DPA, 200mg pour le maquereau d'Atlantique et le hareng, la morue, le thon rouge, la truite vont aussi fournir entre 100 et 200 mg de DPA pour 100g de portion. La viande et les graisses de phoques semblent être les plus riches en DPA, contenant 5,6% de DPA (H. O. Bang, Dyerberg, and Sinclair 1980), ce qui reviendrait à une consommation journalière comprise entre 1,7 et 4,0 g de DPA par jour pour la population inuit (Hans Olaf Bang and Dyerberg 1980). Le foie de bœuf et d'agneau semblent être les sources terrestres les plus riches en DPA mais sont aussi très variables en fonction des provenances (USDA 2014, Ciquel, FSA). Ainsi ils contiennent environ 140 mg de DPA / 100g en Nouvelle Zélande, mais uniquement 20-30mg au Royaume-Uni, alors que le bœuf américain n'en contient pas, sûrement associé aux différences de production et de qualité des pâturages (P. . Williams et al. 2007; Sciences, Williams, and Droulez 2010; Caroline Morin, Blier, and Fortin 2015). La biohydrogénation ruminale du DPA est similaire à celle de l'EPA et semble complète sans formation des dérivés intermédiaires attendues après la biohydrogénation, du DHA (Toral et al. 2018). Les compléments alimentaires à base d'huiles de poissons enrichis en AGPI-LC n-3 peuvent aussi fournir un apport de DPA, les huiles de maquereaux contenant environ 4.9% de DPA, contre 3,0% pour le saumon ou 2% pour la sardine. Certains compléments alimentaires enrichis spécifiquement en DPA ont aussi fait de brèves apparitions sur le marché mais ont très vite disparus, sûrement à cause du manque de demande ou d'allégation nutritionnelles pour cet AGPI-LC.

Les principales sources alimentaires de DPA chez les femmes enceintes et allaitantes sont les produits de la mer (59%), la volaille (14%), les produits carnés (11%) et les produits laitiers (9%) (ISSFAL, 2014). Environ les deux tiers des apports en DPA dérivés des produits de la mer chez ces femmes ont été attribués à la consommation de saumon (Enti, Opi, and On 2012). Chez les enfants australiens, les apports en EPA et en DHA sont fortement corrélés avec la consommation de poisson et de produits de la mer, alors que l'apport en DPA est modérément corrélé avec la consommation de viande (Rahmawaty et al. 2013). Le principal contributeur à

la consommation de DPA chez ces enfants était la viande, la volaille et le gibier (56%); les poissons et les fruits de mer (23%), les produits et plats à base de céréales (5,7%), les produits laitiers (5,6%) et finalement les produits à base d'œufs (3,6%) pour le reste (European Food Safety Authority 2010; Rahmawaty et al. 2013).

En Europe, l'apport journalier moyen de DPA chez l'adulte est compris entre 25 mg/j (Belgique, femme de 18-39 ans) et 75 mg/j (France, homme >45 ans), avec des apports médians de 12 à 80 mg/j. En France, l'apport maximal, estimé par les 5 plus haut percentiles de la population, est de 129 mg/j de DPA (Enti, Opi, and On 2012). Il n'existe pas de base de données chez les jeunes enfants pour le DPA (0-3 ans) et les adolescents (13-19 ans). Les données de consommation suédoises, norvégiennes et allemandes indiquent que l'apport journalier moyen de DPA chez les enfants de 4 ans est 30 mg/j, de 40mg/j pour les 8-12 ans et de 120 mg/j pour les 8-12 ans (European Food Safety Authority 2010; Enti, Opi, and On 2012). Ainsi le DPA pourrait contribuer jusqu'à 30% de l'apport en AGPI-LC n-3 dans notre alimentation en fonction des consommations (Howe et al. 2006). De plus, dans le lait humain, le taux de DPA est plus élevé que celui de l'EPA, et comparable à celui du DHA, sous-entendant un impact potentiel dans le développement (B. Koletzko, Mrotzek, and Bremer 1988; Bernadette Delplanque et al. 2015).

Les différentes agences de santé s'accordent pour dire que les données sur le DPA sont insuffisantes pour produire des recommandations spécifiques pour cet AGPI-LC n-3. Néanmoins, l'Angleterre (Contreras et al. 2017), l'Australie et la Nouvelle Zélande (Nhmrc 2005) ainsi que les Pays Bas (Gezondheidsraad 2006) incluent le DPA dans la somme d'AGPI-LC n-3 recommandée (EPA+DPA+DHA).

Le DPA n'est pas pris en compte dans le calcul de l'index Oméga-3 (EPA+DHA des globules rouges). En effet, alors que le DPA semble aussi augmenter dans les membranes des globules rouges et dans les différentes classes des lipides du plasma chez l'Homme en fonction de la consommation alimentaire en AGPI n-3, cette augmentation tendait à être relativement limitée par rapport à l'EPA et au DHA (Stark, Van Elswyk, et al. 2016). Il est pourtant intéressant de voir que la corrélation est bien moins bonne entre l'index Oméga-3 et la somme EPA+DHA du sang total qu'entre l'index Omega-3 et la somme EPA+DPA+DHA du sang total. Cela laisse supposer que le DPA présent dans les autres compartiments sanguins que les globules rouges (plasma, plaquettes, PBMC) pourrait avoir un métabolisme différent de l'EPA et du DHA (Harris and Von Schacky 2004). Plus récemment, si l'on considère non pas la somme EPA+DPA+DHA mais leur pourcentage au sein des AGPI (sans le C20:3 n-9), le pourcentage

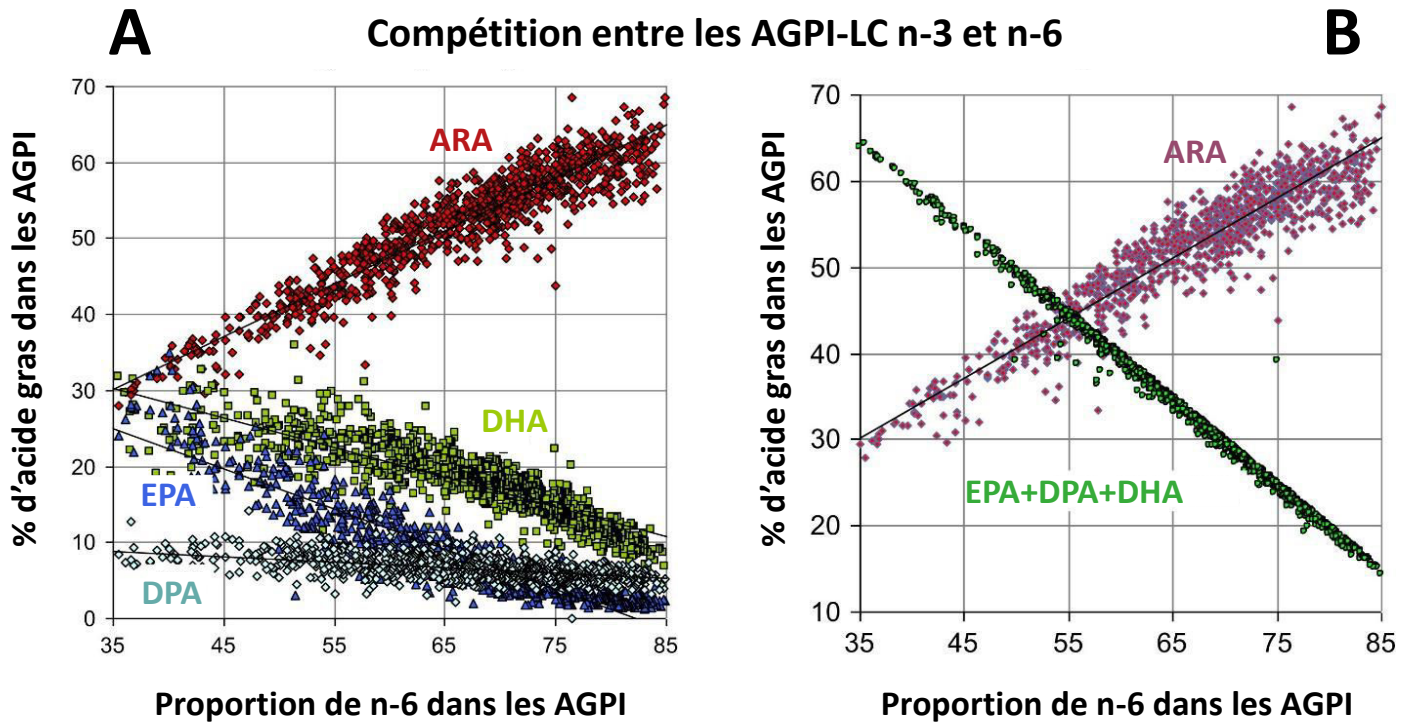


Figure 40. Compétition entre les AGPI-LC incluant le DPA

Adapté de *Bibus et Lands, 2015*.

Analyse d'acides gras de 1015 échantillons de sang total humain. Les proportions de C20:3 n-6, C22:4 n-6 et DPA n-6 étaient inférieures à 10% et ne sont pas représentées. Les lignes noires représentent l'équilibre approximatif moyen en AGPI pour les différents groupes régionaux participants à l'étude, ayant des habitudes alimentaires différentes qui entraînent des différences de répartition en AGPI.

A) La proportion de DPA dans les AGPI du compartiment sanguin est toujours plus basse que les proportions d'EPA et de DHA, et moins impactée par les proportions d'AGPI n-6. **B)** La meilleure corrélation et qui représente le moins de variabilité interindividuelle entre le pourcentage d'acide arachidonique (ARA) et les AGPI n-3 du compartiment sanguin est représenté par la somme EPA+DPA+DHA.

de la somme EPA+DPA+DHA semble mieux corrélée à l'ARA sanguin que le pourcentage de la somme EPA+DHA (**Figure 40**). De plus, le DPA sanguin est présent dans le sang total en plus faible quantité que l'EPA et le DHA et sa proportion diminue moins que l'EPA ou le DHA en fonction de l'augmentation de la proportion d'AGPI n-6 dans le sang (Bibus and Lands 2015).

4.3 Métabolisme du DPA, distribution et biodisponibilité

4.3.1 Métabolisme

La plupart des études de supplémentation en AGPI n-3 radiomarqués situés avant le DPA dans la chaîne de conversion à partir de l'ALA (ALA, C18:4 n-3, EPA) ont montré une augmentation du statut en DPA mais pas en DHA. Après injection en intraveineuse de 1-¹⁴C-EPA chez le rat, le ¹⁴C-DPA est retrouvé 3 minutes après l'injection et continuait à augmenter dans le temps alors que le DHA restait stable (Bazan et al. 1982). De plus, le 1-¹⁴C-EPA ajouté au milieu de culture de cellules endothéliales humaines était incorporé à 72,5% sous forme de ¹⁴C-DPA après 24h d'incubation, et seulement à 1,3% sous forme de ¹⁴C-DHA (Miriam D. Rosenthal and Hill 1986). Le DPA est le seul intermédiaire entre l'EPA et le DHA dans la voie de conversion à être présent dans des quantités non-négligeables dans l'alimentation humaine, par rapport aux dérivés C24:5 n-3 et C24:6 n-3 (Rahmawaty et al. 2013). Les enzymes ELOVL2 et plus faiblement ELOVL5 peuvent allonger le DPA en dérivé C24:5 n-3, ensuite converti jusqu'au DHA (Gregory, Cleland, and James 2013). Ainsi il a été fait l'hypothèse que l'ajout de DPA dans le régime pourrait être un meilleur précurseur du DHA que l'EPA, en passant outre la conversion de l'EPA utilisant elle-aussi les enzymes ELOVL2 et ELOVL5 ; ELOVL2 étant considérée comme limitante (Gregory et al. 2011). Certains auteurs ont aussi fait l'hypothèse que chez l'Homme, chez les animaux d'élevage et potentiellement chez les autres mammifères, le DPA pourrait servir de réservoir de DHA (E. Miller et al. 2013).

In vivo, la capacité de l'apport de DPA à augmenter le statut en DHA est controversée. Le gavage du rat pendant 7 jours avec 50mg de DPA/dose sous forme d'AGL entraîne une augmentation du DHA dans le foie uniquement (Kaur et al. 2010). Chez le caniche miniature, l'injection intravitreuse de 1-¹⁴C-DPA montre une augmentation du DHA provenant du DPA dans la rétine (Alvarez et al. 1994). Chez l'Homme, une supplémentation de 7 jours par dose journalière unique de DPA entraîne une augmentation du DHA plasmatique dans les TG

uniquement (E. Miller et al. 2013). A l'inverse, chez la souris obèse C57BL/KsJ-db/db supplémentée dans le régime pendant 4 semaines avec du tri-DPA, aucune augmentation tissulaire du DHA n'a été retrouvée (Gotoh et al. 2009). Ainsi que chez la souris C57BL/6J nourrie avec un régime high-fat et gavée avec 50mg de DPA par jour pendant 6 semaines (Xiao fei Guo et al. 2017).

L'ajout de DPA dans des milieux de cultures de cellules endothéliales d'aorte (Achard, Bénistant, and Lagarde 1995; Kanayasu-Toyoda, Morita, and Murota 1996), de lignée hépatocytaire FaO (Kaur, Sinclair, et al. 2011), d'hépatocytes primaires de rats (Pawar and Jump 2003) ou de lignée humaine HepG2 (Tian et al. 2016) entraîne une augmentation de l'EPA dans les cellules et les milieux, ainsi que du DHA dans les milieux, mais le DHA n'est pas augmenté dans les lignées humaines d'intestin (Caco-2) ou de monocyte (THP-1) (Tian et al. 2016). *In vivo*, la supplémentation en DPA entraîne aussi une augmentation du statut en EPA dans tous les tissus étudiés chez la souris C57BL/6J-db/db (Gotoh et al. 2009), le rat Sprague-Dawley (Kaur et al. 2010), la souris C57BL/6J (régime high-fat) (Xiao fei Guo et al. 2017), le caniche miniature (Alvarez et al. 1994) et l'Homme (E. Miller et al. 2013). L'EPA formé à partir du DPA provient certainement de la rétroconversion du DPA en EPA, en impliquant comme pour le DHA l'acyl-CoA oxydase et un cycle de β -oxydation, comme le démontrent des cultures de fibroblastes déficients en acyl-CoA oxydase qui n'entraînent pas de raccourcissement des chaînes carbonées des AGPI-LC n-3 (Christensen et al. 1993). La rétroconversion du DPA serait particulièrement importante dans le foie mais aussi dans les reins (Holub, Swidinsky, and Park 2011).

Quelques études se sont intéressées à la biodisponibilité du DPA par ingestion directe de DPA. Ainsi, après une injection 2,5 μ Ci de 1-¹⁴C-DPA, 1-¹⁴C-EPA ou 1-¹⁴C-DHA chez le rat mis en cage métabolique pendant 6h, le ¹⁴C-DPA est catabolisé en même proportion que le DHA et moins que l'EPA (Kaur et al. 2013). Chez des rats nourris avec un régime semi-synthétique riche en graisses (23%) et pauvre en AGPI-LC n-3 pendant 9 jours, l'ingestion de 250 mg/j de DPA ou d'EPA sous forme d'AGL pendant 3 jours a entraîné une digestibilité du DPA moins importante que celle de l'EPA (Ghasemi Fard et al. 2014). Le DPA serait aussi préférentiellement hydrolysé par la lipase pancréatique porcine *in vitro* en comparaison à l'EPA et au DHA, suggérant une possible absorption plus rapide pour le DPA (Akanbi, Sinclair, and Barrow 2014). Le 1-¹⁴C-DPA ingéré chez le rat est incorporé dans le cœur et dans le muscle au même niveau que le DHA et plus que l'EPA (Kaur et al. 2013). Le DPA marqué s'insère principalement dans les PL, principalement les PE et les PC, comme l'EPA et le DHA (Holub,

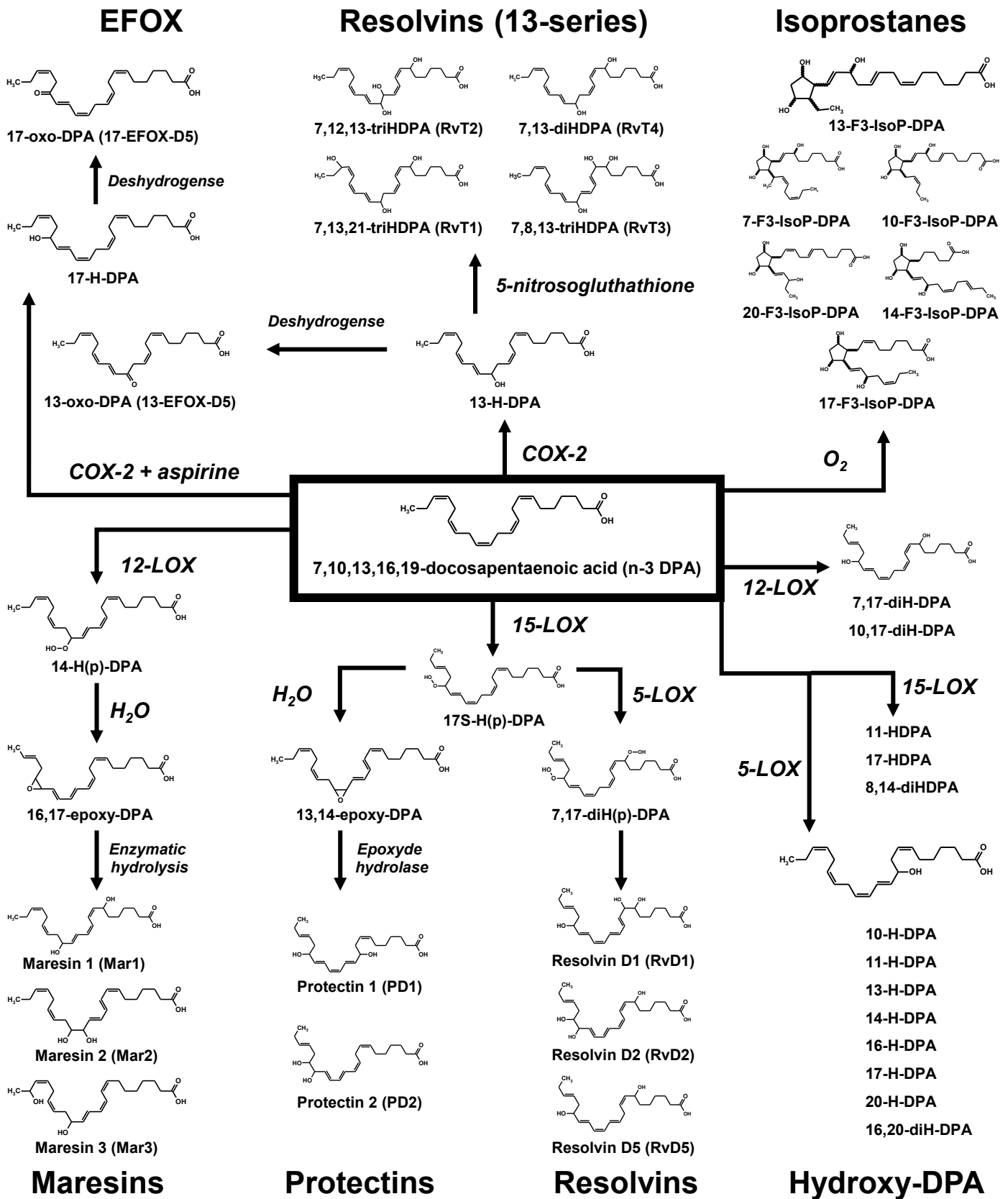


Figure 41. Docosanoïdes issus du DPA

Adapté principalement de Weylandt, 2016 et de Vik, Dalli et Hansen, 2017.

COX, cyclooxygénase ; diHDHA, dihydroxydocosapentaénoïque ; H(p)DHA, hydro(peroxy)docosapentaénoïque ; LOX, lipoxygénase ; RvT : résolvines de la série 13

Swidinsky, and Park 2011). Ainsi, alors que la composition du tissu cérébral est connue pour rester très stable, une administration orale de DPA à des rats a entraîné une augmentation du DPA et du DHA cérébral, peu importe l'âge des animaux (Kelly et al. 2011). Néanmoins, aucune étude ne fait référence à la distribution tissulaire globale du DPA après sa supplémentation.

4.3.2 Précurseur de médiateurs oxygénés

Comme le DHA, le DPA est aussi précurseur de docosanoïdes dont les effets physiologiques sont moins connus, de même que leur nature et leur synthèse. Ainsi plusieurs métabolites du DPA sont découverts chaque année dans différents tissus, de même que leur synthèse chimique et biologique (**Figure 41**) (Weylandt 2016; Aursnes et al. 2013; Tungen et al. 2014; Aursnes et al. 2014; Hansen, Dalli, and Serhan 2017; Vik, Dalli, and Hansen 2017; Dalli, Colas, and Serhan 2013).

La voie utilisant la 15-LOX est la plus efficace, convertissant 85% du DPA en son dérivé 17-H(p)DPAn-3 *in tubo*, contre seulement 10% pour la 12-LOX et la 5-LOX (Dangi et al. 2009). Le 17-H(p)DPAn-3 issu de la 15-LOX va ensuite être dérivé en composés di- et tri-hydroxylés par action de la 5-LOX pour produire les résolvines, ou va subir l'action d'une époxyde hydrolase après hydratation pour donner les protectines dont les noms sont analogues à ceux retrouvés avec les dérivés hydroxylés du DHA (Dalli, Colas, and Serhan 2013). Les marésines issues du DPA vont provenir de l'action de la 12-LOX puis de la réduction du 14-H(p)DPAn-3. La 5-LOX va elle aussi produire des dérivés mono- et di-hydroxylés. Le DPA va aussi subir l'action de COX-2 pour former le 13-HDPAn-3 qui va pouvoir, comme pour les dérivés issus du DHA, être réduit en dérivés 13-oxo de la série des EFOX. Le 17-EFOX-D5 est produit quand de l'aspirine est ajouté au milieu de culture des macrophages comme pour les dérivés EFOX issus du DHA (Kuda 2017). Les résolvines de la série 13 issues du 13-HDPAn-3 ont aussi été identifiées dans des co-incubations de neutrophiles et de cellules endothéliales (Serhan et al. 2015). Ces dérivés sont formés par COX-2 puis par S-nitrosylation. Le cytochrome P450 peut aussi métaboliser le DPA mais dans une moindre mesure que les autres AGPI-LC, même si cette information pourrait venir de problèmes expérimentaux (Dupuy et al. 2016; Le Faouder et al. 2013). Les isoprostanes issues de la peroxydation du DPA ne sont pas encore connues. Néanmoins, les 14-F_{3t}-NeuroP_{n-3} et 20-F_{3t}-NeuroP_{n-3}, principalement, ont récemment été découvertes à partir de celles issues du DPA n-6 et leur potentiel effet biologique n'est pas

connu (De las Heras-Gómez et al. 2017) (communication personnelle T. Durand). Certains de ces métabolites sont détectés dans le sérum humain après une supplémentation en DPA (Markworth et al. 2016).

Très peu d'études font état de l'action des métabolites oxygénés issus de DPA du fait de leur très récente découverte mais aussi du peu d'équipe au monde possédant les standards non-commerciaux issus de synthèse chimique complète de ces métabolites (Serhan 2017).

4.4 Effets physiologiques

4.4.1 Maladies cardiovasculaires et syndrome métabolique

L'effet du DPA sur les paramètres lipidiques associés à la prévention des maladies cardiovasculaires est le plus documenté (propriétés anti-inflammatoires, inhibition de la synthèse de cytokines, diminution de la thrombose, diminution des lipides plasmatiques, inhibition de l'athérosclérose...). Tout d'abord, les études de supplémentation en DPA pur chez l'Homme sont rares et n'existent que chez la femme saine (E. Miller et al. 2013). Ainsi les études concernant l'effet potentiel du DPA dans la résolution des maladies chez l'Homme sont donc plutôt des études d'associations. Il a été montré qu'un taux élevé de DPA dans la membrane de GR chez les hommes (Q1 :1,46 ±0,59 vs. Q4 :1,31 ±0,59%) et chez les femmes (Q1 :1,48 ±0,56 vs. Q4 :1,39 ±0,58%) est associé à un risque moins important d'apparition de syndrome métabolique chez les adultes chinois (Dai et al. 2016). De plus, un taux de DPA plasmatique élevé serait aussi le plus corrélé à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires avec le taux plasmatique de DHA (Xiao-fei Guo et al. 2017; Harris, Del Gobbo, and Tintle 2017; Oda et al. 2005; Rissanen et al. 2000). Une étude transversale a révélé que la diminution des concentrations cellulaires de DPA dans les GR (3,0% vs 3,9%) était associée à une augmentation de la fréquence des maladies cardiovasculaires (Paganelli et al. 2001). Le taux plasmatique de DPA est aussi inversement corrélé à l'obstruction des artères et aux accidents vasculaires cérébraux. Il est le seul acide gras dont le taux plasmatique est inversement corrélé à l'obstruction artérielle chez les fumeurs (S. Leng et al. 2017; G. C. Leng et al. 1994). De plus, une étude transversale d'échographie carotidienne montre une association entre la consommation de DPA et la diminution de l'épaisseur de la paroi carotidienne (Hino et al. 2004). Chez l'enfant, les plus hauts taux de DPA des GR ont aussi été associés à une diminution du risque d'auto-immunité des îlots pancréatiques chez des enfants prédisposés au

diabète de type I (Norris et al. 2014). Plusieurs études ont montré que le DPA pouvait être augmenté dans le compartiment sanguin aussi bien que dans les tissus et principalement dans le cœur après supplémentation d'huile de poisson ou plus récemment d'huile de vipérine (*echium*) riche en acide stéaridonique, montrant que l'acide stéaridonique pourrait aussi être une source de DPA, en plus d'une source d'EPA pour laquelle il est principalement décrit (K. Kuhnt et al. 2014). La supplémentation en huile de vipérine a une action anti-arythmique comparable celle obtenue par supplémentation avec des huiles de poissons riches en DHA et est associée à l'augmentation tissulaire du DPA (Mahinda Y. Abeywardena et al. 2016).

Certaines études *in vitro* et *in vivo* principalement en modèle rongeur ont ensuite essayé d'isoler les mécanismes par lesquels le DPA pourrait aider à la prévention des maladies cardiovasculaires. Le taux de DPA dans les GR est inversement le plus corrélé aux TG plasmatiques à jeun chez l'Homme après une supplémentation en EPA+DHA pendant 5 mois, par rapport à l'ALA, à l'EPA ou au DHA, et de façon dose dépendante (Skulas-Ray et al. 2015). Ainsi, plusieurs études ont montré que le DPA améliore le profil lipidique du plasma de façon similaire à l'EPA et au DHA. Chez le hamster nourris avec des régimes riches en cholestérol, la supplémentation en DPA réduit le taux de cholestérol total et le cholestérol non HDL plasmatique, associés à une inhibition de SREBP2 qui entraînait une diminution de la transcription de l'HMG-CoA Réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol (J. Chen et al. 2012). Des souris donc le régime était supplémenté avec du DPA pur montraient une diminution de l'activité de la FAS, des niveaux cholestérol total et de TG plasmatiques (Nagao et al. 2014). Une étude récente très intéressante chez la souris C57BL/6J soumis à des régimes élevés en lipides et supplémentés en DPA (72% de pureté), EPA ou DHA pendant 6 semaines a montré que seul le DPA améliore la résistance à l'insuline (HOMA) (Xiao fei Guo et al. 2017). Dans cette étude le DPA aussi bien le DHA ont prévenu l'augmentation des taux sériques de l'alanine aminotransférase (ALAT), sûrement associée à une inhibition de la voie de signalisation TLR-4 / NFκB et à une diminution de la lipogenèse dans le foie. De plus la supplémentation en DPA tendait à impacter la composition tissulaire de façon plus similaire au DHA qu'à l'EPA (Xiao fei Guo et al. 2017). Des souris C57BL/KsJ-db/db recevant du tri-DPA ou du DHA diminuaient leur taux de TG hépatiques comparées au contrôle et de façon plus importante que les souris traitées avec l'EPA (Gotoh et al. 2009). Dans un modèle de culture de lignée cellulaire humaine de foie (HepG2), la diminution de la synthèse des triglycérides après supplémentation du milieu en AGPI-LC n-3 est associée à une diminution de l'expression des ARNm de la FAS et est classée comme telle en fonction des supplémentations : C24:6 n-3

> DHA > DPA > EPA (Nagao et al. 2014). Dans un modèle de lignée cellulaire de foie de rat (FAO) traitée avec 50µM d'EPA, de DPA ou de DHA, le DPA diminuait le plus fortement l'expression des ARNm de l'HMG-CoA Réductase, de la FAS, de l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC-1), de SREBP1-c et de ChREBP (Kaur, Sinclair, et al. 2011). D'une autre part, la concentration de chylomicrons plasmatiques postprandiaux diminuait chez des femmes en bonne santé après un petit déjeuner supplémenté avec du DPA, comparé à une supplémentation en EPA ou en huile d'olive. Enfin il apparaît que le DPA est transporté principalement dans la part TG des chylomicrons et non dans les PL après la période d'évaluation de 5h chez l'Homme (Linderborg et al. 2013).

Basé sur ces études, la société Matinas BioPharma a breveté et mis sur le marché un médicament contenant un mélange de DPA et d'EPA sous forme d'esters éthyliques et contenant seulement des traces de DHA pour le traitement de l'hypertriglycéridémie sévère (Maki et al. 2017). En effet, comparé à l'ingestion d'esters éthyliques (EE) d'EPA chez l'Homme avec une hypertriglycéridémie sévère (200-400 mg/dL plasma de TG), ce composé (MAT9001) permet de réduire le niveau plasmatique de TG, de cholestérol total, de cholestérol non-HDL et de VLDL de façon plus importante que l'EPA-EE.

Le DPA peut aussi diminuer l'agrégation plaquettaire de façon plus importante que l'EPA et le DHA. Le DPA inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène ou l'ARA de façon dose dépendante dans une étude utilisant des plaquettes de lapins (AKIBA et al. 2000) ou des plaquettes humaines (M. Phang, Lincz, and Garg 2013; Melinda Phang, Garg, and Sinclair 2009), mais cette régulation semble sexe-dépendante car seule l'agrégation plaquettaire des femmes étaient inhibée. Le DPA augmenterait aussi la voie LOX et pourrait agir comme un fort inhibiteur des activités de COX-1 et COX-2 entraînant une diminution de l'agrégation plaquettaire et de la tension active de l'aorte (J. Chen et al. 2012; AKIBA et al. 2000). Le DPA stimule aussi la migration des cellules endothéliales, dont la migration et la prolifération sont des processus impliqués dans le contrôle de la réponse cicatrisante des vaisseaux sanguins. De plus, le traitement de cellules endothéliales d'aorte avec du DPA inhibait leur activité migratoire à cause d'une stimulation du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (Kanayasu-Toyoda, Morita, and Murota 1996).

4.4.2 Inflammation, neurologie et cancer

Le DPA est le deuxième AGPI-LC n-3 retrouvé dans le cerveau, bien que sa concentration cérébrale soit environ 70 fois moins importante que le DHA. La supplémentation en DPA

purifié à hauteur 150 mg/kg/j pendant 6 jours chez le rat a entraîné une réduction des symptômes associés à la dépression ainsi qu'une augmentation des taux de DPA et de DHA cérébraux (Laino et al. 2014). Des rats âgés (20-22 mois) supplémentés avec du DPA, de l'EPA ou des AGMI purifiés pendant 56 jours avaient des effets neuro-restaurateurs associés à une diminution de l'activation microgliale et du stress oxydatif de l'hippocampe, deux mécanismes impliqués dans la perte des fonctions synaptiques et donc liés au déclin cognitif (Kelly et al. 2011).

La réduction de l'inflammation associée au DPA a surtout été étudiée dans des modèles de cancers. Chez l'homme adulte en bonne santé, un haut niveau de DPA est associé à un score d'inflammation moins élevé, principalement associé à la diminution des scores de la protéine réactive C (CRP) et du TNF- α et est proportionnel aux niveaux de DPA des GR (Q1=1,78%, Q2=1,97%, Q3=2,15%, Q4=2,41%) (Labonté et al. 2014). Plusieurs études de la même équipe canadienne ont montré *in vitro* et *in vivo* en modèle rongeur que l'ajout de DPA dans le milieu ou le régime sous forme de monoglycéride avait des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques plus importants que l'EPA ou le DHA dans un modèle de cancer colorectal (Caroline Morin, Rousseau, and Fortin 2013), diminuait l'inflammation de façon plus importante que le DHA et comme l'EPA dans un modèle d'arthrite rhumatoïde (Caroline Morin, Blier, and Fortin 2015), réduisait les marqueurs de l'inflammation et du remodelage vasculaire dans un modèle d'hypertension pulmonaire. Dans une autre étude, le DPA réduisait l'expression des gènes de l'inflammation des membranes des vaisseaux sanguins qui sont impliqués dans le développement des plaques d'athéromes (Kishida, Tajiri, and Masuzawa 2006). Le traitement de cellules endothéliales d'aorte avec du DPA inhibait fortement l'angiogenèse, impliquée dans la croissance des tumeurs, l'inflammation et les micro-angiopathies (Tsuji et al. 2003). D'autre part, une étude épidémiologique récente montre aussi que le DPA consommé est l'acide gras le plus associé avec un meilleur volume respiratoire forcé chez le patient fumeur (S. Leng et al. 2017).

La diminution de l'inflammation associée au DPA semble surtout provenir de ces médiateurs oxygénés. Ainsi, l'incubation de macrophages humains avec de la PD1_{DPA n -3} augmente l'activité phagocytaire des macrophages et l'apoptose des neutrophiles, qui sont des facteurs clés de la résolution de l'inflammation (Aursnes et al. 2013). La Marésine_{DPA n -3} issue du DPA stimulait la phagocytose des macrophages et la clairance des neutrophiles apoptotiques humains de façon similaire à la Marésine_{DHA} issue du DHA (Tungen et al. 2014). Dans une autre étude, les résolvines de la série 13 issues du DPA accélèrent la résolution de l'inflammation et

augmentaient la survie de 60% chez des souris infectées par *Escherichia Coli* (Tungen et al. 2014; Serhan et al. 2015; Dalli, Chiang, and Serhan 2015).

Suite à ces recherches, un médicament sous prescription contenant du DPA sous forme de monoglycéride est en phase finale de développement par la start-up pharmaceutique SCF Pharma, pour ses propriétés anti-inflammatoire et anti-proliférative (www.scfpharma.com) et fait l'objet d'un brevet (Vallières, Holland, and Avery 2017).

OBJECTIFS DE RECHERCHE

La synthèse bibliographique a présenté les caractéristiques métaboliques, la régulation nutritionnelle, et les effets physiologiques des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et plus particulièrement celles de l'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA), ainsi que de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ces AGPI à longues chaînes (AGPI-LC) n-3 possèdent des effets biologiques indépendants ou synergiques encore peu connus, principalement pour le DPA. Ils sont aussi considérés comme essentiels dans l'alimentation car leur voie de bioconversion à partir de l'acide α -linoléique (ALA) est limitée. De plus, les sources ainsi que la consommation directe de ces AGPI-LC aussi bien que de leur précurseur ALA est insuffisante dans l'alimentation occidentale.

Il reste donc important de rechercher tant des moyens d'augmenter la bioconversion de l'ALA jusqu'aux dérivés AGPI-LC n-3 et leur transport et leur incorporation dans les tissus, que d'appréhender les différents physiologiques et métaboliques associés à la présence de ces AGPI-LC n-3 dans l'alimentation.

Ainsi, le premier des objectifs des travaux réalisés au cours de mon doctorat était d'étudier l'influence de la consommation de DPA sur la composition tissulaire en acides gras, et principalement en AGPI n-3, ainsi que ses éventuels effets physiologiques spécifiques. Pour cela, la purification du DPA à haute pureté (>99%) a tout d'abord été mise en place au laboratoire à l'aide d'une méthodologie utilisant la chromatographie liquide pour produire du DPA en quantités suffisantes pour permettre de réaliser des expérimentations *in vivo* chez le rat. Deux approches de supplémentation *in vivo* en DPA ont ensuite été mises en place pour : (i) identifier les tissus dont la composition en acides gras est la plus impactée par le DPA alimentaire en fonction du vecteur lipidique au sein duquel il est ingéré. (ii) aborder les effets spécifiques du DPA par rapport aux autres AGPI n-3 (ALA, EPA, DHA) sur la régulation du métabolisme lipidique et la composition tissulaire en acides gras des tissus les plus impactés par la supplémentation en DPA.

Dans un second temps, l'intérêt des travaux s'est porté sur la possibilité d'induire l'enrichissement des tissus en AGPI-LC n-3 et la voie de biosynthèse des AGPI n-3 par une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime. Cet objectif s'incorporant dans une thématique de nutrition infantile, les compositions lipidiques des régimes testés étaient similaires à celles de formules infantiles commercialement disponibles.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1 :
PURIFICATION DU DPA
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

1 Contexte de l'étude

Certains acides gras d'intérêt présents dans des sources naturelles ou synthétisés ne sont pas disponibles dans le commerce à haute pureté en quantités suffisantes et à des prix abordables pour permettre de réaliser des études *in vivo* de ces molécules. C'est le cas de l'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA). En effet, les différentes revues s'intéressant au DPA s'accordent à dire que la faible disponibilité commerciale de DPA est l'un des principaux facteurs associés au faible nombre d'études *in vivo* concernant cet acide gras polyinsaturé à longue chaîne (AGPI-LC). (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015; Yazdi 2014; Kaur, Cameron-Smith, et al. 2011; Dyllal 2015; Kaur, Guo, and Sinclair 2016; Vik, Dalli, and Hansen 2017; Weylandt 2016).

Néanmoins, les études de purification du DPA sont rares. Une première étude japonaise s'est tout d'abord intéressée à la purification à l'échelle industrielle de l'ester éthylique (EE) de DPA provenant de l'huile de *Schizochytrium sp* par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) industrielle en utilisant deux colonnes en phase inverse. Ils ont obtenu du DPA (et du DHA) > 99% de pureté avec une production de 70 g/heure de DPA (Yamamura and Shimomura 1997). Une équipe chinoise s'est ensuite intéressée à purifier le DPA en laboratoire à partir d'huile de thon, tout d'abord par cristallisation des acides gras complexés à l'urée, puis par purification par chromatographie liquide (LC) sur colonne de silice au nitrate d'argent (Mu et al. 2016). Ils ont obtenu du DPA à 22,3% des AGT avec un rendement de purification de 70,7%. Très récemment, cette même équipe a réussi à purifier du DPA de 16,4% à 28,1% des AGT sous forme de DAG par cristallisation (6h, -80°C) à partir d'huile provenant de l'algue *Schizochytrium sp* (X. Wang et al. 2018). Différents brevets ont aussi été déposés pour produire, extraire et purifier du DPA (et du DHA) sous forme d'esters méthyliques d'acide gras à partir d'*ulkenia*, (Tanaka et al. 2003; "Brevet chinois" 2008; Yaguchi 2010).

Le but de notre étude était de mettre en place une méthode de purification par LC permettant d'obtenir plusieurs dizaines de grammes de DPA d'une pureté supérieure à 98% et dont la mise en place est possible, renouvelable et adaptable à d'autres acides gras en laboratoire de recherche.

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériels

Les huiles de poisson enrichies à haute teneur en AGPI-LC n-3 sous forme d'EE ont été gracieusement fournies par la société Polaris (Quimper, France). Le foie de bœuf a été acheté dans une boucherie de proximité (Rennes, France). Le méthanol utilisé pour la LC était de qualité analytique (Fisher Scientific, Elancourt, France) et de l'eau MilliQ a été utilisée dans toutes les étapes de la purification. Tous les autres solvants étaient de qualité HPLC et les réactifs provenaient de Fisher Scientific ou Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2 Analyse de la composition en acides gras des sources par GCMS

2.2.1 Extraction et dérivation des lipides en esters méthyliques

Pour trouver la source de départ utilisée pour la purification du DPA, différentes huiles de poisson et du foie de bœuf ont été extraites par la méthode de Folch (Gossert et al. 2011). Les lipides sont extraits dans 4 volumes de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) en présence d'1 volume de KCl 0,8%. Après agitation pour les huiles et broyage à l'ultraturax et agitation sur roue pour le foie de bœuf, la solution est centrifugée (5min, 150g, T° ambiante) et la phase organique est récupérée puis lavée avec un mélange de chloroforme/méthanol/KCl 0,8% 3/48/47 (v/v/v). Après centrifugation, les lipides sont prélevés dans la phase organique et évaporés sous flux d'azote à 45°C. La dérivation des lipides totaux en esters méthyliques s'effectue selon la méthode au trifluorure de bore (BF₃) (Morrison and Smith 1964). Les lipides extraits sont saponifiés par la soude (NaOH) méthanolique à 0,5N pendant 30 min à 70°C. Les acides gras saponifiés sont convertis en esters méthyliques après ajout de BF₃ méthanolique et incubation 30 min à 70°C. Les esters méthyliques obtenus sont extraits deux fois dans 4mL de pentane + 4mL de NaCl 0,9% puis lavés une deuxième fois par 2mL de NaCl 0,9% avant d'être évaporés sous flux d'azote à 45°C et repris dans l'hexane pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GCMS).

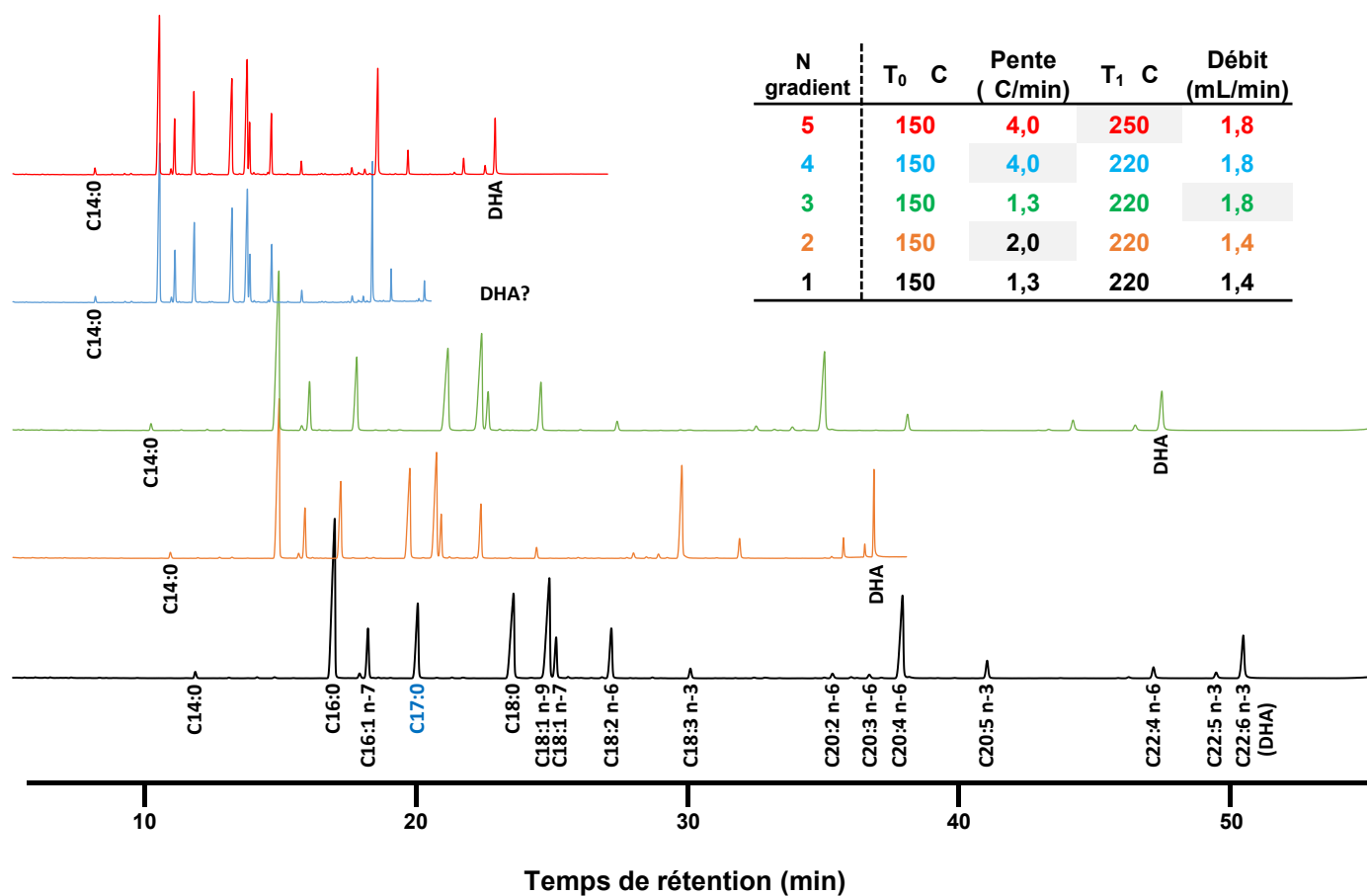


Figure 42. Optimisation du gradient de séparation des acides gras par GCMS

Le gradient de séparation par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse a été amélioré (N°5) à partir du gradient initial disponible au laboratoire (N°1) à partir d'un échantillon d'esters méthyliques issus de lipides totaux de foie de rat. Les pics des chromatogrammes sont identifiés à partir de standards commerciaux. Le tableau présente l'évolution des variables de chaque gradient, le facteur variant étant grisé. L'optimisation a permis de réduire le temps de passage d'un échantillon de 59 minutes à 27 minutes, pour une séparation des acides gras allant du C8:0 au 24:6 n-3 (non détectés sur le chromatogramme de foie présenté).

2.2.2 Séparation, identification et quantification des acides gras par GCMS

La composition en acides gras des échantillons est réalisée à l'aide d'un GCMS Agilent 7890A (Agilent technologies, Santa Clara, CA) équipé d'une colonne capillaire polaire (BPX70, 60m x 0,25mm ; 0,25µm d'épaisseur de phase stationnaire à 70% de cyanopropylpolysilphène-siloxane, SGE, Villeneuve Saint Georges, France). Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit constant de 1,8 mL/min (vitesse = 36 cm/s). Le gradient de température de la colonne commence à 150°C et augmente progressivement de 4 °C/min jusqu'à 250°C, puis reste constant à 250°C pendant 10 min. Les spectres de masse sont obtenus avec un spectromètre Agilent Technologies (5975C). Le spectromètre fonctionne avec une source à impact électronique (énergie 70eV, température 203°C). Les données sont obtenues en mode balayage dans la gamme de masse 50-550 amu, avec le logiciel MSD Chemstation (Agilent E.02.02.14.31). L'identification des esters méthyliques d'acides gras est basée sur les temps de rétention obtenus d'un mélange de standards individuels commerciaux ayant une pureté >99%. Quand un pic d'intérêt potentiel est inconnu, le pic est identifié à l'aide de la base de données NIST (version 2.0). Tous les acides gras quantifiés ont un rapport signal/bruit > 10, les acides gras identifiés avec un rapport signal/bruit entre 3 et 10 sont notés comme « Trace ».

Le gradient utilisé est basé sur un précédent gradient mis en place au laboratoire qui a été optimisé pendant le projet pour gagner en temps de run et en résolution (**Figure 42**).

2.3 *Purification du DPA par chromatographie liquide*

2.3.1 Préparation des huiles et contrôle de l'oxydation

Avant sa purification par HPLC, l'huile de poisson a subi un prétraitement à -20°C pendant 12 h puis a été filtrée. De l'hydroxytoluène butyle (BHT) a été ajouté à l'huile avant d'être stockée à température ambiante pendant la purification par LC. Le taux de peroxydation des huiles de poisson et des huiles purifiées a été contrôlé par mesure du malondialdéhyde par le test des TBARS et par dosage du MDA par HPLC (Domijan et al. 2015). Le malondialdéhyde (TBARS) a été détecté dans les huiles de poisson enrichies à haute teneur en AGPI-LC n-3 et n'a pas été détecté après l'étape de congélation dans tous les échantillons testés.

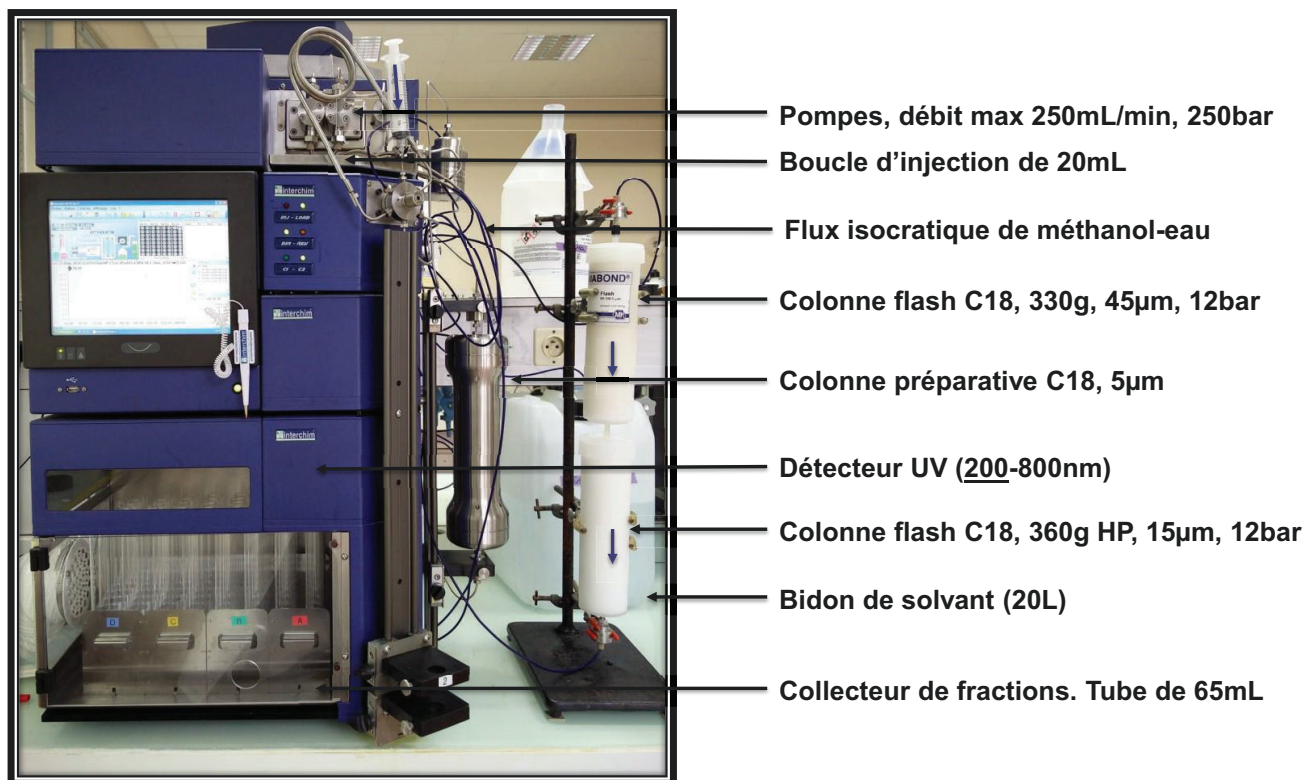


Figure 43. Présentation du système de purification par chromatographie liquide

Référence colonne	Fournisseur	Echelle	Granulométrie (µm)	Porosité (Å)	Aire surfacique (m ² /g)	Diamètre (mm)	Longueur (mm)	Carbone (%)	End-capping
PF-15C18HQ/35G	Interchim	Petite	15	100	400	27	135	20	Multi-step
PF-15C18HC/35G	Interchim	Petite	15	60	500	27	135	20	One-step
PF-15C18HP/35G	Interchim	Petite	15	60	680	27	135	21	One-step
PF-50C18HP/35G	Interchim	Petite	50	60	680	27	135	21	One-step
RS 330 C18 ec	MN ¹	Grande	45	60	500	60	200	14	One-step
PF-15C18 HP-F0330	Interchim	Grande	15	100	300	60	226	17	One-step
Upti-prep strategy C18-HQ	Interchim	Final	5	100	400	50	250	20	One-step

Tableau 5. Propriétés physiques des colonnes de chromatographie liquide utilisées

MN : Machery Nagel

2.3.1 Purification du DPA par chromatographie liquide

La purification du DPA à partir d'huiles de poissons enrichies en AGPI-LC n-3 a été effectuée par chromatographie liquide avec un système puriFlash®4250 (Interchim, Montluçon, France) en utilisant des colonnes de chromatographie flash en phase inverse C18 et une colonne préparative couplées avec un détecteur UV (202 nm) à température ambiante (**Figure 43**). L'investissement de l'appareil a été réalisé pour le projet de thèse. Les propriétés physiques des colonnes utilisées sont présentées dans le **Tableau 5**.

Pour déterminer la colonne flash utilisée, les séparations des EE d'acide gras par quatre colonnes flash en phase inverse C18 de petite échelle : PF-15C18HQ/35G, PF-15C18HC/35G, PF-15C18HP/35G, PF-50C18HP/35G (Interchim) ont été comparées en injectant 150 μL d'huile avec une élution isocratique de méthanol/eau. La séparation des AGPI-LC a d'abord été testée pour chaque colonne indépendamment puis en combinant deux colonnes l'une après l'autre. Des éluions isocratiques de méthanol/eau ont été testées de 90/10 à 99/1 (v/v) en faisant varier le pourcentage d'eau de 1 (soit 10 éluions différentes). Des débits allant de 10 à 30 mL/min et des volumes d'injections de 50 à 200 μL par pas de 20 μL ont aussi été testés.

Pour l'augmentation d'échelle, le choix des colonnes utilisées RS 330 C18 ec (Machery Nagel) et PF-15C18 HP-F0330 (Interchim) a été basé sur la disponibilité commerciale de colonne flash possédant des propriétés physiques similaires aux colonnes à petite échelle pour lesquelles la résolution entre le pic DPA et le pic DHA était la plus importante. Pour déterminer les conditions de purification du flash-LC pendant l'étape à grande échelle, différents volumes d'huile de poisson ont été injectés dans du méthanol à 10% (1, 5, 10, 15, 20 ml), différentes conditions d'élution méthanol/eau 90/10 - 99/1 (v/v) et de débit (de 100 à 160 mL / min) ont été testées. L'étape finale de purification a été réalisée avec une colonne préparative Upti-prep strategy C18-HQ (Interchim) pour séparer le DPA n-3 du DPA n-6 dont l'élution, le débit et le volume d'injection ont été optimisés.

2.3.2 Suivi de purification par chromatographie gazeuse

Pour chaque essai d'optimisation des conditions, la pureté et le rendement de chaque fraction (60mL, 30 secondes de run en moyenne) a été estimée par pesée de l'huile de chaque fraction après séchage à l'évaporateur rotatif et analyse des fractions par GC couplé à un détecteur à

	Huiles enrichies en AGPI-LC				Huiles			Abbats
	DHA80	DHA 70	1812TG	4020EE	Thon	Requin	Krill	Foie de bœuf
Saturés	0	6,2	27,5	4,9	27,5	22,7	30,8	43,2
Monoinsaturés	0,5	8,2	24,4	12,3	23,3	62,2	25,8	18,7
C16:2 n-4			1,1	0,1	0,3	0,1	0,5	
C16:3 n-4			1,2	0,1	0,2	0,1	0,2	
C16:4 n-3			0,1		0,1		0,1	
C16:4 n-1			2,2	0,2	0,2		0,9	
C18:2 n-6		0,4	1,4	0,3	2	0,8	2,2	9,1
C18:3 n-6		0,1	0,3		0,4	0,2	0,2	0,4
C18:3 n-3	0,1	0,1	0,9	0,1	0,6	0,3	1,3	0,2
C18:4 n-3		0,2	3,4	0,5	0,9	0,2	4,2	
C20:2 n-6	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2
C20:3 n-9								0,4
C20:3 n-6		0,1	0,2	0,2	0,1		0,1	7,7
C20:4 n-6 ARA	0,1	0,7	1,3	1,5	2,2	0,4	0,4	10
C20:3 n-3		0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	
C20:4 n-3	0,8	1	0,1	1,5	0,2	0,2	0,5	0,9
C20:5 n-3 EPA	2,8	4,1	19,7	45	8,5	4,5	20,1	1,4
C21:5 n-3		0,2	0,8	2	0,2	0,1	0,7	
C22:4 n-6	0,6	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3		2,1
C22:5 n-6 DPA	5,2	4,1	0,3	0,5	1,4	0,2		0,4
C22:5 n-3 DPA	5,4	5,1	2,1	6,6	1,5	1,5	0,5	4,8
C22:6 n-3 DHA	84,4	69	12,8	23,8	29,7	5,8	11,3	0,7

Tableau 6. Composition des sources alimentaires utilisées pour la purification du DPA

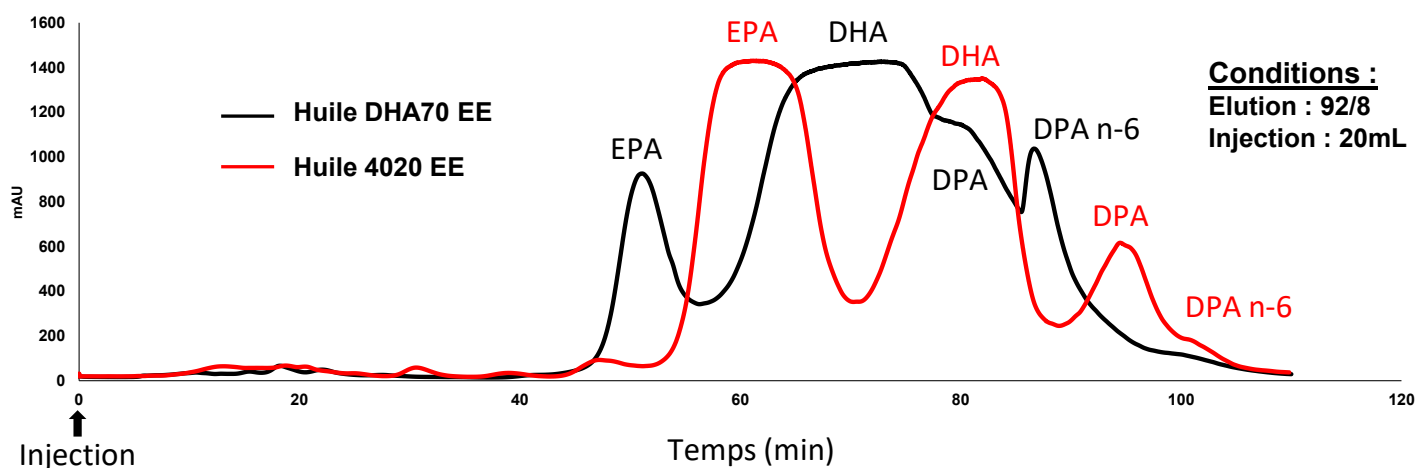


Figure 44. Optimisation de la source d'huile utilisé pour la purification du DPA

Chromatogramme de chromatographie liquide en détection UV (202nm). Les éluions sont réalisées à débit constant de 120 mL/min de méthanol/eau (v/v) sur un système de deux colonnes combinées RS 330 C18 ec puis PF-15C18 HP-F0330. L'utilisation pour la purification du DPA de l'huile 4020EE, plus riche en EPA, permet une meilleure séparation en un run du DPA. L'huile DHA70EE est utilisée pour l'optimisation des conditions de purification, très riche en DHA elle permet de se mettre dans les conditions de séparation les plus contraignantes.

ionisation de flamme (FID). Le suivi de purification est réalisé de façon similaire en regroupant plusieurs fractions dont les compositions en acides gras étaient similaires.

La composition en acides gras des échantillons d'EE pour le suivi de purification est déterminée grâce à un chromatographe (Agilent 6890N, BiosAnalytic) équipé d'un passeur d'échantillon, d'un injecteur split (ratio 1/10 à 260°C), d'une colonne capillaire polaire BPX70 et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) (débits : hydrogène (H₂) = 40 mL/min, air = 450 mL/min à 250°C). La température initiale de la colonne est de 195°C, augmente progressivement de 6°C/min jusqu'à 250°C et reste 1 min à 250°C. Le temps de run est de 10 min. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit constant de 1,3 mL/min (vitesse = 24 cm/s). Les temps de rétention de standards d'EE permettent d'identifier les EE d'acides gras des échantillons.

3 Résultats et discussion

3.1 Mise en place de la purification

3.1.1 Préparation, et sélection des sources alimentaires

Les huiles alimentaires étaient stockées à température ambiante sous azote mais contenaient des traces de peroxydation lipidique, détectées sous forme de malondialdéhyde. Une étape de cristallisation est tout d'abord réalisée pour éliminer une partie des acides gras saturés et monoinsaturés < 20 carbones présents dans l'huile de poisson ainsi que certains résidus et produits de la peroxydation lipidique qui s'agglomèrent à -20°C. Le malondialdéhyde (TBARS) n'a pas été détecté dans le surnageant des huiles après l'étape de cristallisation.

Les compositions en acides gras de plusieurs huiles de poissons (thon, requin, krill), d'huiles enrichies en AGPI-LC n-3 et de foie de veau, qui sont considérées comme les sources alimentaires majoritaires de DPA (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015), ont tout d'abord été analysées. La teneur en DPA de ces sources variait de 0,5 % dans l'huile de krill à 6,6 % des acides gras totaux dans l'huile de poisson enrichie en AGPI-LC n-3 Omegavie 4020EE® (Polaris) (**Tableau 6**). L'huile 4020EE a été sélectionnée pour effectuer la purification. Elle avait à la fois l'avantage d'être la source la plus riche en DPA et de contenir moins de DHA et de DPA n-6, qui sont les principaux acides gras co-éluant avec le DPA en phase inverse, en faveur d'une haute teneur en EPA qui est élué bien avant le DPA (**Figure 44**). À l'inverse, l'huile Omegavie DHA80® a été sélectionnée pour réaliser la mise en place des conditions

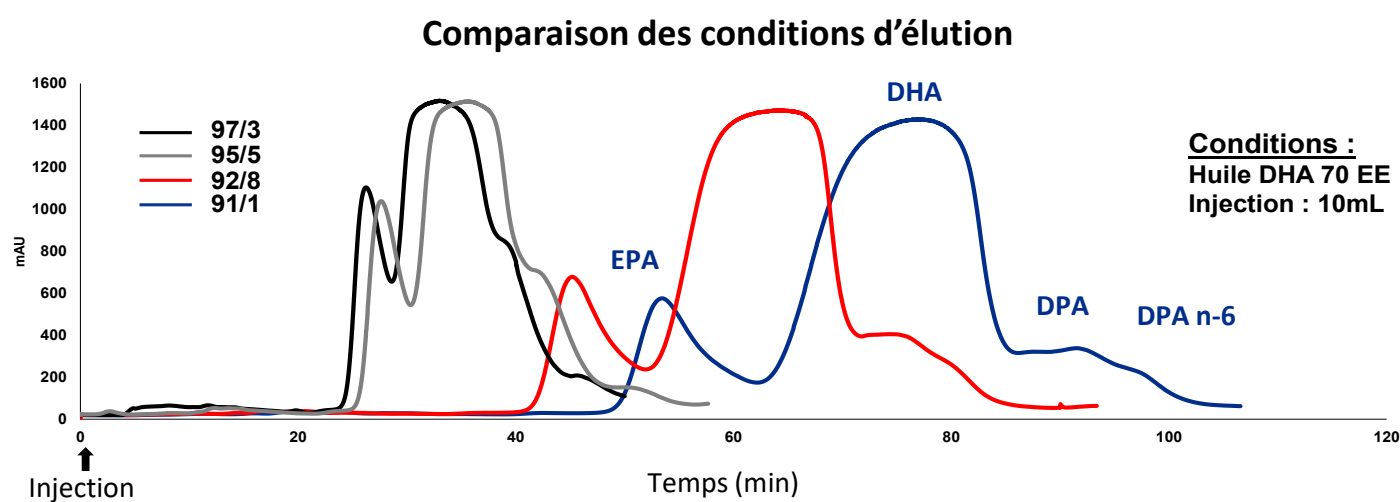
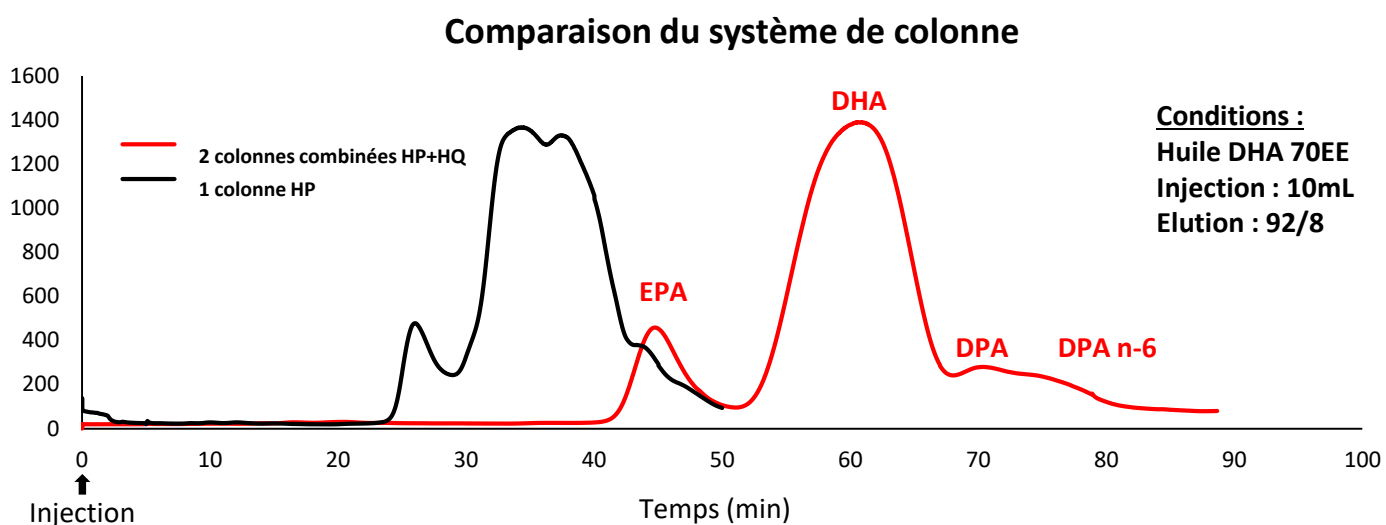


Figure 45. Optimisation des conditions d'élution et du système de colonnes flash

Chromatogramme de chromatographie liquide en détection UV (202nm). Toutes les éluions sont réalisées avec un débit de 120 mL/min avec un mix méthanol/eau (v/v).

d'optimisation de purification car elle est très riche en DHA. En effet, en phase inverse le DHA est élué avant le DPA. En situation de saturation des colonnes, nécessaire à la purification en grande quantité en laboratoire de recherche, le pic DHA s'allonge et est co-élué avec le pic DPA. L'utilisation de cette huile permet donc de se mettre dans les conditions résolutive du DPA les plus contraignantes.

3.1.2 Sélection des colonnes, augmentation d'échelle, optimisation de l'éluion

Parmi les trois colonnes de granulométrie 15 μ m testées pour la mise en place à petite échelle avec une même éluion en isocratique (méthanol/eau, 95/5, v/v), un volume d'injection de 150 μ L et un débit de 30 mL/min, la résolution évaluée entre les pics DHA et DPA de la colonne HP ($R_s=0,9$) était supérieure à celle de la colonne HQ ($R_s=0,7$) et encore supérieure à celle de la colonne HC ($R_s=0,5$). Le temps de rétention du DPA était similaire entre les colonnes HP et HQ (12 et 13 min). La meilleure résolution a été obtenue avec la colonne HP ($R_s=1,4$) et un gradient méthanol/eau allant de 10% d'eau en début de cycle à 7% d'eau en fin du cycle. Curieusement, l'augmentation de la granulométrie de la colonne HP de 15 à 50 μ m a augmenté le temps de rétention et diminué la résolution observée entre le pic DHA et le pic DPA, mais a aussi augmenté la pureté en DPA de certaines fractions collectées dans le pic DPA (données non présentées).

La possibilité de charge des colonnes de 30g (150 μ L d'huile) rendait impossible la purification de plusieurs dizaines de grammes de DPA en termes de temps à allouer. En conséquence, pour la mise à l'échelle nous avons choisi d'augmenter le format des colonnes et d'utiliser une colonne flash à haute performance (HP, 15 μ m, 330g) et une colonne flash de grande capacité de charge (RSC18, 45 μ m, 330g). En fonction des tests réalisés à petite échelle, nous avons originalement associé les deux colonnes flashs l'une au-dessus de l'autre, permettant d'augmenter la séparation et le taux de récupération (**Figure 43**). En effet, ce système nous a permis d'avoir une meilleure performance en injectant 20mL d'huile, qui correspond au volume maximal de la boucle d'injection. Par rapport à un système composé de la seule colonne HP, nous avons récupéré une fraction DPA 3,5 fois plus pure avec le système à colonnes combinées et nous avons augmenté le temps de run par 2 seulement, améliorant donc la performance horaire de la purification totale (**Figure 45**).

Parmi les dix gradients testés, nous avons sélectionné une éluion isocratique méthanol/eau (92/8 v/v) en fonction de la meilleure performance horaire et du rendement de purification du

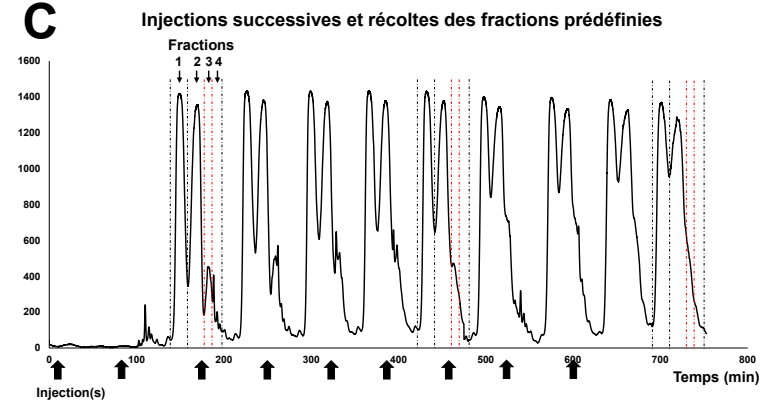
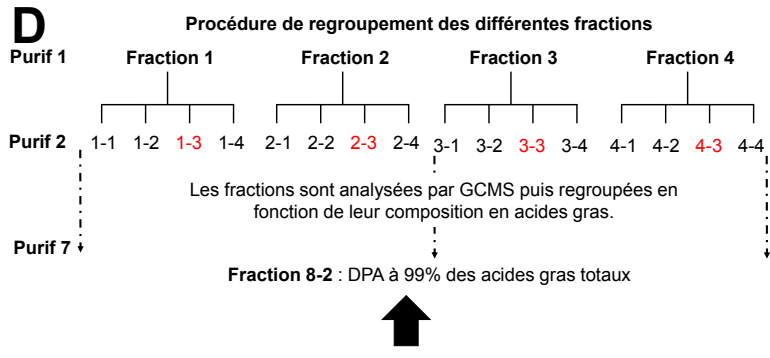
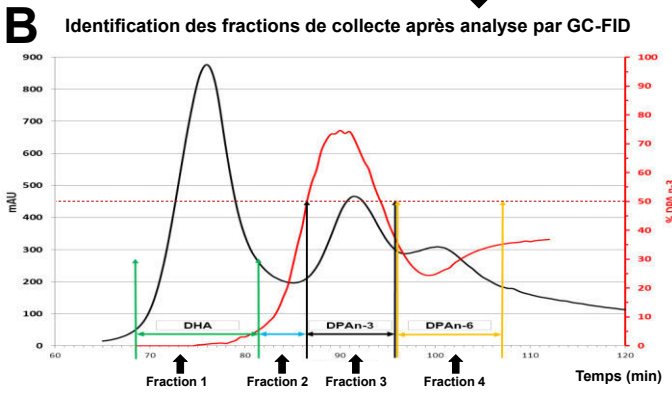
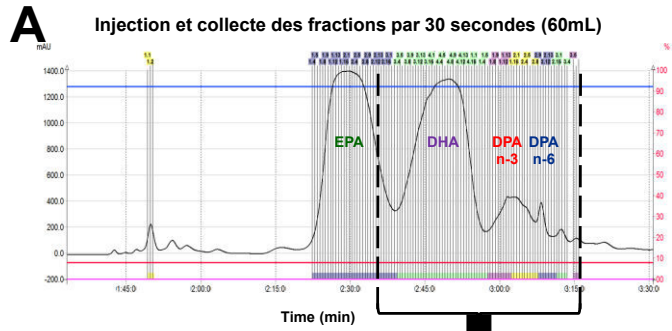


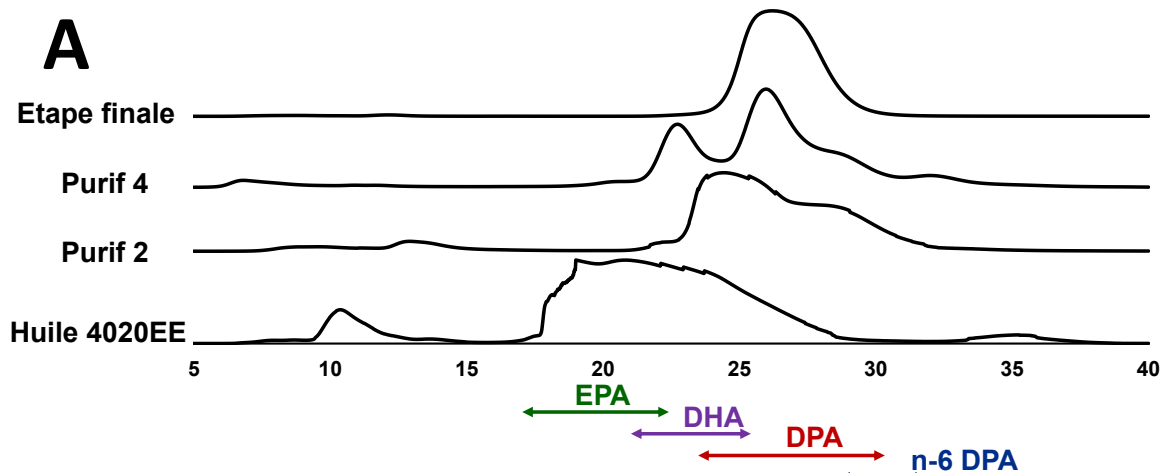
Figure 46. Méthode de boucle de purification du DPA par chromatographie liquide

DPA (**Figure 45**). Le rendement de purification du DPA variait de 91% à 95% pour un run unique. Alors que les essais montraient une meilleure séparation du DHA et du DPA en utilisant un gradient méthanol/eau, nous avons choisi de rester en élution isocratique pour ne pas avoir à rééquilibrer les colonnes avant chaque injection. De plus, le maintien d'une élution isocratique a aussi permis de réaliser des injections successives, avant que le run précédent ne soit terminé.

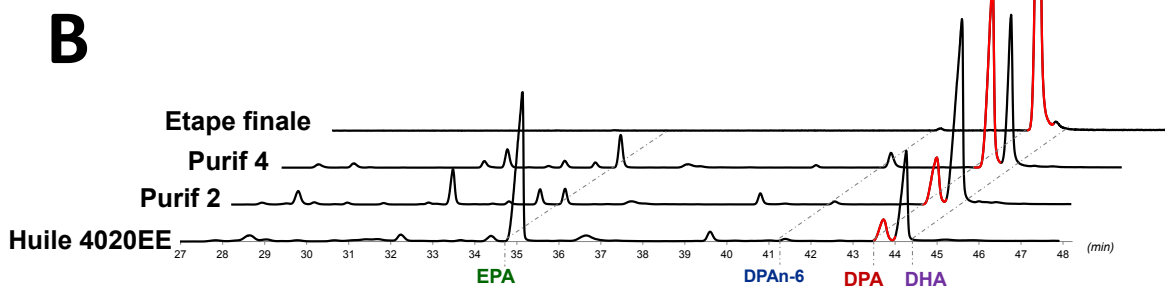
Parmi les volumes testés, la pureté des fractions DPA récupérées et donc la résolution entre les pics DPA et DHA ou DPA n-6 diminuaient rapidement à partir d'un volume de 5mL d'injection. Cependant, l'injection de 20mL de solution nous a permis d'obtenir une meilleure performance horaire que des volumes d'injection plus petits, même si des volumes d'injection plus petits entraînaient une meilleure résolution. L'augmentation du débit de 100 à 160 mL/min, en tant que volume optimal de la colonne HP, a graduellement augmentée la résolution et diminuée le temps de purification. Malheureusement, l'utilisation du système combiné à deux colonnes conduit à une augmentation de la pression du système. Nous avons donc dû choisir un débit de 120mL/min, correspondant au débit pour laquelle à la pression du système correspond à la pression maximale supportée par les colonnes.

3.2 Purification du DPA et des AGPI-LC n-3

La purification des DPA est effectuée selon une boucle de purification comme suit (**Figure 46**). Après équilibrage des colonnes, une première injection de 20 mL d'une solution d'huile 4020EE dans 10% de méthanol est réalisée dans le système de deux colonnes combinées et les fractions sont collectées en sortie de colonne toutes les 30 sec (60mL) (**Figure 46-A**). Chaque fraction est évaporée individuellement et pesée puis sa composition est analysée par GC pour obtenir la pureté du DPA en fonction du temps de rétention (**Figure 46-B**). Quatre fractions de collecte pour un run sont ainsi définies en fonction de la pureté du DPA des tubes collectés : 1) une fraction comprenant tous les tubes > 85% de DHA ; 2) une fraction intermédiaire entre le DHA et le DPA avec une pureté du DPA < 50% ; 3) une fraction avec une pureté du DPA >50% ; 4) une fraction intermédiaire entre DPA et DPA n-6 avec une pureté du DPA < 50%. Des injections successives d'huiles sont ensuite réalisées en collectant les 4 fractions prédéfinies en fonction des temps de collecte jusqu'à atteindre une quantité suffisante de DPA (**Figure 46-C**). Les fractions ainsi collectées sont évaporées, leur composition est analysée par GC-FID, puis les fractions sont réinjectées et la boucle de purification est répétée pour augmenter graduellement la pureté de la fraction DPA (**Figure 46-D**). Au bout de 3 boucles de purification,



Suivi de purification par chromatographie liquide



Suivi de purification par chromatographie gazeuse



C

% d'acides gras	DPA	DHA	DPA n-6	EPA	Rendement pour le DPA
Huile 4020EE	7	23	0,5	45	100
Purif 2	18	68	0,7	3	92
Purif 4	46	33	2	9	85
Final	98	1	0,5	0	76

Composition des fractions purifiées riches en DPA

Figure 47. Suivi de purification du DPA par chromatographie liquide et gazeuse

les différentes fractions collectées sont regroupées en fonction de la concordance de leurs compositions en acides gras avant d'être réinjectées et le processus est renouvelé jusqu'à obtenir du DPA > 98 % des acides gras totaux. La purification permet ainsi d'obtenir plusieurs dizaines de grammes de DPA >98% des acides gras totaux en augmentant progressivement la pureté des fractions (**Figure 47**).

Pour diminuer le temps de purification, les deux premiers cycles de purification ont été réalisés à température ambiante en mode isocratique avec un mélange méthanol/eau 99/1 (v/v) avec un débit constant de 120 mL/min. Cette élution ne permet pas une séparation optimale du DPA et du DHA mais permet de raccourcir le temps de run et de retirer la majorité de l'EPA (45% de l'huile 4020EE) et une partie du DHA. Même si cette étape ne permet pas de séparer fortement le DHA du DPA, comme le montre la faible augmentation de 7 à 18% du DPA dans la fraction purifiée après deux étapes de purification, cette étape permet de diminuer rapidement le volume d'huile à injecter à partir de la 3^{ème} boucle de purification. En effet, la limite de la méthode est le temps des runs compris entre 25 min et 45 minutes (en fonction de la composition du mélange d'élution et de la température ambiante) ainsi que le nombre de run à réaliser pour obtenir la quantité d'huile voulue, variable dépendante de la quantité d'huile à injecter. Les autres cycles de purification sont effectués avec un mélange d'élution optimisé de méthanol/eau 92/8 (v/v).

La séparation du DPA et du DPA n-6 avec le système de colonne flash n'est pas viable car leur co-élution était trop importante pour toutes les conditions testées. Ainsi, pour augmenter le rendement de purification, des volumes de 1mL de fraction terminale riche en DPA (60%) et en DPA n-6 (40%) ont été injectés dans une colonne préparatoire Interchrom avec une élution isocratique de méthanol/eau (95/5, v/v) et un débit de 120 mL/min. La fraction correspondant au pic du DPA a été collectée pour obtenir du DPA >99% de pureté qui est regroupé avec la fraction de DPA hautement purifié avec les colonnes flash. Finalement, le rendement de purification du DPA était de 76 %.

3.3 Discussion générale, limites et gestion des flux en laboratoire de recherche

Il a été choisi de purifier des EE d'acides gras car ces composés peuvent être consommés directement et s'intégrer facilement dans des régimes alimentaires semi-synthétiques, nécessaires pour la réalisation d'études *in vivo*. De plus, ces composés sont les principales sources disponibles commercialement pour les huiles de poisson enrichies en AGPI-LC n-3 et sont moins coûteuses que les acides gras ré-estérifiés. Depuis la mise en place de cette

méthodologie, de nouvelles sources alimentaires partiellement enrichies en DPA ont fait leur apparition sur le marché, que ce soit sous forme de compléments alimentaires (10%) ou sous forme de compléments alimentaires sous prescription, contenant majoritairement de l'EPA et du DPA avec peu de DHA (Maki et al. 2017). Cette dernière source pourrait être une base viable pour augmenter drastiquement le temps de purification selon notre méthode.

Même si nous avons montré que l'utilisation d'un gradient méthanol/eau permettait d'améliorer la résolution entre le DPA et le DHA à petite échelle, nous avons choisi de rester en mode isocratique pour permettre la méthode d'injection successive et ainsi économiser du temps de purification en considérant la masse totale de DPA purifié à atteindre. Le mélange de solvant méthanol/eau choisi est basé sur le mélange utilisé au laboratoire en HPLC analytique. Pour des considérations de coûts, nous n'avons pas utilisé d'acétonitrile dans notre mode d'élution ou une colonne de gel de silice imprégnée de nitrate d'argent comme décrit précédemment dans un brevet pour la séparation du DPA ("Brevet chinois" 2008).

Une des limites de cette méthode était due à la dégradation rapide des colonnes flash utilisées lors d'injections successives (**Figure 46-C**), associée à l'incapacité de cette technologie de colonne flash à être utilisée en mode inverse pour laver la phase de silice. Cependant, l'utilisation d'un système de colonnes couplées permet de préserver la deuxième colonne du système (15 μ m), la première colonne (45 μ m) retenant et accumulant les impuretés et présentant un coût plus faible.

Récemment, la purification du DPA par cristallisation à l'urée a été proposée à partir d'huile de thon (Mu et al. 2016). Cette méthode n'a pas permis de séparer le DPA du DHA et de l'EPA peu importe les conditions testées mais permettait de séparer le DPA du DPA n-6. L'utilisation de la cristallisation pour la purification de la fraction enrichie en DPA et en DPA n-6 pourrait être une perspective intéressante pour ne pas avoir à purifier cette fraction à l'aide d'une colonne préparative qui est une méthode coûteuse et longue.

Cette méthode pourrait être applicable par tout laboratoire de recherche équipé de hottes aspirantes, d'évaporateurs rotatifs et d'un système de chromatographie liquide préparatif. Néanmoins, ce protocole nécessite une mise en place logistique de gestion des flux associé au changement d'échelle par rapport à l'utilisation habituelle en laboratoire. En quelques chiffres, la purification du DPA nécessaire à l'étude et la mise en place de la méthodologie ont entraîné l'injection d'environ 1,8L d'huile enrichies en AGPI-LC n-3, l'utilisation d'environ 8500 L de méthanol, recyclé à hauteur de 70% par distillation pour réduire le coût de traitement des

déchets et quelques centaines de litres d'éthanol utilisé pour l'évaporation de l'eau contenue dans le mélange d'élution. De plus, le débit de 120 mL/min de l'appareil a nécessité des contenants de 20L pour les solvants, un investissement en verrerie associée (2-5L) ainsi qu'un contrôle des conditions d'hygiène et de sécurité associées aux vapeurs de solvant principalement.

4 Conclusion et perspectives

Cette étude a démontré que la purification d'EE de DPA en grande quantité et à haute pureté est possible par chromatographie liquide et applicable en laboratoire de recherche à partir de sources commerciales. Nous avons réussi à purifier plusieurs dizaines de grammes de DPA avec une pureté >99% pour le projet avec un rendement temporel d'environ 8g de DPA par semaine et un rendement de purification de 76%. Cette méthodologie a aussi permis de purifier de l'EE de DHA >99% et de l'EE d'EPA à hauteur de 25g par semaine.

Ces quantités sont suffisantes pour réaliser des études de suppléments chez le rongeur. La pureté des AGPI-LC obtenus est aussi suffisante pour servir de base à la synthèse chimique de certains composés comme les métabolites oxygénés des AGPI-LC n-3. Ainsi, nous avons pu purifier 25g d'EPA et de 25g de DHA pour l'Institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247) de Montpellier pour la synthèse ultérieure de métabolites (isoprostanes...). De grandes quantités d'acides gras monoinsaturés ont aussi été purifiés à partir de la méthodologie installée pour d'autres projets internes au laboratoire : environ 100g de chaque acide *cis*-vaccénique, acide *trans*-vaccénique et acide *cis*-palmitoléique.

A l'écriture de ce manuscrit, la mise en forme et l'écriture de ces résultats de purification est en cours en vue de la soumission d'un article original dans le *Journal of the American Oil Chemists' Society* (JAOCS).

PARTIE 2 :
EFFETS D'UNE SUPPLÉMENTATION EN DPA

1 Impact d'une supplémentation en DPA sur l'incorporation des acides gras dans les tissus. Influence du vecteur lipidique associé.

1.1 Contexte de l'étude

Le DPA est un intermédiaire entre l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) dans la voie de conversion des acides gras n-3 à partir de l'acide α -linoléique (ALA). Il pourrait être intéressant à la fois pour sa capacité à être converti en DHA et en EPA, ou pour ses effets physiologiques spécifiques en comparaison aux autres AGPI-LC n-3. Les effets du DPA ont principalement été observés *in vitro*, sûrement en raison de son coût élevé et de la non-disponibilité commerciale de DPA hautement purifié à l'échelle du dizaine de grammes (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015) que nous purifions au laboratoire par chromatographie liquide.

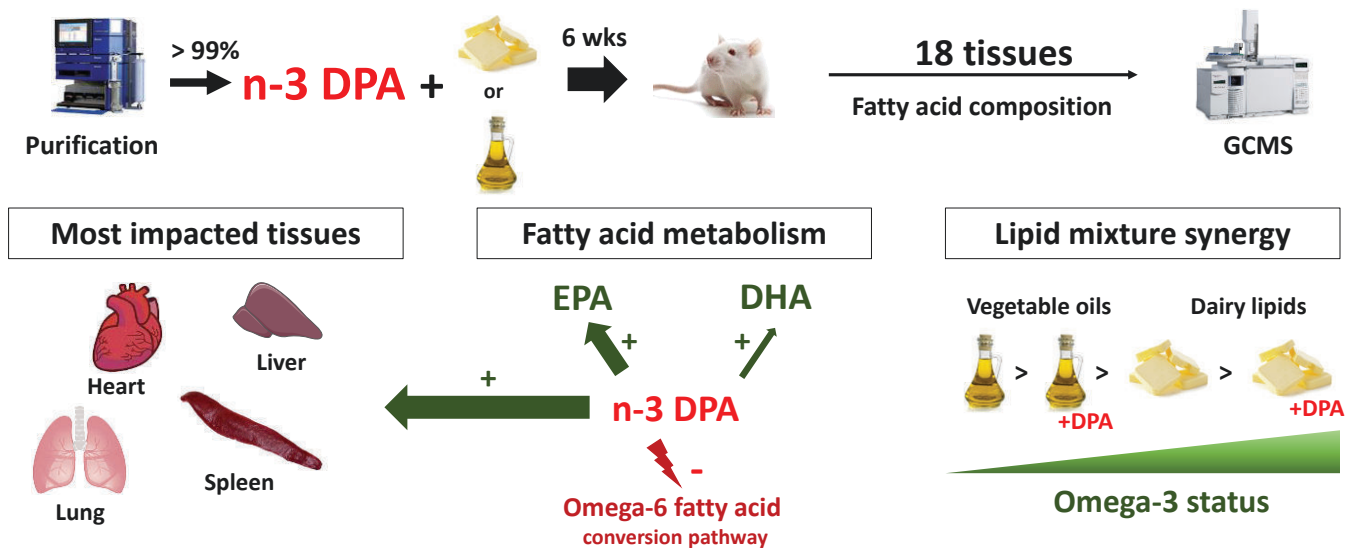
Les études concernant le DPA sont orientées par les effets métaboliques et physiologiques connus pour l'EPA et le DHA, de même que pour les tissus sur lesquels ces études se sont axées. Ainsi, alors que la distribution tissulaire de l'EPA et du DHA est assez bien documentée, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'incorporation tissulaire globale du DPA après sa supplémentation nutritionnelle (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015; Kaur, Guo, and Sinclair 2016). L'incorporation préférentielle du DPA dans certains tissus pourrait en effet orienter de futures études dans la recherche d'effets physiologiques ou métaboliques spécifiques de ces tissus. De plus, plusieurs études ont montré que la matrice lipidique dans lequel les AGPI-LC étaient inclus au cours de leur ingestion pouvaient influencer tant leur digestibilité que leur devenir métabolique. D'autres études ont aussi montré que l'incorporation partielle de matière grasse laitière (MGL) dans le régime pouvait augmenter le statut tissulaire en DPA dans différents modèles (Drouin, Catheline, Siquin, et al. 2018; Dinel et al. 2016; Gianni et al. 2018; B. Delplanque et al. 2013).

Dans ce contexte, les objectifs de cette expérimentation étaient d'étudier chez le rat :

- (i) L'incorporation tissulaire du DPA inclus dans le régime à dose nutritionnelle et son impact sur les compositions tissulaires en acides gras de la plupart des tissus.
- (ii) L'impact du vecteur lipidique dans lequel le DPA est inclus, ici un mélange de matières grasses végétales (MGV) ou un mélange de MGV et de MGL.

Cette étude est présentée sous la forme d'un article dans sa version soumise au journal *Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)* en mai 2018. Les « *Appendix* » sont présentées en Annexe II de ce manuscrit.

Graphical abstract



Abstract

Optimizing the status of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) appears to be one goal in human nutrition. We investigated the incorporation and metabolism of n-3 docosapentaenoic acid (n-3DPA) in different tissues, depending on the type of lipids used in the diets. Rats were fed a diet containing a mixture of vegetable oils or a mixture of dairy lipids and vegetable oils (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% n-3DPA, from weaning for three or six weeks. PUFA status were measured in 18 tissues by GC-MS. Following the supplementation, the n-3DPA content increased in half the studied tissues.

The n-3DPA was slightly converted into DHA and mostly retroconverted into EPA showing an increased content of these PUFA in some specific tissues but not in the brain. Indeed, the spleen, lung, heart, liver and bone marrow were the tissues most impacted by the supplementation. Moreover, the n-3DPA supplementation decreased n-6DPA and adrenic acid in impacted tissues. The DL diet increased global n-3PUFA status, and brain DHA status. Furthermore, the n-3DPA supplementation and DL had an additive effect on the increase of n-3PUFA contents in liver, heart, lung and spleen. We suggest that the presence of short- and medium-chain fatty acids and myristic acid in DL diets preserved the precursor α -linolenic acid from mitochondrial β -oxidation and increased desaturase activities. Furthermore, n-3DPA supplementation decreased plasma cholesterol provided by DL diets. In conclusion, n-3DPA supplementation differently affected PUFA metabolism depending on the studied tissues and the lipid mixture inside which it was included.

1.2 Article 1: The impact of n-3 docosapentaenoic acid supplementation on fatty acid composition in rats differs depending upon tissues and is influenced by the presence of dairy lipids in the diet

Gaetan Drouin¹, Etienne Guillocheau¹, Daniel Catheline¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest - INRA USC1378, Rennes F-35000, France

²Lactalis, R&D, Retiers F-35240, France

*** Correspondence:**

Corresponding Author

philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Keywords: docosapentaenoic acid n-3 DPA, polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism, dairy lipids, retroconversion, cholesterol, docosahexaenoic acid DHA.

Highlights

- The 0.5% n-3 DPA supplementation increased n-3 DPA, EPA and DHA tissue contents
- n-3 DPA supplementation mainly affected spleen, heart, lung and liver but not brain
- Dairy lipids increased PUFA status and DHA in the brain
- n-3 DPA supplementation and dairy lipids had additive effects in affected tissues

Abbreviations

ALA: α -linolenic acid; **DL:** blend of vegetable oils and dairy lipids; **DHA:** docosahexaenoic acid; **EE:** ethyl ester(s); **EPA:** eicosapentaenoic acid; **FA:** fatty acid(s); **fdr:** false discovery rate method; **GC-MS:** gas chromatography-mass spectrometry; **HDL-cholesterol:** high-density lipoprotein cholesterol; **LA:** linoleic acid; **n-3 DPA:** n-3 docosapentaenoic acid; **OPLS-DA:** orthogonal partial least-square discriminant analysis; **PUFA:** long-chain polyunsaturated fatty acid(s); **RBC:** red blood cells; **RDA:** redundancy analysis; **SMCFA:** short- and medium-chain fatty acid(s); **TLC:** thin-layer chromatography; **VO:** blend of vegetable oils.

1 Introduction

The n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) is a member of the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) essential family [1]. It is also an intermediate between eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the n-3 PUFA conversion pathway from α -linolenic acid (ALA) [2]. Many studies have shown the beneficial role of n-3 PUFA on the reduction of cardiovascular risk, metabolic syndrome, cancer and inflammation [3–5]. Unfortunately, the n-3 PUFA conversion pathway is limited in humans as in rodents [6,7]. Indeed, the conversion from ALA occurs through a sequence of desaturations and elongations including two enzymes considered as limiting steps: the Δ -6 desaturase and the elongase-2 [8]. Moreover, the main part of ALA intake is lower than the dietary recommendations in humans [9,10] and is deposited in adipose tissues or catabolized by mitochondrial β -oxidation [11]. Furthermore, direct supplementation with the different precursors of DHA, α -linolenic acid (C18:3 n-3, ALA) [6], stearidonic acid (C18:4 n-3) [12,13] or EPA [14], showed an increase in EPA and n-3 DPA whereas the DHA status remained stable or was only slightly increased.

n-3 DPA was described as a potential reservoir of n-3 PUFA [15]. Indeed, n-3 DPA could be interesting both for its potential capacity to be converted into DHA or retroconverted into EPA, and for its potential physiological effects [16–18]. This fatty acid (FA) has been poorly studied especially in vivo compared to EPA and DHA, probably due to its relative lack of commercial availability in high quantity and purity [19]. Consequently, the whole-body assimilation and FA metabolism of n-3 DPA has not been addressed yet.

Nutritional sources of n-3 DPA are mainly sea products, meat including giblets, n-3 enriched food and dairy products [20,21]. Thereby, the n-3 DPA intake is mainly in form of phospholipids and triglycerides in the food or in ethyl ester form in food supplement [22]. Moreover, n-3 PUFA bioavailability seems better when they are consumed in complex matrix than as supplement form [23]. This raises the question of the lipid mixture in which n-3 DPA is ingested to modulate its tissue delivery and metabolism after digestion and absorption.

Indeed, including dairy lipids in the diet increased the n-3 PUFA content, compared to a lipid mixture of vegetable oils, in different nutritional and physiological conditions [24–27]. More specifically, the DHA level was increased in the brain and the retina, while n-3 DPA was increased in some tissues like the heart, the liver and red blood cells (RBC). These authors also showed that n-3 DPA content in RBC, which increased with dairy lipids diet, could act as a predictor of brain DHA status [28]. Moreover, dairy products provide 9% of the n-3 DPA intake

in Canadian pregnant and lactating women and 6% in children [19]. However, the absolute intake remains low in Europe and is about 12-80mg/day in human adults and about 30-40mg/day in children [29]. Nevertheless, dairy lipids could be a good lipid mixture for the assimilation of dietary n-3 DPA and for increasing the n-3 PUFA status.

The present study contains two experiments. First, we studied the whole body assimilation and FA metabolism of the n-3 DPA after 3 weeks of dietary n-3 DPA supplementation as ethyl ester in the experiment 1. Secondly, we studied if dairy lipids could be a good vector to increase n-3 PUFA status, when n-3 DPA was supplemented for 6 weeks in the experiment 2.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Solvents and chemicals were obtained from Thermo Scientific (Élancourt, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) or from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Polaris (Quimper, France) graciously provided high n-3 PUFA marine oil (Omegavie® 4020 EE Qualitysilver®). Anhydrous milk fat and oleic sunflower oil were provided by Lactalis group (Retiers, France).

2.2 The n-3 ethyl docosapentaenoate (DPA-EE) purification

The n-3 DPA-EE > 99% was obtained from a high n-3 PUFA marine oil (Omegavie® 4020EE Qualitysilver®, Polaris). The purification was performed by liquid chromatography in 7 steps with a puriFlash®4250 system (Interchim, Montluçon, France) with a Chromabond® flash column (RS 330 C18 ec, porosity 45 µm, diameter 60 mm, length 200 mm, Macherey Nagel, Hoerd, France) followed by a Puriflash flash column (PF-15C18 HP-F0330, granulometry 15µm, diameter 60 mm, length 226 mm, Interchim) and coupled with an UV detector. The first elution was performed at room temperature in an isocratic mode of methanol/water (99/1, v/v) with a constant flow of 120 mL/min. Fraction corresponding to n-3 DPA-EE was collected and was evaporated with a rotatory evaporator, then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to control purity and efficiency. The collected fraction was reinjected with an elution of methanol/water (98/2, v/v) in the same conditions and this step was repeated 4 more times in order to gradually increase the purity in n-3 DPA-EE of the fraction of interest until 95%.

Table 1. Oil mixtures and fatty acid composition of the four experimental diets.

Diets	VO	VO + DPA	DL	DL +DPA
Oil mixture composing the lipid blends (g/100g)				
Butter fat			50.0	49.7
Palm oil	35.0	34.8		
High oleic sunflower	42.0	41.8	22.0	21.9
Sunflower oil			7.0	7.0
Rapeseed oil	23.0	22.9	21.0	20.9
DPA-EE ¹		0.5		0.5
Fatty acids composition of the lipid blends (%)				
Saturated FA	22.4	22.2	36.5	36.6
SMCFA ²			3.4	3.4
Branched chain FA ³			0.9	0.9
Even FA	21.8	21.7	32.4	32.2
C14:0	0.3	0.3	5.6	5.6
C16:0	18.2	18.1	18.2	18.1
C18:0	3.3	3.3	6.8	6.8
Odd FA			0.8	0.8
Monounsaturated FA	64.0	63.7	48.0	47.7
C18:1 n-9	61.8	61.8	43.1	42.9
Polyunsaturated FA	13.6	14.1	15.5	15.7
C18:2 n-6 (LA)	11.4	11.4	12.4	12.2
C18:3 n-3 (ALA)	2.2	2.2	2.3	2.3
C22:5 n-3 (DPA)		0.5	Tr ⁴	0.5
Others			0.7	0.7
LA/ALA ratio	5.2	5.2	5.4	5.3

¹ Ethyl esters purified by liquid chromatography; ² Short and Medium Chain Fatty Acids (C4:0 to C12:0); ³ iso C16:0, iso and ante C17:0; ⁴ Tr: Trace. FA: fatty acids.

This fraction was injected in the same conditions in an Interchrom preparative column (Uptisphere strategy C18-HQ, granulometry 5 μ m, diameter 50 mm, length 250 mm, Interchim) with an isocratic mode of methanol/water (98/2, v/v). The fraction corresponding to the n-3 DPA-EE peak has been collected and pooled to obtain n-3 DPA-EE >99% purity (see Appendix A, Figure 1). The n-3 DPA-EE possible peroxidation was controlled by TBARS test on n-3 DPA-EE oil [30]. Malondialdehyde (TBARS) was not detected in the n-3 DPA-EE final purified fraction.

2.3 Diets

Four different lipid blends were prepared from a combination of natural fat sources (Table 1). Lipid blends were composed of a blend of vegetable oils (VO) or of a blend of vegetable oils and dairy lipids (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% n-3 DPA (VO+DPA and DL+DPA). Lipid blends were made with particular attention to ALA and linoleic acid (LA) levels, with a LA/ALA ratio around 5 as nutritionally recommended in humans in France [31]. The addition of short- and medium-chain fatty acids (SMCFA) with the introduction of dairy lipids was adjusted with oleic acid [32]. FA composition of lipid blends composing the diets were analyzed by GC-MS after Folch extraction of diets and derivation as described above in 2.5 [33]. Total sterols were measured in DL and VL blends by Liebermann method to estimate the cholesterol intake of animals as described previously [34].

All the diet contained 10% (w/w, 21% of total energy) of lipid blend and 90% (w/w) of a lipid-free base. The lipid-free base was prepared at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). The lipid-free base contained for 1 kg of diet: 220.0 g of HCl-casein, 1.5 g of DL-methionine, 402.3 g of corn starch, 201.2 g of sucrose, 20.0 g of cellulose, 45.0 g of mineral mix 102 and 10.0 g of vitamin mix 102. Then, 100.0 g of fat / kg of diet from the lipid blends were added in our laboratory.

To prepare the rat food, the lipid-free base and the lipid blend were mixed then sifted twice, 13% water was added (w/w), then the mixture was homogenized and shaped as croquettes. The rat foods were sealed in an airtight package and frozen at -20°C, as all diets were prepared at the beginning of the study. During the experiments, rat foods were thawed at +4°C 24h before being given to animals. Malondialdehyde was not detected in diets at the beginning and at the end of the study. The diets were isoenergetic and isolipidic.

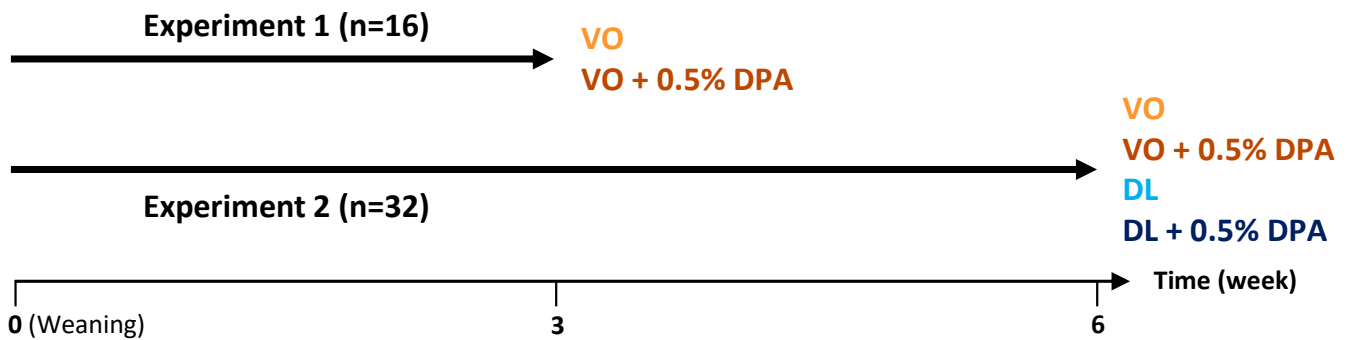


Figure 1. Experimental procedures of the experiments 1 and 2. In experiment 1, male rats received for 3 weeks from weaning a control diet with a lipid source composed with a vegetable oil blend not supplemented (VO) or supplemented with 0.5% n-3 docosapentaenoic acid (VO+DPA). In experiment 2, rats fed for 6 weeks from weaning with the same VO and VO+DPA diets than in experiment 1 or with diet containing a lipid source composed with a vegetable oil blend and dairy lipids not supplemented (DL) or supplemented with 0.5% n-3 DPA (DL+DPA).

2.4 Animals

This study is composed of two experiments (Figure 1). In the experiment 1, 32 rats (n=8/group) were fed from weaning for 3 weeks with VO diet supplemented or not supplemented with 0.5% n-3 DPA (VO+DPA). In the experiment 2, 32 rats (n=8/group) were fed from weaning for 6 weeks with VO or DL diets not supplemented or supplemented with 0.5% n-3 DPA (VO+DPA and DL+DPA). For both experiments, Sprague Dawley rats (mean body weight 50±1g, 3 weeks old at beginning of the experiment) (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly assigned into the groups and were housed four animals by cage on a 12h light-dark cycle and maintained at 21°C±2°C with free access to water and food. Body weight, food and water intakes were measured two times a week. All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for Animal Care and Use (2010/63/CEE). The experimental procedures (n° APAFIS#1389-2015080411586889 v4 and n°APAFIS#5139-201605121200996 v1) were approved by the French Animal Care Committee (Rennes, approval number A3523838) and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation, in compliance with recommendations of the 2013–118 French directive for animal experimentation.

At the end of the experiments, fasted rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodic pentobarbital (140 mg/kg of body weight) (Euthasol Vet, France). Blood samples were collected by cardiac punctures into lithium heparin-treated vacutainers (Dominique Dutscher, Brumath, France) and plasma was separated from blood cells by centrifugation (3000 g, 20 min, room T°) and stored at -80°C. After removing the peripheral blood mononucleated cells layer, red blood cells (RBC) were mixed, weighted and stored at +4°C before lipid extraction [35]. Whole eyes were removed then stored in 4% formaldehyde in PBS at 4°C during minimum 1 week before the dissection of retina. Tissues were removed, washed with PBS, weighted and around 200 mg of each tissue were stored in dimethoxymethane/methanol (4/1, v/v) at -20°C. The rest of the organs were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C [36]. In the experiment 1, 18 tissues were collected and analyzed to realize the whole-body impact of n-3 DPA on fatty acid composition in tissue: bone marrow, brain, epididymal adipose tissue, heart, jejunum, kidney, liver, lung, muscle, pancreas, plasma, red blood cells, retina, subcutaneous adipose tissue, skin, spleen, stomach and testis. In the experiment 2, the tissues most impacted by n-3 DPA supplementation were collected as well as the brain. In the experiment 2, we also studied the FA composition of the RBC and the brain, particularly interesting for the potential impact of dairy lipids on these tissues, as previously described [28].

2.5 Lipid extraction and fatty acid composition

Lipids were extracted twice from tissues with 20 volumes dimethoxymethane/methanol (4/1, v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax [37]. RBC lipid membranes and plasma were extracted twice with hexane/isopropanol (3/2, v/v) after acidification with HCL 3M, as previously described [27]. Brain phospholipids were separated from total lipids on preparative thin-layer chromatography (TLC) using silica gel H (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) plates impregnated with a mixture of hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/1, v/v/v). Total lipids and phospholipids were saponified by 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol at 70°C for 30 min and then methylated with 1 mL of BF₃ (12% in methanol) at 70°C for 30 min. Fatty acid methyl esters were extracted twice with pentane, washed twice with NaCl 0.9% and were taken up in hexane. Fatty acid methyl esters from brain phospholipids were purified by another step of TLC with a mixture of hexane/diethyl ether (80/20, v/v), extracted a first time by a mixture of methanol/hexane/NaCl 0.9% (3/4/3, v/v/v), then extracted a second time with 4 volumes of hexane, washed with NaCl 0.9% and were taken up in hexane [38].

GC-MS analysis was performed using an Agilent 7890A (Agilent technologies, Santa Clara, CA) with a bonded silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm; SGE, Melbourne, Australia) containing a polar stationary phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (0.25 μm film thickness). Helium was used as carrier gas (average velocity 36 cm/s). The column temperature program started at 150°C and gradually increased at 4°C/min to 250°C, and held at 250°C for 10 min. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 5975C inert MSD with triple axis detector. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in the full scan mode with a mass range of m/z 50–550 atomic mass units (amu), using the MSD Chemstation software E.02.02.14.31. Identification of the FA methyl esters was based upon retention times obtained for methyl ester of authentic standards, when available. The National Institute of Standards and Technology database v2.0 was also sometimes used to identify unknown FA. All identified FA with a signal / noise > 10 were considered in the analysis of the proportions, FA identified with a signal / noise between 3 and 10 were marked as trace.

The retroconversion of n-3 DPA into EPA in the liver was estimated as percentage using the following formula: $((\Delta\text{EPA}_{(\text{Supplemented-Control})}) / (\Delta\text{EPA} + \text{DPA})_{(\text{Supplemented-Control})}) \times 100$.

2.6 Biochemical parameters of plasma

In the experiment 2, total cholesterol (cholesterol CHOL, Randox Laboratories, Crumlin, UK), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) (HDL-CHOL, Randox Laboratories) and free-cholesterol (free-CHOL-FS, DiaSys, Holzheim, Germany) concentrations were assayed with commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions on heparinized plasma in triplicate. Non-HDL cholesterol was calculated by the difference between total cholesterol and HDL-cholesterol. Cholesterol esters concentration was calculated by the difference between total cholesterol and free-cholesterol concentrations.

2.7 Statistical analysis

The aim of the experiment 1 was to study the impact of n-3 DPA supplementation during 3 weeks on PUFA metabolism. FA composition of tissues of VO and VO+DPA groups were compared by adjusted multiple Student t-test ($\alpha=0.05$). Then, to identify the most impacted tissues by the DPA supplementation, orthogonal least-square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed [39]. As FA compositions were handled as the percentage of total identified FA, the data were first centered log-ratio transformed. Then, the data were centered and scaled, because a wide range of values for FA proportions were found [40].

The model was validated by cross-validation ANOVA ($\alpha=0.05$). The significant variables were selected using a variable importance in projection coefficient >1 and the jackknife CI error bars on S-plot [41]. To rank the most impacted tissues, we used a score based on the number of significant variables for each tissue and on the variable coefficient of the first component.

The aim of the experiment 2 was to compare the combined effect of n-3 DPA supplementation with two lipid mixtures after 6 weeks of diet. FA composition of tissues, plasma assays and organs weights of VO, VO+DPA, DL and DL+DPA groups were compared with 2-way ANOVA. The major aims were to study the effects of DPA supplementation (VO and DL vs VO+DPA and DL+DPA) and lipid mixture (VO and VO+DPA vs DL and DL+DPA) on FA composition of tissues, and the interaction between both effects. Type-II ANOVA was used when the interaction was non-significant and type-III ANOVA was used when the interaction was significant. Body weight and food consumption were analyzed with the same model for repeated measures, whenever the model was significant, multiple comparisons according to Tukey procedure adjusted with false discovery rate method (fdr) was performed. Prior to analysis, normality of both the data the residuals were graphically assessed and

homoscedasticity was supposed verified. For all procedures, p-value <0.05 was considered as significant. All data were reported as mean \pm SEM.

Redundancy analysis (RDA) was used in the experiment 2 to study the global interaction between the n-3 DPA supplementation and the lipid mixture. RDA corresponds to ANOVA in a multivariate framework [42]. Constraints (ie factors) were the n-3 DPA supplementation effect, the lipid mixture effect and the interaction between both factors. RDA was performed on FA composition of the four most impacted tissues by the n-3 DPA supplementation in the experiment 1. As FA compositions were presented as the percentage of total detected FA, and that the FA proportion took place in a large range of values, the data were transformed by centering log-ratio, then by centering-scaling [40]. A permutation test was used to assess significance of all constraints. This test was followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with *fdr* method to assess the significance between the 4 diets. FA explaining most of the variability between the two effects were chosen by considering the test of Pearson correlation coefficient between FA data and individual scores, and a Pearson correlation coefficient $R^2 > 0.5$ [43].

Univariate analysis and redundancy analysis were realized using R software v3.4.2 and R packages *car* v2.1.5, *RVAideMemoire* v0.9.68, *vegan* v2.4.4 and *chemometrics* v0.1. OPLS-DA was performed with *Simca* software v14.1 (Umetrics, Umeå, Sweden).

3 Results

3.1 Experiment 1 - Impact of n-3 DPA supplementation on fatty acid composition in tissues after 3 weeks of diet

The aim of the experiment 1 was to study the whole-body assimilation and FA metabolism of the n-3 DPA after 3 weeks of dietary n-3 DPA supplementation. This experiment focused on 18 tissues: bone marrow, brain, epididymal adipose tissue, heart, jejunum, kidney, liver, lung, muscle, pancreas, plasma, red blood cells (RBC), retina, subcutaneous adipose tissue, skin, spleen, stomach and testis. The complete FA compositions of tissues from experiment 1 are presented in Appendix B, Table 1-6. At the end of the experiment 1, body weight gain, organ weight and food intake did not differ significantly between groups (see Appendix A, Figure 2A-B and Table 1-A).

3.1.1 *The n-3 DPA supplementation increased n-3 PUFA and decreased n-6 PUFA (Figure 2)*

Following the n-3 DPA supplementation, the n-3 DPA content ranked from 0.1% in epididymal adipose tissue to 2.6% in red blood cells and it was not detected in testis and subcutaneous adipose tissue (Figure 2). More precisely, the proportion of n-3 DPA increased significantly in the heart (2.1-fold), the lung (1.8-fold), the gut (1.8-fold), the spleen (1.6-fold), the bone marrow (1.5-fold), the RBC (1.4-fold), the kidney (1.3-fold) and the skin (1.5-fold) in the DPA-supplemented group. The n-3 DPA content tended to increase in the stomach (2.0-fold, $p=0.072$) and the pancreas (1.2-fold, $p=0.083$). In the epididymal adipose tissue, the n-3 DPA was detected only in the n-3 DPA supplemented group. By contrast, n-3 DPA levels were not affected by DPA supplementation in liver, plasma, brain, retina and muscle.

Following the n-3 DPA supplementation, the DHA content in studied tissues ranked from 0.2% in skin to 15.5% in brain and was not detected in adipose tissues. More precisely, the proportion of DHA increased significantly in the spleen (1.2-fold) and the lung (1.2-fold). The DHA content tended to increase in the bone marrow (1.6-fold, $p=0.099$) and the stomach (1.5-fold, $p=0.069$). DHA levels were similar in both groups in the other tissues.

Following the n-3 DPA supplementation, the EPA content in studied tissues ranked from 0.1% in the bone marrow to 1.4% in the pancreas. More precisely, the proportion of EPA increased significantly in the liver (2.0-fold), the plasma (2.0-fold), the spleen (1.5-fold), the lung (1.3-fold) and the stomach (2.6-fold). The EPA content tended to increase in the bone marrow (1.1-fold, $p=0.074$) and the pancreas (1.4-fold, $p=0.096$). The estimated retroconversion of DPA into EPA in the liver was $46.6 \pm 7.9\%$. EPA was not detected in the brain, the retina, the skin and adipose tissues.

Concerning n-6 PUFA, the ratio of the n-6 PUFA (sum of C18:3 n-6, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C22:4 n-6 and C22:5 n-6) divided by the n-6 PUFA precursor (C18:2 n-6) was used to estimate the n-6 PUFA conversion pathway rate (Figure 3). Following the n-3 DPA supplementation, the ratio decreased significantly in the RBC (1.3-fold), the pancreas (1.3-fold), the liver (1.2-fold), the kidney (1.2-fold) and the brain (1.1-fold).

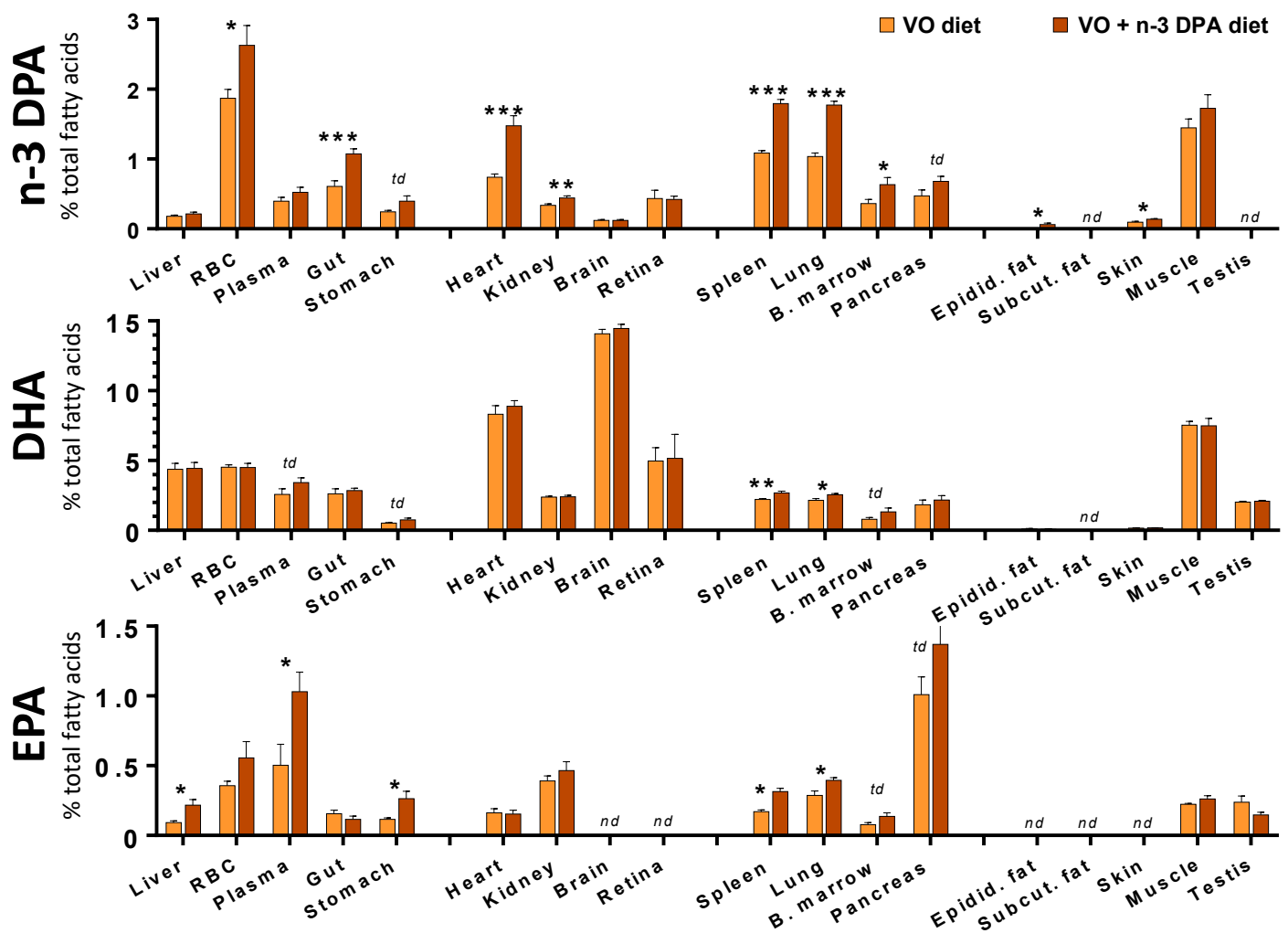


Figure 2. Fatty acid composition of tissues in n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA), docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) of rats fed with a control VO diet (white) or a 0,5% n-3 DPA-supplemented VO diet (black) during 3 weeks. Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by multiple Student t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; td $0,1 < p < 0,05$). Complete fatty acids profiles of all tissues are available in Appendix B, Table 1-6. nd: not detected.

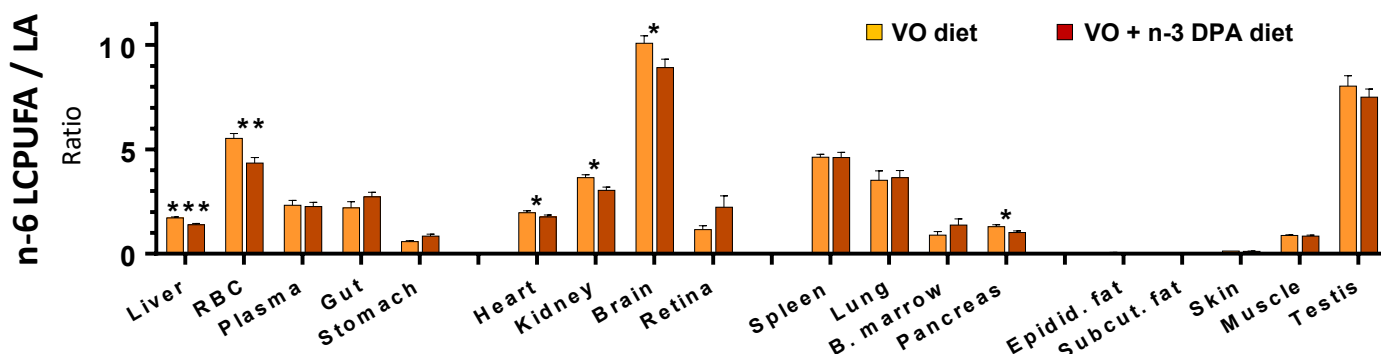


Figure 3. Ratio n-6 LCPUFA / LA from fatty acid composition of tissues of rats fed with a control VO diet (white) or a 0,5% n-3 DPA-supplemented VO diet (black) during 3 weeks. Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by multiple Student t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Complete fatty acids profiles of all tissues are available in Appendix B, Table 1-6.

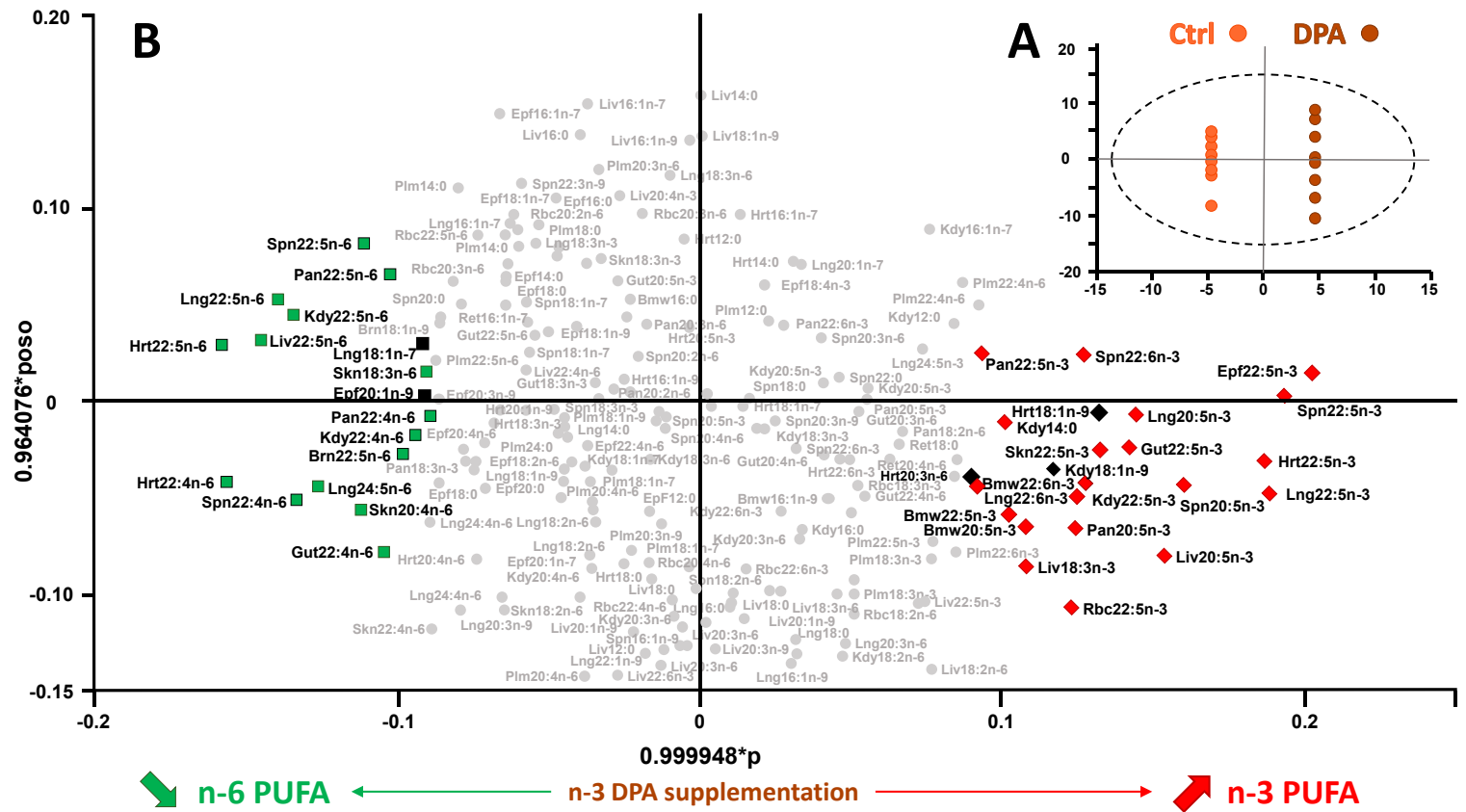


Figure 4. OPLS-DA model of all fatty acids of the studied tissues of rats fed with a control diet or a 0,5% n-3 DPA-supplemented diet for 3 weeks. **(A)** OPLS-DA score plot shows groups discrimination according to the diet (CV-ANOVA, $p < 0.05$). The R^2 explaining class variance were 0.986 and the Q^2 explaining class prediction were 0.776. **(B)** Loadings plot show fatty acid variations. Each point represents one fatty acid from one tissue. At the left part of the plot, fatty acids decreasing, and at the right of the plot, fatty acids increasing with the DPA supplemented diet compared to the control diet. Significant variables were colored in black, as determined with variable importance in projection coefficient > 1 and the jackknife CI error bars. For more clarity, some non-significant labels were randomly removed from the loadings plot, but all fatty acids presented in Appendix B, Tables 1-6 were included in the model. Bmw: bone marrow; Brn: brain; Epf: epididymal adipose tissue; Hrt: heart; Kdy: kidney; Liv: liver; Lng: lung; Mus: muscle; Pan: pancreas; Plm: plasma; Rbc: red blood cells; Ret: retina; Scf: subcutaneous adipose tissue; Skn: skin; Spn: spleen; Stc: stomach.

3.1.2 Global and comparative impact of n-3 DPA supplementation on tissues (Figure 4)

To further underline the differences in tissue FA composition induced by n-3 DPA supplementation, an OPLS-DA was performed (Figure 4). All identified FA were taken into account in the model which expressed 40.7% of the total variance R^2X (CV-ANOVA, $p=0.047$).

We were first interested in the comparison between tissues. When considering all FA contents, the tissues the most impacted by the n-3 DPA supplementation were ranked as follows: spleen > lung > heart > liver > skin > gut > kidney > pancreas > bone marrow > epididymal adipose tissue > RBC > brain. When considering n-3 PUFA content, the tissues most impacted by the n-3 DPA supplementation were ranked as follows: spleen > lung > heart > liver > bone marrow > epididymal fat > skin > kidney > RBC >>> brain. When considering n-6 PUFA content, the tissues most impacted by the n-3 DPA supplementation were ranked as follows: heart > lung > spleen > liver > pancreas > skin > kidney > gut > brain.

Then we hierarchized the different FA contents affected by n-3 DPA supplementation. As a general result, n-3 DPA supplementation significantly increased only n-3 PUFA and decreased only n-6 PUFA. More precisely, among the n-3 PUFA, n-3 DPA > EPA > DHA > ALA were positively impacted by n-3 DPA supplementation. Among the n-6 PUFA, n-6 DPA > C22:4 n-6 > C20:4 n-6 > C18:2 n-6 were negatively impacted by n-3 DPA supplementation.

3.2 Experiment 2 – Combined effects of dairy lipid mixture (DL) and n-3 DPA supplementation after 6 weeks of diet compared to a vegetable oils mixture (VO)

The major aim of the experiment 2 was to study the potential impact of two lipid mixtures (lipid mixture effect: VO and VO+DPA vs DL and DL+DPA) not supplemented or supplemented with DPA (DPA effect: VO and DL vs VO+DPA and DL+DPA) on PUFA metabolism. Moreover, we studied if the impact of n-3 DPA supplementation was affected by the lipid mixture (interaction between DPA effect and lipid mixture effect).

We focused on the FA composition of the liver as the major metabolic organ, the heart, the spleen and the lung as the most impacted tissues by the n-3 DPA supplementation in the experiment 1. We also studied the FA composition of the RBC and the brain, particularly interesting for the potential impact of dairy lipids on these tissues, as previously described [28]. The tables of tissues FA composition of all identified FA are presented in Appendix C, Tables 1-6. At the end of the experiment 2, body weight gain, organ weight and food intake did not differ significantly between groups (see Appendix A, Figure 2-C, D and Table 1-B).

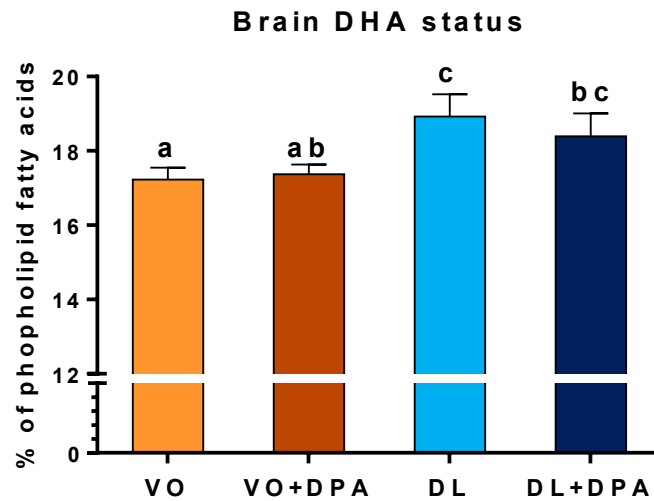


Figure 5. DHA proportion in brain phospholipids of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA and DL+DPA). Values are mean \pm SEM. Different superscript characters indicate significant differences for Tukey post-hoc test for multiple comparisons ($p < 0.05$).

3.2.1 Dairy lipids improved n-3 PUFA status in tissues

We first considered the effect of the lipid mixture on n-3 PUFA metabolism (Table 2). The n-3 DPA content was higher in liver, heart, lung, spleen and RBC of rats fed DL diets than in rats fed VO diets. The DHA content of rats fed DL diets was higher in the lung only, as well as the total n-3 PUFA content. The EPA content of rats fed DL diets was higher in the liver, the heart and the lung. The ALA content of rats fed DL diets increased in the liver and the RBC compared to VO diets. In brain phospholipids, the DHA content increased in the DL group compared to both VO and VO+DPA groups (Figure 5). The n-3 DPA supplementation did not increase the n-3 PUFA status in the brain (see Appendix C, Table 6 for brain complete FA profile).

We then considered the effect of the lipid mixture on n-6 PUFA metabolism (Table 3). The total n-6 PUFA increased in the heart, the lung and the RBC. The n-6 DPA content of rats fed DL diets decreased in the heart and the spleen. The adrenic acid (C22:4 n-6) content of rats fed DL diets decreased in the liver, while it increased in the lung. The arachidonic acid (C20:4 n-6) content of rats fed DL diets decreased in the RBC while it increased in the lung. The LA content of rats fed DL diets increased in the liver, the heart, the spleen and the RBC.

3.2.2 The n-3 DPA supplementation increased n-3 PUFA and decreased n-6 PUFA

We first considered the effect of the n-3 DPA supplementation on n-3 PUFA metabolism (Table 2). The n-3 DPA content as well as the total n-3 PUFA increased in all studied tissues after the n-3 DPA supplementation. The DHA content increased in the heart, the lung and the RBC. The EPA content increased in the liver only. The estimated retroconversion of DPA into EPA in the liver was $35.1 \pm 6.4\%$ and did not differ between the four groups. The ALA content increased in the spleen and the RBC.

We then considered the effect of the n-3 DPA supplementation on n-6 PUFA metabolism (Table 3). The total n-6 PUFA content decreased only in the heart after the n-3 DPA supplementation. The n-6 DPA content decreased in the liver, the heart and the spleen. The adrenic acid (C22:4n-6) content decreased in the heart and the spleen. The arachidonic acid content decreased only in the spleen. The LA content decreased in the liver and the heart of n-3 DPA supplemented rats.

Table 2. n-3 PUFA tissue contents

	FA %	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM
Liver	ALA	0.48 ^a ±0.07	0.50 ^a ±0.07	0.63 ^{ab} ±0.06	0.69 ^b ±0.05		**
	EPA	0.14 ^A ±0.01	0.16 ^A ±0.02	0.33 ^B ±0.04	0.67 ^C ±0.07	***	**
	n-3 DPA	0.37 ^A ±0.02	0.44 ^A ±0.02	0.47 ^A ±0.02	0.96 ^B ±0.07	***	*
	DHA	6.11 ±0.29	6.69 ±0.52	5.86 ±0.21	6.53 ±0.53		
	Σ n-3	7.10^a ±0.28	7.78^{ab} ±0.54	7.29^a ±0.22	8.85^b ±0.55	*	
Heart	ALA	0.25 ±0.03	0.34 ±0.07	0.35 ±0.04	0.33 ±0.06		
	EPA	0.10 ^A ±0.02	0.13 ^{AB} ±0.01	0.19 ^C ±0.01	0.16 ^{BC} ±0.02		***
	n-3 DPA	1.38 ^a ±0.15	2.36 ^c ±0.08	1.83 ^b ±0.08	2.51 ^c ±0.26	***	*
	DHA	11.93 ^a ±0.47	13.09 ^b ±0.24	12.43 ^{ab} ±0.40	13.24 ^b ±0.29	*	
	Σ n-3	13.66^a ±0.50	15.92^{bc} ±0.26	14.79^{ab} ±0.47	16.24^c ±0.52	***	
Lung	ALA	0.34 ±0.03	0.26 ±0.04	0.32 ±0.03	0.32 ±0.05		
	EPA	0.30 ^a ±0.04	0.34 ^{ab} ±0.04	0.42 ^b ±0.03	0.37 ^{ab} ±0.03		*
	n-3 DPA	0.61 ^a ±0.06	1.26 ^b ±0.12	1.38 ^b ±0.04	1.80 ^c ±0.11	***	***
	DHA	1.51 ^A ±0.19	2.02 ^B ±0.18	2.16 ^B ±0.07	2.19 ^B ±0.09	*	**
	Σ n-3	2.76^a ±0.29	3.88^b ±0.34	4.27^{bc} ±0.09	4.68^c ±0.16	**	***
Spleen	ALA	0.27 ±0.05	0.64 ±0.22	0.33 ±0.02	0.49 ±0.12	*	
	EPA	0.18 ^{ab} ±0.03	0.13 ^a ±0.02	0.19 ^{ab} ±0.02	0.22 ^b ±0.03		
	n-3 DPA	0.72 ^a ±0.03	1.00 ^b ±0.12	1.09 ^b ±0.06	1.39 ^c ±0.08	**	***
	DHA	2.02 ±0.10	1.95 ±0.20	1.93 ±0.11	1.98 ±0.15		
	Σ n-3	3.18^a ±0.14	3.62^{ab} ±0.35	3.55^{ab} ±0.17	4.08^b ±0.21	*	
RBC	ALA	0.59 ^A ±0.11	0.68 ^{AB} ±0.23	1.06 ^B ±0.09	0.42 ^A ±0.07	**	*
	EPA	0.35 ^a ±0.06	0.48 ^{ab} ±0.11	0.47 ^{ab} ±0.04	0.63 ^b ±0.10		
	n-3 DPA	0.80 ^a ±0.05	1.20 ^c ±0.03	1.05 ^b ±0.05	1.46 ^d ±0.07	***	***
	DHA	3.66 ^{ab} ±0.20	4.23 ^a ±0.17	3.38 ^b ±0.14	4.18 ^a ±0.37	**	
	Σ n-3	5.39^a ±0.26	6.58^b ±0.29	5.96^a ±0.23	6.70^b ±0.43	**	

Total fatty acids proportions of α -linolenic acid (ALA, C18:3n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3), n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA, C22:5n-3), docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) and total n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (Σ n-3) in tissues of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA and DL+DPA). Values are mean \pm SEM. DPA supplementation effect (DPA) compared both not supplemented groups with both supplemented groups, lipid mixture effect (LM) compared both VO groups with both DL groups (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Different superscript characters indicate significant differences for multiple comparisons (Tukey, p <0.05). Uppercase characters indicate a significant interaction between DPA and LM effects. nd: non-detected; FA: fatty acids; RBC: red blood cells.

Table 3. n-6 PUFA tissue contents

	FA %	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM
Liver	LA	7.58 ^a ±0.35	6.83 ^b ±0.27	9.38 ^c ±0.27	10.25 ^d ±0.26	*	***
	ARA	14.96 ±0.63	14.26 ±0.92	14.06 ±0.54	12.84 ±1.00		
	AdA	0.26 ^a ±0.02	0.21 ^{ab} ±0.02	0.19 ^b ±0.01	0.18 ^b ±0.02		*
	n-6 DPA	0.22 ^a ±0.02	0.19 ^a ±0.02	0.19 ^a ±0.01	0.11 ^b ±0.01	**	
	Σ n-6	23.75 ±0.58	22.2 ±1.10	24.77 ±0.73	24.34 ±1.13		
Heart	LA	12.99 ^{AB} ±0.31	12.63 ^A ±0.36	15.02 ^C ±0.34	13.82 ^B ±0.18	**	***
	ARA	21.61 ±0.34	21.02 ±0.27	20.90 ±0.33	20.67 ±0.39		
	AdA	0.89 ^a ±0.04	0.72 ^b ±0.07	0.91 ^a ±0.03	0.72 ^b ±0.05	**	
	n-6 DPA	1.03 ^a ±0.07	0.84 ^b ±0.05	0.86 ^{ab} ±0.06	0.69 ^b ±0.04	**	**
	Σ n-6	37.18^a ±0.47	35.87^b ±0.42	38.58^c ±0.43	36.68^{ab} ±0.42	***	*
Lung	LA	5.21 ^A ±0.17	4.33 ^B ±0.27	4.95 ^{AB} ±0.21	5.20 ^A ±0.33		
	ARA	10.77 ^A ±0.60	12.43 ^{AB} ±0.69	14.27 ^B ±0.30	13.23 ^B ±0.55		***
	AdA	2.30 ^a ±0.25	2.48 ^a ±0.23	3.11 ^b ±0.11	2.74 ^{ab} ±0.14		**
	n-6 DPA	0.23 ±0.03	0.27 ±0.04	0.27 ±0.02	0.24 ±0.02		
	Σ n-6	18.87^A ±0.79	19.97^A ±0.77	23.31^B ±0.39	22.04^B ±0.45		***
Spleen	LA	4.19 ^a ±0.91	5.87 ^b ±0.35	6.35 ^b ±0.13	6.52 ^b ±0.24		**
	ARA	20.74 ^a ±0.74	16.86 ^b ±1.61	19.60 ^{ab} ±0.65	18.66 ^{ab} ±1.16	*	
	AdA	2.29 ^a ±0.11	1.68 ^c ±0.17	2.11 ^{ab} ±0.08	1.86 ^{bc} ±0.13	**	
	n-6 DPA	0.29 ^a ±0.02	0.23 ^b ±0.03	0.24 ^{ab} ±0.01	0.20 ^b ±0.02	*	*
	Σ n-6	28.46^{ab} ±0.70	25.50^a ±1.54	29.53^b ±0.69	28.52^{ab} ±1.14	*	
RBC	LA	6.30 ^a ±0.17	6.38 ^a ±0.13	8.83 ^b ±0.71	8.15 ^b ±0.85		***
	ARA	26.76 ^A ±0.69	26.30 ^B ±0.96	21.17 ^A ±1.07	25.76 ^A ±0.78	**	***
	AdA	1.02 ±0.10	0.92 ±0.09	0.81 ±0.08	0.92 ±0.08		
	n-6 DPA	0.46 ±0.02	0.45 ±0.02	0.40 ±0.05	0.38 ±0.02		
	Σ n-6	35.29^A ±0.76	34.93^A ±0.97	31.99^B ±0.86	36.17^A ±0.34	***	**

Proportions of linoleic acid (LA, C18:2n-6), arachidonic acid (ARA, C20:4n-6), adrenic acid (AdA, C22:4n-6), n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA, C22:5n-6) and total n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids (Σ n-6) in tissues of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA and DL+DPA). Values are mean ± SEM. DPA supplementation effect (DPA) compared both not supplemented groups with both supplemented groups, lipid mixture effect (LM) compared both VO groups with both DL groups (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Different superscript characters indicate significant differences for multiple comparisons (Tukey, p<0.05). Uppercase characters indicate a significant interaction between DPA and LM effects. FA: fatty acids; RBC: red blood cells.

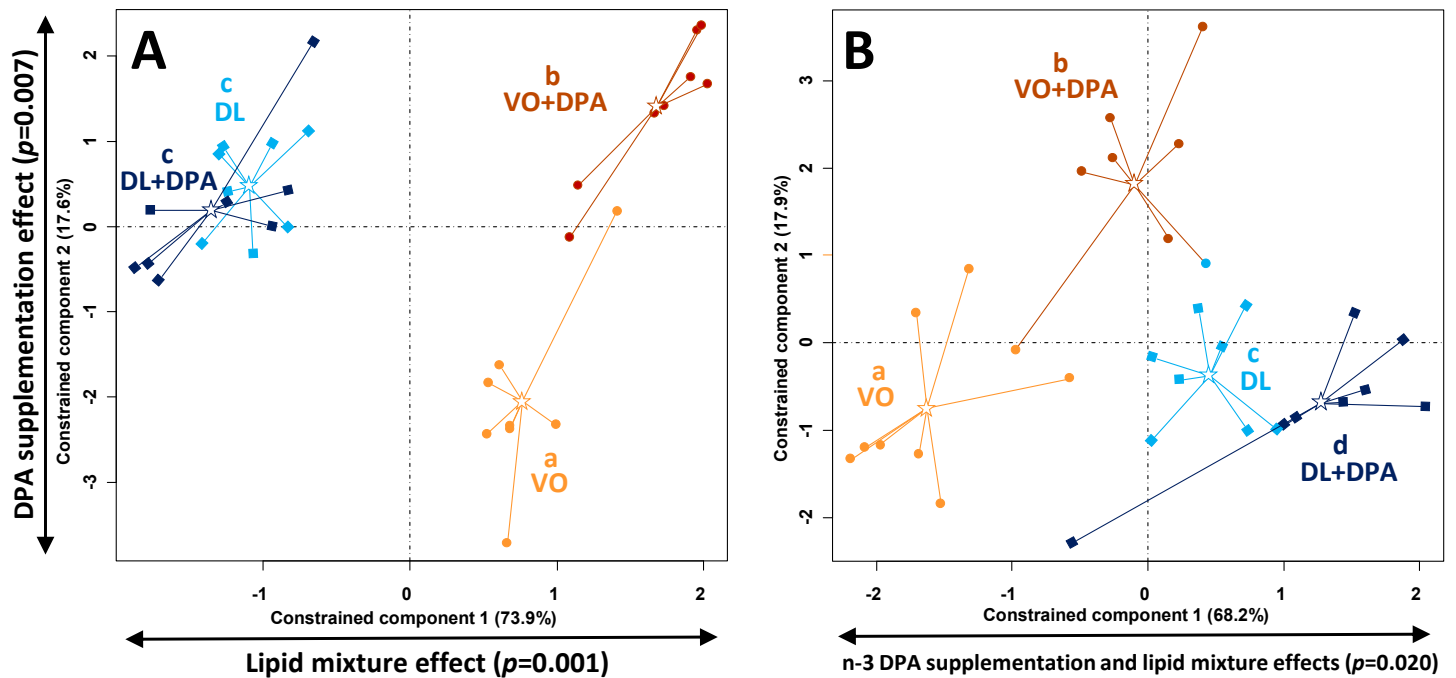


Figure 6. Redundancy analysis of fatty acids (FA) composition of the liver, heart, lung, and spleen for : **A.** all identified FA; **B.** long-chain polyunsaturated FA, of rats fed the vegetable oils blend diet (VO ○) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL □) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA ● and DL+DPA ■). The ☆ represented barycenter of each group of rats. A permutation test was performed to consider the significance of the n-3 DPA supplementation effect (VO and DL vs VO+DPA and DL-DPA) and the lipid mixture effect (VO and VO+DPA vs DL and DL+DPA) with the two components, or considering their interaction (n-3 DPA supplementation : lipid mixture effects). This test was followed by pairwise comparisons using fitting factor into an ordination to assess the significance between the four groups ($p<0.05$), indicated by different superscript characters on the group name. Both loadings plot are presented in Appendix D Figure 1 and 2.

3.2.3 *The n-3 DPA supplementation differently affected tissue FA composition in combination with dairy lipids or vegetable oils mixtures*

We used redundancy analysis (RDA) to observe if the n-3 DPA supplementation affected the tissues FA composition differently, depending of the lipid mixture where n-3 DPA was included (VO or DL). We chose to study the four tissues most impacted by the n-3 DPA supplementation reported in the experiment 1: the liver, the heart, the lung and the spleen.

We first included all identified FA in the model to observe the potential interaction between n-3 DPA supplementation and the lipid mixture on the global fatty acid metabolism (Figure 6. A). The model expressed 37.9% of constrained variance. The first component (horizontal axis) corresponded to the lipid mixture effect (VO and VO+DPA vs DL and DL+DPA, $p=0.001$). The second component (vertical axis) corresponded to the n-3 DPA supplementation (VO and DL vs VO+DPA and DL+DPA, $p=0.007$). Differences between FA profiles were more enhanced by the lipid mixture effect (73.9% of constrained variance) than by the n-3 DPA supplementation (17.6% of constrained variance). The significant interaction between the lipid mixture and the n-3 DPA supplementation ($p<0.020$) demonstrated that the n-3 DPA supplementation differently affected rats depending of the lipid mixture. Therefore, if we then compared each group, the n-3 DPA supplementation did not affect the total FA profiles when rats were fed with DL diets (DL vs DL+DPA, $p=0.3710$). Conversely, the total FA profiles of rats fed VO diets were impacted by the n-3 DPA supplementation (VO vs VO+DPA, $p=0.0012$). Moreover, both DL and DL+DPA groups were significantly different from both VO and VO+DPA groups ($p=0.0012$). The C14:0, C15:0, and the n-3 DPA to a lesser extent, were the most associated FA with both DL diets (See Appendix D Fig 1. A and Table 1. A for loading plots, correlation coefficients).

As DL diets were mostly discriminated by saturated fatty acids (C14:0 and C15:0) and n-3 DPA, we then considered all the identified PUFA to observe only the potential interaction of the n-3 DPA supplementation and the lipid mixture on the PUFA acid metabolism (Figure 6. B). The model expressed 31.4% of constrained variance. The first component expressed 68.2% of constrained variance and significantly discriminated all groups ($p<0.05$). The first component was positively characterized by the n-3 PUFA, and negatively by the n-6 PUFA (Figure 6. B). Thus, the VO group was associated with the highest n-6 PUFA status, while the DL+DPA group was associated with the highest n-3 PUFA status. The VO+DPA group had an intermediate PUFA status between the VO and the DL group. The DL group had an

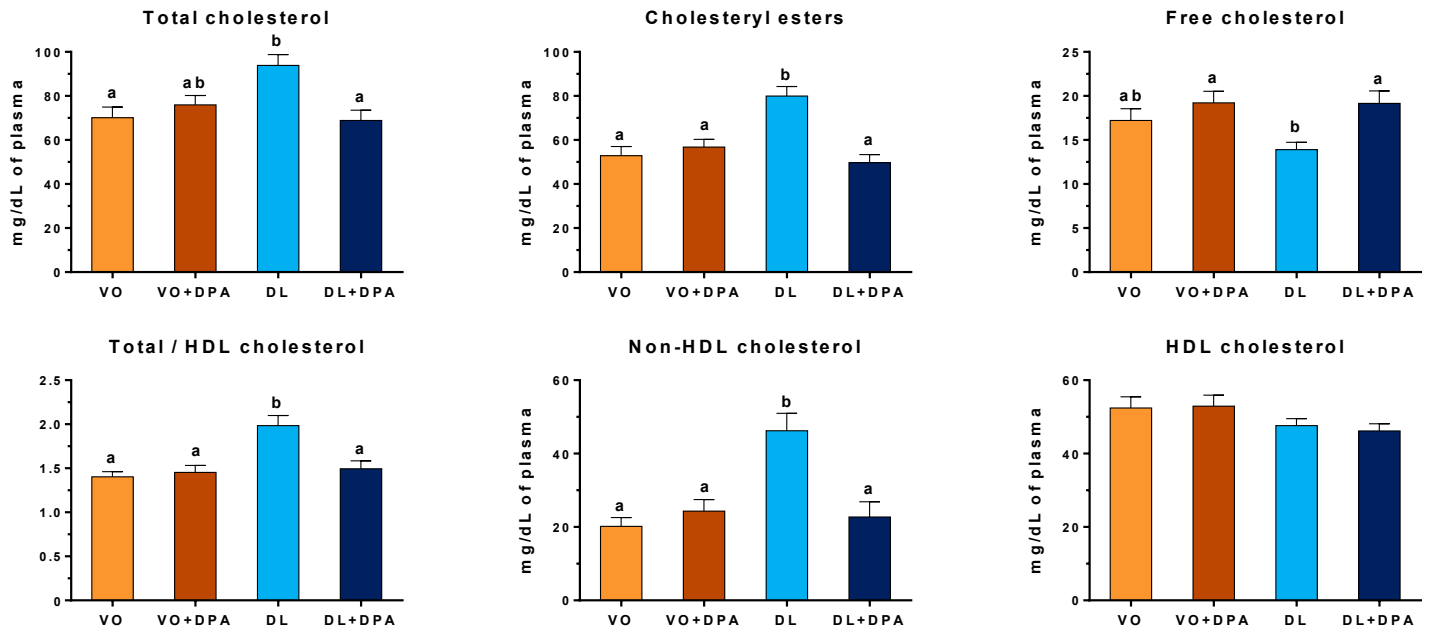


Figure 7. Plasma cholesterol concentrations of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA and DL+DPA). Values are mean \pm SEM. Different superscript characters indicate significant differences for Tukey post-hoc test for multiple comparisons ($p < 0.05$), following the one-way ANOVA if significant ($p < 0.05$).

intermediate PUFA status between the VO+DPA and the DL+DPA group. In conclusion, the n-3 PUFA global status corresponded to VO < VO+DPA < DL < DL+DPA (See Appendix D Fig 1. B and Table 1. B for loading plots and correlation coefficients).

3.2.4 Plasma cholesterol decreased with n-3 DPA supplementation and increased with DL diet

DL diets contained 6.6 mg of cholesterol /100g of diet, whereas cholesterol was absent in VO diets. Plasma total cholesterol increased in DL group only (Figure 7). This increase in total cholesterol was associated with an increase in cholesterol esters and in an increase of the non-HDL cholesterol fraction and so the cholesterol/HDL cholesterol ratio. The supplementation of DL diet with n-3 DPA maintained all these amounts at the same level than both VO and VO+DPA groups.

4 Discussion

This study first addressed the impact of the nutritional n-3 DPA supplementation on tissues FA composition after 3 or 6 weeks of diet.

Nowadays, only few studies have examined the nutritional and biochemical effects of n-3 DPA in vivo. This could be mainly due to the high cost and the limited availability of highly purified DPA these days [19,56,57]. In this study we proposed an innovative approach to purify n-3 DPA from fish oil enriched in n-3 PUFA by liquid chromatography (See section 2.2).

First, we showed that n-3 DPA supplementation increased n-3 DPA content only in some major tissues, exhibiting the highest proportions of n-3 DPA: the spleen, the lung, the heart, the RBC, the bone marrow and the kidney. Despite the relative lack of literature on the subject, our results are of interest when considering the physiological effects reported in these tissues. Concerning the spleen, a major organ involved in inflammation regulation, some experiments showed that n-3 DPA reduced inflammation in in vitro models [44]. Concerning the lung, one epidemiological study showed that n-3 DPA is the most potent fatty acid associated with better forced expiratory volume [45]. Concerning the heart, n-3 DPA seems to exert similar cardiometabolic protection effects than DHA in high-fat diet fed mice [46]. Concerning the blood, a high n-3 DPA RBC level was associated with a lower risk of metabolic syndrome in human adults [3,5]. Moreover, some studies showed that n-3 DPA inhibited platelet aggregation stimulated by collagen or arachidonic acid by accelerating the lipoxygenase pathway and by interfering with the cyclooxygenase pathway dose-dependently [47]. These suggested effects

linked to n-3 DPA could arise from the recently described bioactive metabolites derived from n-3 DPA, which could require a special attention in further studies [18,48]. We could now wonder if the effects of n-3 DPA are independent of the other n-3 PUFA or shared with them [16]. Surprisingly, while n-3 DPA has been described to exert a neuroprotective effect, we did not find a major change in brain FA composition following the n-3 DPA supplementation [4].

On the other hand, the n-3 DPA could be interesting to lead to an increase in the total n-3 PUFA status. It is well known that the n-3 PUFA conversion pathway was described as limited by the Δ -6 desaturase enzyme, the elongase-2 enzyme and the final step of β -peroxisomal oxidation of the C24:6 n-3 to DHA [49]. The elongase-2 acts twice in PUFA conversion pathway, one time in association with the elongase-5 to convert EPA to DPA (or arachidonic acid to C22:4n-6) and another time to convert DPA to C24:5 n-3 (or C22:4n-6 to C24:4n-6), for n-3 (and n-6) conversion pathway, respectively [50]. A few years ago, some authors showed that the elongase-2 enzyme could be the more limiting step to the conversion of n-3 DPA to DHA in brain astrocyte [51] and in rat liver [8]. As the direct supplementation with n-3 DPA shunted the contribution of the elongase-2 for converting EPA to n-3 DPA, one could hypothesized that n-3 DPA could be a good precursor for DHA or act as an *in vivo* stock of DHA [28]. We showed a significant but slight increase in DHA content in the spleen and in the lung after 3 weeks of n-3 DPA supplementation and of the lung, the heart and the RBC after 6 weeks. The n-3 DPA could therefore be considered for its ability to increase the DHA status. However, we must keep in mind that the increase in DHA remained slight. These results are in good agreement with previous reports describing a low level of the saturation plateau in the conversion pathway to DHA [6–8,11]. Furthermore, our results are interesting in terms of nutrition because n-3 DPA is the only n-3 PUFA between EPA and DHA which is present in food source in non-negligible amounts [19].

We also showed in both experiments that a large part of the n-3 DPA content in the liver was retroconverted into EPA (46% and 35% of retroconversion). Indeed, the EPA content increased in the liver, the plasma, the spleen and the lung in our study. The n-3 DPA estimated retroconversion, as well as the DHA retroconversion to EPA, were previously described *in vitro* [52] and *in vivo* [53], indicating that both n-3 DPA and DHA retroconversion involved the peroxisomal acyl-CoA oxidase [54].

Another point of our study is the decrease in n-6 PUFA content in tissues following the n-3 DPA supplementation, and mainly n-6 DPA and adrenic acid (C22:4 n-6). This could be

explained by the competition effect of n-3 and n-6 PUFA on the Δ -6, Δ -5 desaturases and elongase-2 enzymes which act in the synthesis of n-6 DPA from linoleic acid [55].

This study secondly addressed the impact of the lipid mixture to modulate the effects of the n-3 DPA supplementation on the FA composition of the tissues most impacted by the n-3 DPA supplementation. Indeed, the second main finding of our study was that a partial incorporation of dairy lipids in the diet increased the PUFA content in tissues, compared to a diet composed of a vegetable oil blend. Interestingly, this increase in PUFA status was higher in the non-supplemented DL group than in the VO+DPA group, suggesting a more important impact of the lipid mixture than the direct n-3 DPA supplementation. Moreover, the n-3 PUFA status increasing effect was higher in the DL+DPA group than in the DL group in all tissues except in the brain, which was only affected by the lipid mixture. This showed an additive effect of dairy lipids and n-3 DPA supplementation on PUFA status. It has been previously shown that dairy lipids could improve the n-3 PUFA tissue content, principally up to n-3 DPA in the most organs and up to DHA in the brain and retina in specific conditions [24,27,28,58].

Three mechanistic hypotheses could explain the increase of n-3 PUFA with DL diets. First, it has been reported that myristic acid (C14:0) present in dairy lipids improved the activity and the mRNA expression of the elongase-2 and the Δ -6 desaturase, the limiting enzymes of the n-3 and n-6 PUFA conversion pathway [59], resulting in an increase in PUFA tissues content [60]. Secondly, dairy lipids contain short- and medium-chain FA which have a higher β -mitochondrial oxidation rate than ALA [61], and could so prevent part of the β -oxidation of PUFA precursors [62]. In our study, ALA content was higher in the liver of DL group, strengthening this hypothesis. Thirdly, DL diets contained a lower level of oleic acid compared to VO diet. As oleic acid is also a substrate of Δ -6 desaturase, it could also compete with this enzyme more for VO groups than for DL groups [63].

5 Conclusion

The 0.5% n-3 DPA supplementation increased some EPA and DHA tissue content and mainly affected the spleen, the heart, the lung and the liver. A partial incorporation of dairy lipids in the diet increased n-3 PUFA status. Moreover, the n-3 DPA supplementation combined with a partial incorporation of dairy lipids had a positive and complementary effect on the n-3 PUFA status in all studied tissues except in the brain. Finally, the DHA status increased in brain phospholipids with dairy lipid mixture only.

6 Acknowledgments

We would like to thank Morgan Lucas for his technical assistance. The authors are indebted to Xavier Blanc (UPAE, INRA Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the lipid-free base necessary for the realization of the diets. We are grateful to Josephine Aronica for proofreading the English editing and academic writing of the paper.

7 Author contributions statement

GD, PL, CB, PLR, DC and VR contributed to the conception and design of the project. GD conducted the literature search, the experimentations, the acquisition and analysis of data, and wrote the first version of the manuscript. GD and EG performed statistical analysis. PL, DC, CB, VR, and EG contributed to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final work.

8 Conflict of interest statement

This work received financial support from Lactalis Group (Grant number: R2014-247, France). Baudry C. and Le Ruyet P. are employed by Lactalis group.

9 References

- [1] A.P. Simopoulos, A. Leaf, N. Salem, Workshop Statement on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 63 (2000) 119–121. doi:10.1054/PLEF.2000.0176.
- [2] J.T. Brenna, S.E. Carlson, Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development, J. Hum. Evol. 77 (2014) 99–106. doi:10.1016/j.jhevol.2014.02.017.
- [3] X. Dai, Y. Chen, F. Zeng, L. Sun, C. Chen, Y. Su, Association between n-3 polyunsaturated fatty acids in erythrocytes and metabolic syndrome in Chinese men and women, Eur. J. Nutr. (2015). doi:10.1007/s00394-015-0912-3.
- [4] S.C. Dyllal, Long-chain Omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA, Front. Aging Neurosci. 7 (2015). doi:10.3389/fnagi.2015.00052.
- [5] A.C. Skulas-Ray, M.R. Flock, C.K. Richter, W.S. Harris, S.G. West, P.M. Kris-Etherton, Red blood cell docosapentaenoic acid (DPA n-3) is inversely associated with

triglycerides and C-reactive protein (CRP) in healthy adults and dose-dependently increases following n-3 fatty acid supplementation, *Nutrients*. 7 (2015) 6390–6404. doi:10.3390/nu7085291.

[6] G.C. Burdge, P.C. Calder, Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults, *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) 17. doi:10.1051/rnd:2005047.

[7] J.T. Brenna, N. Salem Jr., A.J. Sinclair, S.C. Cunnane, α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*. 80 (2009) 85–91. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004.

[8] M.K. Gregory, R.A. Gibson, R.J. Cook-Johnson, L.G. Cleland, M.J. James, Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis, *PLoS One*. 6 (2011) e29662. doi:10.1371/journal.pone.0029662.

[9] T.L. Blasbalg, J.R. Hibbeln, C.E. Ramsden, S.F. Majchrzak, R.R. Rawlings, Changes in consumption of Omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century., *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 950–62. doi:10.3945/ajcn.110.006643.

[10] P. Legrand, A. Morise, E. Kalonji, Update of French nutritional recommendations for fatty acids, *World Rev. Nutr. Diet.* 102 (2011) 137–143. doi:10.1159/000327800.

[11] Y.H. Lin, N. Salem, Whole body distribution of deuterated linoleic and α -linolenic acids and their metabolites in the rat, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 2709–2724. doi:10.1194/jlr.M700369-JLR200.

[12] T. Kawabata, K. Shimoda, S. Horiguchi, M. Domon, C. Hagiwara, M. Takiyama, Y. Kagawa, Influences of stearidonic acid-enriched soybean oil on the blood and organ biochemical parameters in rats, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*. 88 (2013) 179–184. doi:10.1016/j.plefa.2012.11.004.

[13] C.G. Walker, S.A. Jebb, P.C. Calder, Stearidonic acid as a supplemental source of ω -3 polyunsaturated fatty acids to enhance status for improved human health, *Nutrition*. 29 (2013) 363–369. doi:10.1016/j.nut.2012.06.003.

[14] A. Pawar, D.B. Jump, Unsaturated Fatty Acid Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Activity in Rat Primary Hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35931–35939. doi:10.1074/jbc.M306238200.

- [15] E. Miller, G. Kaur, A. Larsen, S.P. Loh, K. Linderborg, H.S. Weisinger, G.M. Turchini, D. Cameron-Smith, A.J. Sinclair, A short-term n-3 DPA supplementation study in humans, *Eur. J. Nutr.* 52 (2012) 895–904. doi:10.1007/s00394-012-0396-3.
- [16] G. Kaur, X.F. Guo, A.J. Sinclair, Short update on docosapentaenoic acid: A bioactive long-chain n-3 fatty acid, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 19 (2016) 88–91. doi:10.1097/MCO.0000000000000252.
- [17] J.F. Markworth, G. Kaur, E.G. Miller, A.E. Larsen, A.J. Sinclair, K.R. Maddipati, D. Cameron-Smith, Divergent shifts in lipid mediator profile following supplementation with n-3 docosapentaenoic acid and eicosapentaenoic acid, *FASEB J.* 30 (2016) 3714–3725. doi:10.1096/fj.201600360R.
- [18] J. Dalli, R.A. Colas, C.N. Serhan, Novel n-3 Immunoresolvents: Structures and Actions, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1940. doi:10.1038/srep01940.
- [19] O.A. Byelashov, A.J. Sinclair, G. Kaur, Dietary sources, current intakes, and nutritional role of Omega-3 docosapentaenoic acid, *Lipid Technol.* 27 (2015) 79–82. doi:10.1002/lite.201500013.
- [20] S. Rahmawaty, K. Charlton, P. Lyons-Wall, B.J. Meyer, Dietary Intake and Food Sources of EPA, DPA and DHA in Australian Children, *Lipids.* 48 (2013) 869–877. doi:10.1007/s11745-013-3812-4.
- [21] N.J. Mann, L.G. Johnson, G.E. Warrick, A.J. Sinclair, The arachidonic acid content of the Australian diet is lower than previously estimated., *J. Nutr.* 125 (1995) 2528–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562087> (accessed February 6, 2018).
- [22] X. Jia, M. Pakseresht, N. Wattar, J. Wildgrube, S. Sontag, M. Andrews, F.B. Subhan, L. McCargar, C.J. Field, APrON study team, Women who take n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplements during pregnancy and lactation meet the recommended intake, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40 (2015) 474–481. doi:10.1139/apnm-2014-0313.
- [23] J.P. Schuchardt, A. Hahn, Bioavailability of long-chain Omega-3 fatty acids, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 89 (2013) 1–8. doi:10.1016/j.plefa.2013.03.010.
- [24] A.L. Diné, C. Rey, C. Bonhomme, P. Le Ruyet, C. Joffre, S. Layé, Dairy fat blend improves brain DHA and neuroplasticity and regulates corticosterone in mice, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 109 (2016) 29–38. doi:10.1016/j.plefa.2016.03.013.

- [25] B. Delplanque, Q. Du, G. Agnani, P. Le Ruyet, J.C.C. Martin, A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 88 (2013) 115–120. doi:10.1016/j.plefa.2012.07.004.
- [26] P. Legrand, D. Catheline, V. Rioux, G. Durand, Lauric acid is desaturated to 12:1n-3 by hepatocytes and rat liver homogenates., *Lipids.* 37 (2002) 569–572. doi:10.1007/s11745-002-0934-y.
- [27] H. Ezanno, E. Beauchamp, D. Catheline, P. Legrand, V. Rioux, Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117 (2015) 281–290. doi:10.1002/ejlt.201400304.
- [28] Q. Du, J.-C. Martin, G. Agnani, N. Pages, P. Leruyet, P. Carayon, B. Delplanque, Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 1573–1582. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.011.
- [29] S.C.I. Enti, F.I.C. Opi, N.I. On, Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid, 10 (2012) 1–48. doi:10.2903/j.efsa.2012.2815.Available.
- [30] A.M. Domijan, J. Ralić, S. Radić Brkanac, L. Rumora, T. Žanić-Grubišić, Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples, *Biomed. Chromatogr.* (2015). doi:10.1002/bmc.3361.
- [31] ANSES, Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras, 2011. <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>.
- [32] E.A. Trautwein, D. Rieckhoff, A. Kunath-Rau, H.F. Erbersdobler, Replacing Saturated Fat with PUFA-Rich (Sunflower Oil) or MUFA-Rich (Rapeseed, Olive and High-Oleic Sunflower Oil) Fats Resulted in Comparable Hypocholesterolemic Effects in Cholesterol-Fed Hamsters, *Ann. Nutr. Metab.* 43 (1999) 159–172. doi:10.1159/000012782.
- [33] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9.

- [34] V. Rioux, D. Catheline, M. Bouriel, P. Legrand, Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat., *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) 599–612. doi:10.1051/rnd:2005048.
- [35] A.H. Metherel, J.J.A. Henao, K.D. Stark, EPA and DHA Levels in Whole Blood Decrease More Rapidly when Stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ as Compared with Room Temperature, 4 and $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, *Lipids*. 48 (2013) 1079–1091. doi:10.1007/s11745-013-3827-x.
- [36] B.N. Ametaj, G. Bobe, Y. Lu, J.W. Young, D.C. Beitz, Effect of Sample Preparation, Length of Time, and Sample Size on Quantification of Total Lipids from Bovine Liver, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2105–2110. doi:10.1021/jf0259011.
- [37] J.L. Delsal, New method of extraction of serum lipids by methylal. Application to micro-estimation of total cholesterol, phospho-aminolipins and proteins., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. 26 (1944) 99–105.
- [38] R.L. Wolff, C.C. Bayard, R.J. Fabien, Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1471–1483. doi:10.1007/BF02577840.
- [39] A. Kalivodová, K. Hron, P. Filzmoser, L. Najdekr, H. Janečková, T. Adam, PLS-DA for compositional data with application to metabolomics, *J. Chemom.* 29 (2015) 21–28. doi:10.1002/cem.2657.
- [40] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data., *BMC Genomics*. 7 (2006) 142. doi:10.1186/1471-2164-7-142.
- [41] S. Wiklund, E. Johansson, L. Sjöström, E.J. Mellerowicz, U. Edlund, J.P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz, J. Trygg, Visualization of gc/tof-ms -Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using opls Class Models, *Anal. Chem.* 80 (2007) 115–122. doi:10.1021/AC0713510.
- [42] M.R. Hervé, F. Nicolè, K.L. Cao, *Multivariate Analysis of Multiple Datasets : a Practical Guide for Chemical Ecology*, (2018). doi:https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6.

- [43] W. Huang, E. Zwimpfer, M.R. Hervé, Z. Bont, M. Erb, Neighbourhood effects determine plant-herbivore interactions below-ground, *J. Ecol.* (2017) 1–10. doi:10.1111/1365-2745.12805.
- [44] Y. Tian, A. Katsuki, D. Romanazzi, M.R. Miller, S.L. Adams, K. Miyashita, M. Hosokawa, Docosapentaenoic acid (22:5n-3) Downregulates mRNA Expression of Pro-inflammatory Factors in LPS-activated Murine Macrophage Like RAW264.7 Cells, *J. Oleo Sci.* (2017). doi:10.5650/jos.ess17111.
- [45] S. Leng, M.A. Picchi, G. Wu, S.A. Belinsky, Dietary nutrients associated with preservation of lung function in Hispanic and non-Hispanic white smokers from New Mexico, (2017) 1–11. doi:10.2147/COPD.S142237.
- [46] X. Guo, A.J. Sinclair, G. Kaur, D. Li, Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* (2017). doi:10.1016/j.plefa.2017.09.011.
- [47] S. Akiba, T. Murata, K. Kitatani, T. Sato, Involvement of lipoxygenase pathway in docosapentaenoic acid-induced inhibition of platelet aggregation, *Biol. Pharm. Bull.* 23 (2000) 1293–1297. doi:10.1248/bpb.23.1293.
- [48] M.M. Careaga, H. Sprecher, Synthesis of two hydroxy fatty acids from 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid by human platelets., *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 14413–14417. <http://www.jbc.org/content/259/23/14413> (accessed March 19, 2015).
- [49] Y. Poirier, V.D. Antonenkov, T. Glumoff, J.K. Hiltunen, Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763 (2006) 1413–1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.
- [50] A. Jakobsson, R. Westerberg, A. Jacobsson, Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 237–249. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004.
- [51] S.M. Innis, R.A. Dyer, Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 1529–1536. doi:10.1194/jlr.M200120-JLR200.

- [52] C. Morin, É. Rousseau, S. Fortin, Anti-proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride in colorectal carcinoma cells, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 89 (2013) 203–213. doi:10.1016/j.plefa.2013.07.004.
- [53] G. Kaur, D.P. Begg, D. Barr, M. Garg, D. Cameron-Smith, A.J. Sinclair, Short-term docosapentaenoic acid (22 : 5 n-3) supplementation increases tissue docosapentaenoic acid, DHA and EPA concentrations in rats, *Br. J. Nutr.* 103 (2010) 32–37. doi:10.1017/S0007114509991334.
- [54] E. Christensen, B. Woldseth, T.A. Hagve, B.T. Poll-The, R.J. Wanders, H. Sprecher, O. Stokke, B.O. Christophersen, Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 215 (1993) 61–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327852>.
- [55] F. Tosi, F. Sartori, P. Guarini, O. Olivieri, N. Martinelli, Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease, in: Springer, Cham, 2014: pp. 61–81. doi:10.1007/978-3-319-07320-0_7.
- [56] H. Mu, J. Jin, D. Xie, X. Zou, X. Wang, X. Wang, Q. Jin, Combined Urea Complexation and Argentated Silica Gel Column Chromatography for Concentration and Separation of PUFAs from Tuna Oil: Based on Improved DPA Level, *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 93 (2016) 1157–1167. doi:10.1007/s11746-016-2842-5.
- [57] R. Yamamura, Y. Shimomura, Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1435–1440. doi:10.1007/s11746-997-0250-6.
- [58] B. Delplanque, Q. Du, P. Leruyet, G. Agnani, N. Pages, D. Gripois, H. Ould-Hamouda, P. Carayon, J.C. Martin, Brain docosahexaenoic acid (DHA) levels of young rats are related to alpha-linolenic acid (ALA) levels and fat matrix of the diet: Impact of dairy fat, *OCL - Ol. Corps Gras Lipides*. 18 (2011) 293–296. doi:10.1684/ocl.2011.0420.
- [59] S. Jan, H. Guillou, S. D’Andrea, S. Daval, M. Bouriel, V. Rioux, P. Legrand, Myristic acid increases $\Delta 6$ -desaturase activity in cultured rat hepatocytes, *Reprod. Nutr. Dev.* 44 (2004) 131–140. doi:10.1051/rnd:2004020.

- [60] V. Rioux, D. Catheline, E. Beauchamp, J. Le Bloc 'h, F. Pé, P. Legrand, Substitution of dietary oleic acid for myristic acid increases the tissue storage of α -linolenic acid and the concentration of docosahexaenoic acid in the brain, red blood cells and plasma in the rat, *Anim. Anim. Consort.* 2 (2008) 636–644. doi:10.1017/S1751731108001705.
- [61] J. Leyton, P.J. Drury, M.A. Crawford, Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat, *Br. J. Nutr.* 57 (1987) 383–393. doi:10.1079/BJN19870046.
- [62] V. Rolland, S. Roseau, G. Fromentin, S. Nicolaidis, D. Tomé, P.C. Even, Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter., *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 21–30.
- [63] H.G. Park, M.G. Engel, K. Vogt-Lowell, P. Lawrence, K.S. Kothapalli, J.T. Brenna, The Role of Fatty Acid Desaturase (FADS) Genes in Oleic Acid Metabolism: FADS1 Δ 7 desaturates 11–20:1 to 7,11–20:2, Prostaglandins, *Leukot. Essent. Fat. Acids.* 128 (2017) 21–25. doi:10.1016/j.plefa.2017.11.004.

2 Impacts comparatifs du DPA par rapport à l'EPA et au DHA

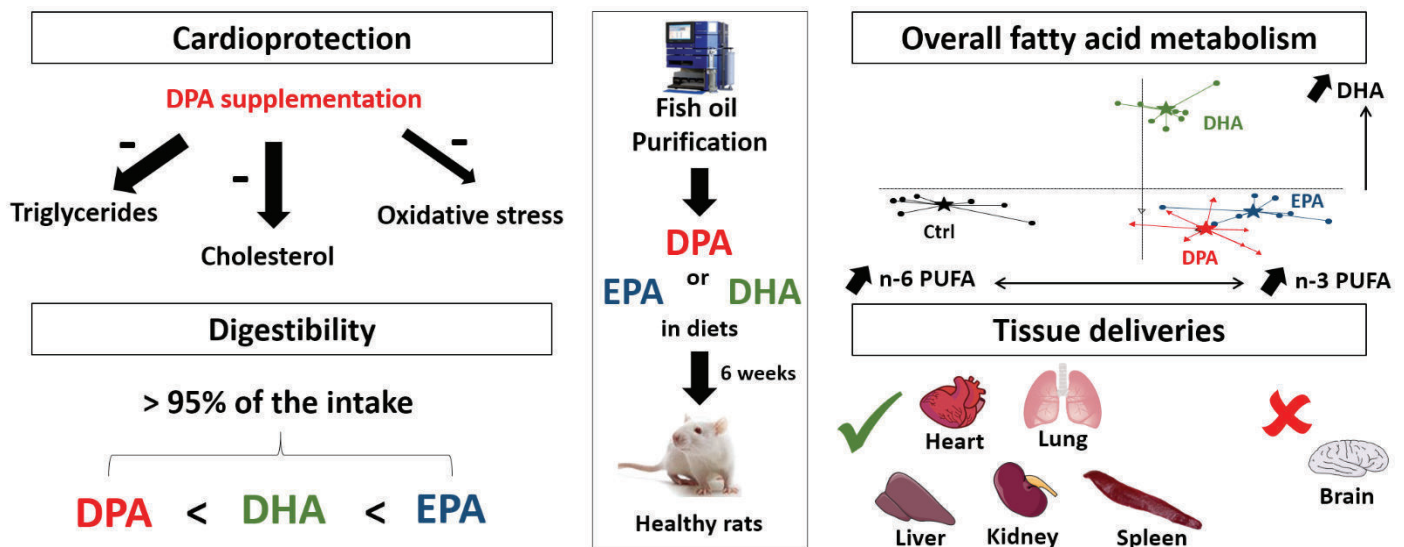
2.1 Contexte de l'étude

Le DPA a principalement été étudié en association avec la prévention des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement avec la diminution des lipides plasmatiques et de l'inflammation (Yazdi 2014; Xiao-fei Guo et al. 2017; Kaur, Guo, and Sinclair 2016). La plupart des expérimentations *in vivo* réalisées s'intéressent aux effets physiologiques du DPA et utilisent donc des modèles pathologiques du syndrome métabolique ou de cancers en utilisant des modèles d'animaux transgéniques ou soumis à des régimes hyper-énergétiques à hautes teneurs en sucre et en lipides (Gotoh et al. 2009; Xiao fei Guo et al. 2017; Caroline Morin, Blier, and Fortin 2015). Ainsi, les études chez l'Homme ou l'animal sains sont rares et de nombreuses questions restent en suspens dont les capacités d'une supplémentation nutritionnelle en DPA à moduler les métabolismes lipidique et des acides gras (Kaur, Cameron-Smith, et al. 2011; E. Miller et al. 2013). En effet, la littérature reste contradictoire sur le fait qu'une supplémentation en DPA puisse impacter la composition tissulaire en acides gras de façon différente ou similaire à des suppléments en EPA ou en DHA. En effet le DPA est parfois converti en DHA *in vitro* (Kaur, Sinclair, et al. 2011) ou rétroconverti en EPA dans le foie ou dans les reins *in vivo* (Kaur et al. 2010; Holub, Swidinsky, and Park 2011) ne permettant pas de statuer sur le métabolisme spécifique du DPA. Concernant le métabolisme lipidique, une étude *in vitro* de supplémentation du milieu de culture de cellules FaO avec 50µM de DPA a montré une diminution des concentrations de TG et de cholestérol total plus importante que pour l'EPA et le DHA, associée à une inhibition de l'expression des gènes de la lipogenèse (Kaur et al. 2010). Néanmoins aucune étude *in vivo* n'a confirmé ou infirmé ces résultats.

Ainsi, le but de cette deuxième expérimentation sur le DPA était d'étudier l'impact d'une supplémentation nutritionnelle en DPA inclus directement dans le régime sur le métabolisme lipidique et sur le métabolisme des acides gras des tissus les plus impactés par le DPA lors de la première expérimentation, en comparaison à l'EPA et au DHA, chez le rat sain. Nous avons choisi de nous positionner dans les conditions nutritionnelles les plus contraignantes vis-à-vis de ces paramètres, c'est-à-dire avec un ratio LA/ALA de 5 comme recommandé chez l'Homme et avec un mélange lipidique composé de MGV+MGL dont nous avons montré précédemment qu'elle pouvait augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3.

Cette étude est présentée sous la forme d'un article soumis au *Journal of Nutritional Biochemistry* (JNB) en juin 2018. Les « *Supplementary data* » sont présentées en Annexe III.

Graphical abstract



Abstract

The shared and specific physiologic and metabolic effects of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and even more n-3 docosapentaenoic acid (DPA) are poorly known. We investigated the physiological effects and the overall fatty acid tissue composition of a nutritional supplementation of DPA, compared to EPA and DHA in healthy adult rats. Rats (n=32) were fed with semi-synthetic diets supplemented or not with 1% of total lipids as EPA, DPA or DHA from weaning for 6 weeks. Fatty acid tissue composition was determined by GCMS and blood assays were performed.

The DPA supplementation was the only one that led to a decrease in plasma triglycerides, total cholesterol, non-HDL-cholesterol, cholesterol esters and total cholesterol/HDL-cholesterol ratio compared to the non-supplemented control group. The three supplemented groups had increased plasma total antioxidant status and superoxide dismutase activity.

In all supplemented groups, the n-3 PUFA levels increased in all studied tissues (liver, heart, lung, spleen, kidney, red blood cells, splenocytes, peripheral mononucleated cells), except in the brain. We showed that the DPA supplementation affected the overall fatty acid composition and increased DPA, EPA and DHA tissue contents in a similar way than with EPA. However, liver and heart DHA contents increased in DPA-fed rats at the same levels than in DHA-fed rats. Moreover, a large part of DPA seems to be retroconverted into EPA in the liver (38.5%) and in the kidney (68.6%). In addition, the digestibility of DPA was lower than that of DHA and EPA.

2.2 Article 2: Comparative effects of n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition in rats

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Etienne Guillocheau¹, Pierre Gueret², Charlotte Baudry³, Pascale Le Ruyet³, Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest - INRA USC1378, Rennes F-35042, France

²Department of Hematology, Ponchaillou University Hospital, Rennes 35033, France

³Lactalis, R&D, Retiers F-35240, France

*** Correspondence:**

Corresponding Author

philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Keywords: polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism, cholesterol, triglycerides, docosahexaenoic acid DHA, oxidative status

Highlights

- The 1% DPA supplementation decreased plasma lipid parameters in rats
- DPA increased DHA tissue contents, except in the brain
- DPA and EPA similarly affected overall fatty acid tissue content similarly
- DPA digestibility was lower than that of EPA and DHA

Abbreviations

ALA: α -linolenic acid; **ALAT:** alanine aminotransferase; **ASAT:** aspartate transaminase; **DHA:** docosahexaenoic acid; **DPA:** n-3 docosapentaenoic acid; **EE:** ethyl ester(s); **EPA:** eicosapentaenoic acid; **FA:** fatty acid(s); **GCMS:** gas chromatography-mass spectrometry; **HDL-cholesterol:** high-density lipoprotein cholesterol; **LA:** linoleic acid; **PBMC:** peripheral blood mononucleated cells; **PUFA:** polyunsaturated fatty acid(s); **RBC:** red blood cells; **RDA:** redundancy analysis.

1 Introduction

Some evidence supports the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3), α -linolenic acid (ALA) and most recently n-3 docosapentaenoic acid (DPA, C22:5 n-3) on cardio-metabolic risk factors [1,2] and to a lower extent on cerebral diseases [3]. Nevertheless, the potentially specific and shared effects of EPA, DHA and DPA are poorly understood [1,2,4,5]. The relationship between the decrease of the coronary heart disease risk and the n-3 PUFA intake remains still unclear in humans and is primarily associated with EPA and DHA intake without taking DPA into account [5,6].

In human adults, fish, fish oil containing products, meat, and n-3 PUFA enriched food provide n-3 PUFA as phospholipids and triglycerides, and food-supplement under ethyl ester form [7]. In Europe, the median daily intakes are 42.5 mg for DHA, 14 mg for EPA and 12 mg for DPA and are lower than the 250 mg/day nutritionally recommended for each EPA and DHA, but no recommendation exists yet in Europe for DPA [8]. Indeed, while several studies concern the effect of DHA and EPA, only few studies concern DPA and the studies involving DPA have been reviewed here [9–13]. This lack of studies is surely due to the lack of high amount availability of high purity DPA at an affordable price to perform in vivo studies [14,15]. To our knowledge, only two studies investigated the bioavailability of DPA compared to EPA [16,17]. Moreover, most of in vivo studies including DPA were either short-term studies supplementing DPA by oral gavage or pathological models using no highly pure DPA [9–13].

In mammals, DHA, EPA and DPA must be provided directly by the diet because the conversion from their precursor ALA is limited [18,19]. Moreover, the ALA intake is lower than the dietary recommendations in humans [8,20], and most of ALA intake is catabolized by mitochondrial β -oxidation [21]. Mainly in the liver, the conversion from ALA to n-3 derivatives occurs through a sequence of desaturations and elongations including three enzymes considered as limiting steps: the Δ -6 desaturase, the elongase-2 and the final peroxisomal β -oxidation step [22,23]. DPA is the only n-3 PUFA intermediate between EPA and DHA present in food in non-negligible quantities. So, DPA could be of interest for its putative capacity to be converted into DHA, retroconverted into EPA and for its specific putative physiological effects [10,24,25]. To our knowledge, no study reports the DPA overall fatty acid metabolism, compared to EPA and DHA, in healthy rats with nutritional supplementation.

In the present experiment, we compared physiological potential effect, delivery, fatty acid metabolism and bioavailability in healthy adult rats fed with EPA, DPA or DHA-supplemented diets.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Solvents and chemicals were obtained from Thermo Scientific (Elancourt, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) or from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Polaris (Quimper, France) graciously provided high n-3 PUFA marine oil (Omegavie® 4020 EE Qualitysilver®).

2.2 The n-3 ethyl poly-unsaturated fatty acid purifications

The DPA-ethyl ester (EE), EPA-EE, and DHA-EE > 99% was obtained from a high n-3 PUFA marine oil (Omegavie® 4020EE Qualitysilver®, Polaris). The purification was performed by liquid chromatography in 7 steps with a puriFlash®4250 system (Interchim, Montluçon, France) with a Chromabond® flash column (RS 330 C18 ec, porosity 45 µm, diameter 60 mm, length 200 mm, Macherey Nagel, Hoerd, France) followed by a Puriflash flash column (PF-15C18 HP-F0330, granulometry 15µm, diameter 60 mm, length 226 mm, Interchim) and coupled with an UV-detector. The first elution was performed at room temperature in an isocratic mode of methanol/water (99/1, v/v) with a constant flow of 120 mL/min. The fraction corresponding to DPA-EE, EPA-EE, and DHA-EE was collected and was evaporated with a rotatory evaporator, then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) to control purity and efficiency. The collected fraction was reinjected with an elution of methanol/water (98/2, v/v) in the same conditions and this step was repeated 4 more times to gradually increase the DPA-EE purity of the fraction of interest up to 95% for DPA and up to 99% for EPA and DHA. The DPA fraction up to 95% was injected in the same conditions in an Interchrom preparative column (Uptisphere strategy C18-HQ, granulometry 5µm, diameter 50 mm, length 250 mm, Interchim) with an isocratic mode of methanol/water (98/2, v/v). The fraction corresponding to the DPA-EE peak has been collected and pooled to obtain DPA-EE >99% purity. The n-3 PUFA possible peroxidation was controlled by TBARS test [26]. Malondialdehyde (TBARS) was not detected in DPA-EE, EPA-EE and DHA-EE oils.

Table 1. The composition of the experimental diets

Staple composition for all the diets (g/kg of diet)		Lipid blend composition in fatty acids (g/100g)				
		Diets	Ctrl	EPA	DPA	DHA
Lipid blend	100.0	Saturated FA ²	36.5	36.3	36.3	36.3
Cholesterol (mg)	66.0	C14:0	5.6	5.6	5.6	5.6
Vitamin E (mg) ¹	120.0	C16:0	18.2	18.1	18.1	18.1
Proteins	221.5	C18:0	6.8	6.8	6.8	6.8
HCl-casein	220.0	Monounsaturated FA	47.9	47.6	47.6	47.6
DL-methionine	1.5	C18:1 n-9	43.1	42.8	42.8	42.8
Glucides	603.5	Polyunsaturated FA	15.6	16.1	16.1	16.1
Cornstarch	402.3	C18:2 n-6 (LA)	12.5	12.4	12.4	12.4
Sucrose	201.2	C18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.3	2.3	2.3
Others	75.0	C20:5 n-3 (EPA) ³		1.0		
Cellulose	20.0	C22:5 n-3 (DPA) ³			1.0	
Mineral mix 102	45.0	C22:6 n-3 (DHA) ³				1.0
Vitamin mix 102	10.0	LA/ALA ratio	5.0	5.0	5.0	5.0

¹ Add to lipid blend to prevent polyunsaturated fatty acids peroxidation; ² Fatty acids; ³ Ethyl esters purified by preparative liquid chromatography

2.3 Diets and animals

Lipid blends were prepared from a combination of natural fat sources not supplemented or supplemented with 1% EPA-EE, DPA-EE or DHA-EE. The lipid-free base of diets was prepared at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) and lipid fractions were added in our laboratory. The detailed composition of the diets is presented in Table 1. To prepare the rat food, the lipid-free base and the lipid fraction were mixed then sifted twice, 13% water was added (w/w). Then the mixture was homogenized and shaped as kindle. The rat food was sealed in an airtight package and frozen at -20°C, since all diets were prepared at the beginning of the study. During the experimentation, rat food was thawed at +4°C 24h before being given to animals. The diets were isoenergetic and isolipidic. Diets were made with particular attention to obtain a similar ALA and linoleic acid (LA) levels in all diets, with LA/ALA ratio around 5 as nutritionally recommended in humans in France [27]. FA composition of diets was analyzed by GCMS after Folch extraction and derivation as described in section 2.5 [28], at the beginning and at the end of the experimentation, showing no change in FA composition. Total sterols were measured in lipid fraction by Liebermann method as described previously [29]. The 0.12% vitamin E were added to the lipid blends to prevent the peroxidation of n-3 PUFA. The malondialdehyde content was measured by TBARS test and high-performance liquid chromatography in each diet to control the possible peroxidation of n-3 PUFA at the beginning and at the end of the experimentation as described previously [26]. Malondialdehyde was not detected in all diets.

The 32 Sprague Dawley rats (mean body weight 50±1g, 3 weeks old at beginning of the experiment) (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly assigned into the four groups and were housed 4 animals by cage on a 12h light/dark cycle and maintained at 21°C±2°C with free access to water and food. The 8 rats by group were fed from weaning during 6 weeks with the 4 diets. Body weight, food, and water intakes were measured 3 times a week.

To measure the apparent digestibility of n-3 PUFA included in the diets, feces were removed twice a day for three days analysis during the last week of the experiment, weighted per cage (2 rats/cage) and stored at -80°C for further analysis.

All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for Animal Care and Use (2010/63/CEE). The experimental (n°APAFIS#5139-201605121200996 v1) was approved by the French Animal Care Committee (Rennes, approval number A3523838) and

the Ministry of Higher Education and Research and Innovation, in compliance with recommendations of the 2013–118 French for animal experimentation.

2.4 Tissue sampling

At the end of the experiment, fasted rats were euthanized with an intraperitoneal injection of sodic pentobarbital (140 mg/kg of body weight) (Euthasol Vet, France) between 9:00 AM and 13:00 PM.

Blood samples were collected by cardiac puncture into lithium heparin-treated and EDTA K2-treated Monovettes (Sarstedt, Marnay, France). Plasma was separated from whole blood cells by centrifugation (2000 g, 20 min, amb T°) and stored at -80°C. To separate red blood cells (RBC) from peripheral blood mononucleated cells (PBMC), the same volume of phosphate-buffered saline solution (PBS) as that of withdrawn plasma was added to the pellet of RBC and PBMC and the tube was gently homogenized. Then, the cell solution was diluted 2 fold with PBS (v/v) and Ficoll solution (Ficoll®-Paque Premium 1.084, Sigma) was deposited under the diluted cellular solution (1/3, v/v) with a needle. The tube was centrifuged (2000g, 20min, amb T°) without a brake to separate RBC from PBMC. The intermediate PBMC layer was removed, washed two times by addition of PBS and centrifugation (500 g, 5 min, amb T°). The PBMC pellet was suspended in RPMI medium 1640 containing 10% fetal bovine serum (Sigma), 2 mM L-glutamine and 50 IU/mL penicillin. The number and viability were assessed by the trypan blue exclusion method with a Malassez counting cells grid. A total of 5x10⁵ cells were used to flow cytometry analysis and the rest of the PBMC were stored in hexane/isopropanol (3/2, v/v) at -20°C before lipid extraction. RBC pellet was washed two times with PBS, then PBS was removed, RBC were mixed, weighted and stored in hexane/isopropanol (3/2, v/v) at +4°C before lipid extraction [30].

The splenocytes were purified from the spleen as follows. The spleen was disrupted in a petri dish in RPMI medium 1640 (Fisher Scientific, Illkirch, France) then the solution was filtered with a cell strainer with a 70 µm nylon mesh (Fisher Scientific). Then, splenocytes were separated from the spleen RBC on Ficoll gradient and stored as described above for the separation of PBMC from RBC.

Organs were removed, washed with PBS, weighted and around 200 mg of each organ were stored in dimethoxymethane/methanol (4/1, v/v) at -20°C. The rest of the organs were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C [31]. The liver, the heart, the lung, the spleen, the kidney and the brain were collected.

2.5 Lipid extraction and fatty acid composition

Lipids were extracted twice from tissues with 20 volumes dimethoxymethane/methanol (4/1, v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax [32]. The RBC lipid membranes, plasma, splenocytes and PBMC were extracted twice with hexane/isopropanol (3/2, v/v) after acidification with HCl 3M, as previously described [33]. Total lipids were saponified by 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol at 70°C for 30 min and then methylated with 1 mL of BF₃ (12% in methanol) at 70°C for 30 min. Fatty acid methyl esters were extracted twice with pentane, washed twice with NaCl 0.9% and were taken up in hexane.

GCMS analysis was performed using an Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with a bonded silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm; SGE, Melbourne, Australia) containing a polar stationary phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (0.25 μm film thickness). Helium was used as carrier gas (average velocity 36 cm/s). The column temperature program started at 150°C and gradually increased at 4°C/min to 250°C, and held at 250°C for 10 min. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 5975C inert MSD with triple axis detector. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in the full scan mode with a mass range of m/z 50–550 atomic mass units (amu), using the MSD Chemstation software E.02.02.14.31. Identification of the FA methyl esters was based upon retention times obtained for methyl ester of authentic standards, when available. The National Institute of Standards and Technology database v2.0 was also sometimes used to identify unknown FA. All identified FA with a signal/noise > 10 were considered in the analysis of the proportions, FA identified with a signal/noise between 3 and 10 were marked as trace.

The apparent retroconversion of n-3 DPA into EPA was estimated in the liver as a percentage by the following formula: $([\Delta \text{ EPA}]_{\text{((Supplemented-Control)}}) / ([\Delta \text{ EPA+DPA}]_{\text{((Supplemented-Control)}})) \times 100$ and the apparent retroconversion of DHA into EPA was estimated by replacing DPA by DHA in the previous formula.

2.6 Blood biochemical parameters

Plasma concentrations of total cholesterol, (CHOL, Randox, Crumlin, UK), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) (HDL-CHOL, Randox), free-cholesterol (free-CHOL-FS, Diasys, Holzheim, Germany), triglycerides (TRIGS, Randox), glucose (glucose-

GOD-FS, Diasys), haemoglobin (Hb, Randox), total antioxidant status (TAS, Randox) and creatine (creat-PAP-FS, Diasys) were assayed by colorimetric detection using commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions on first thawed heparinized plasma in triplicate. Plasma malondialdehyde was measured by liquid chromatography and TBARS test as described previously [26]. Creatinine concentration was also measured in urine. Non-HDL cholesterol was calculated by the difference between total cholesterol and HDL-cholesterol. Cholesterol esters level was calculated by the difference between total cholesterol and free-cholesterol.

Plasma alanine aminotransferase (ALAT) (ALAT-GPT-FS, Diasys) and aspartate transaminase (ASAT) (ASAT-GOT-FS, Diasys) activities were assayed using commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions on the first thawed heparinized plasma in triplicate. Glutathione peroxidase activity (RANSEL, Randox) and hemoglobin were measured in EDTA-treated whole blood. Superoxide dismutase activity was measured in washed erythrocytes (RANSOD, Randox) on EDTA-treated blood according to the manufacturer's instructions.

Plasma TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , VEGF, GM-CSF concentrations were simultaneously measured using the magnetic Luminex technology with a custom rat premixed multi-analyte kit (R&D Systems, Abingdon, UK) and a Bio-Plex suspension array system (Biorad, marnes-la-Coquette, France). All samples were run in triplicate and analyzed on the same day in first thawed EDTA-treated plasma. All measured concentrations were in the range of the standard curve of manufacturer-supplied controls and the coefficient of variation was <7.0%.

2.7 Complete blood count, peripheral blood mononucleated cells, and splenocytes sub-populations

Complete blood count was realized on EDTA-treated whole blood with a UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System (Beckman, Galway, Ireland) maximum one hour after blood collection. May Grunwald Giemsa staining was performed on whole blood and white blood cells were manually count under an optical microscope (x1000). As no difference was found between automatic and manual analysis of white blood cells, the white blood cells results were presented as a proportion of total white blood cells from the automatic count.

The PBMC and splenocyte sub-populations were analyzed by flow cytometry on purified cells. Cells (5×10^5) were labeled with antibodies using anti-CD3FITC to define lymphocyte T cells, anti-CD4PerCP-eFluor710, to identify helper T cells and anti-CD8aPE-Cy7 to analyze cytotoxic T cells, anti-CD11b/cPE to define lymphocyte B cells (CD3-) and anti-CD45RAAPC to study natural-killer cells (CD3-). All antibodies were purchased from Thermo Scientific. For cell surface staining, cells were incubated for 30 min at ambient T° in the dark with the corresponding amount of antibodies according to the manufacturer instructions. Flow cytometry was performed on a BD LSRFortessa X-20 Cell analyzer (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France).

2.8 Statistical analysis

Values ($n=8/\text{group}$) are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Duncan procedure was performed for multiple comparisons between the four groups when one-way ANOVA was significant. Student t-test was used to assess the difference between the apparent retroconversion of DPA and DHA into EPA. Prior to analysis, the model was assessed by verifying the normality of the model and the normality of the residuals graphically, homoscedasticity was supposed true. When ANOVA conditions were not respected, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons was performed (digestibility measurement). For all procedures, $p\text{-value} < 0.05$ was considered as significant.

Redundancy analysis (RDA) was used to study the general impact of the diets on fatty acid metabolism in all studied tissues. RDA corresponds to ANOVA in a multivariate framework [34]. Constraint (ie factors) was the diet effect. As FA compositions were presented as the percentage of total detected FA, and that the FA proportion took place in a large range of values, the data were transformed by centering log-ratio (clr), then by centering-scaling [35]. A permutation test was used followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with false discovery rate (fdr) method to assess the significance of the four diets [36]. FA explaining most of the variability between the two effects were chosen by considering the test of Pearson correlation coefficient between FA data and individual scores and a Pearson correlation coefficient $R^2 > 0.5$ [37].

Univariate analysis and redundancy analysis were realized using R software v3.4.2 and R packages car v2.1.5, RVAideMemoire v0.9.68, vegan v2.4.4, chemometrics v0.1 and Rcmdr v2.4.1.

Table 2. Body and organ weights, food intake and excretion

Diets	Ctrl	EPA	DPA	DHA
Animals				
Total body weight gain (g)	346 ^a ±11	353 ^{ab} ±10	363 ^{ab} ±9	368 ^b ±12
Final body weight (g)	395 ^a ±12	402 ^{ab} ±10	412 ^{ab} ±10	420 ^b ±13
Liver (g/kg bw)	32.4 ±0.6	32.9 ±2.2	32.7 ±1.0	32.6 ±1.2
Heart (g/kg bw)	3.5 ±0.1	3.6 ±0.1	3.5 ±0.1	3.5 ±0.1
Lung (g/kg bw)	3.9 ±0.1	4.0 ±0.1	3.7 ±0.1	3.8 ±0.1
Spleen (g/kg bw)	3.1 ±0.1	3.1 ±0.3	2.9 ±0.2	2.9 ±0.2
Kidney (g/kg bw)	7.0 ^a ±0.1	7.6 ^{ab} ±0.2	7.8 ^b ±0.3	7.5 ^{ab} ±0.2
Brain (g/kg bw)	5.0 ±0.1	5.0 ±0.2	4.9 ±0.2	4.8 ±0.2
Food intake¹				
Total food intake (g for 6 weeks)	947 ±26	940 ±26	976 ±26	1034 ±3
Total water intake (g for 6 weeks)	990 ±71	925 ±9	969 ±11	988 ±30
ALA (mg/day/kg bw)	17.4 ±0.5	16.9 ±0.1	16.4 ±0.4	17.3 ±0.7
Supplemented FA (mg/day/kg bw)	/	7.7 ±0.1	7.5 ±0.1	7.8 ±0.1
Excretion²				
Feces (g/day)	7.6 ±0.2	7.7 ±0.3	7.6 ±0.1	7.8 ±0.2
ALA (µg/g feces)	47.5 ^a ±1.8	32.6 ^c ±1.5	36.6 ^{bc} ±0.4	40.6 ^b ±2.4
Supplemented FA (µg/g feces)	/	18.9 ^a ±1.1	64.8 ^c ±6.2	35.2 ^b ±9.2
Digestibility				
Supplemented FA (%)	/	1.7 ^a ±0.1	3.4 ^b ±0.3	3.1 ^b ±0.4

Values are mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant differences between groups for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$).

¹ Calculated for 6 weeks of diet.

² Calculated for three days in the last week of diet.

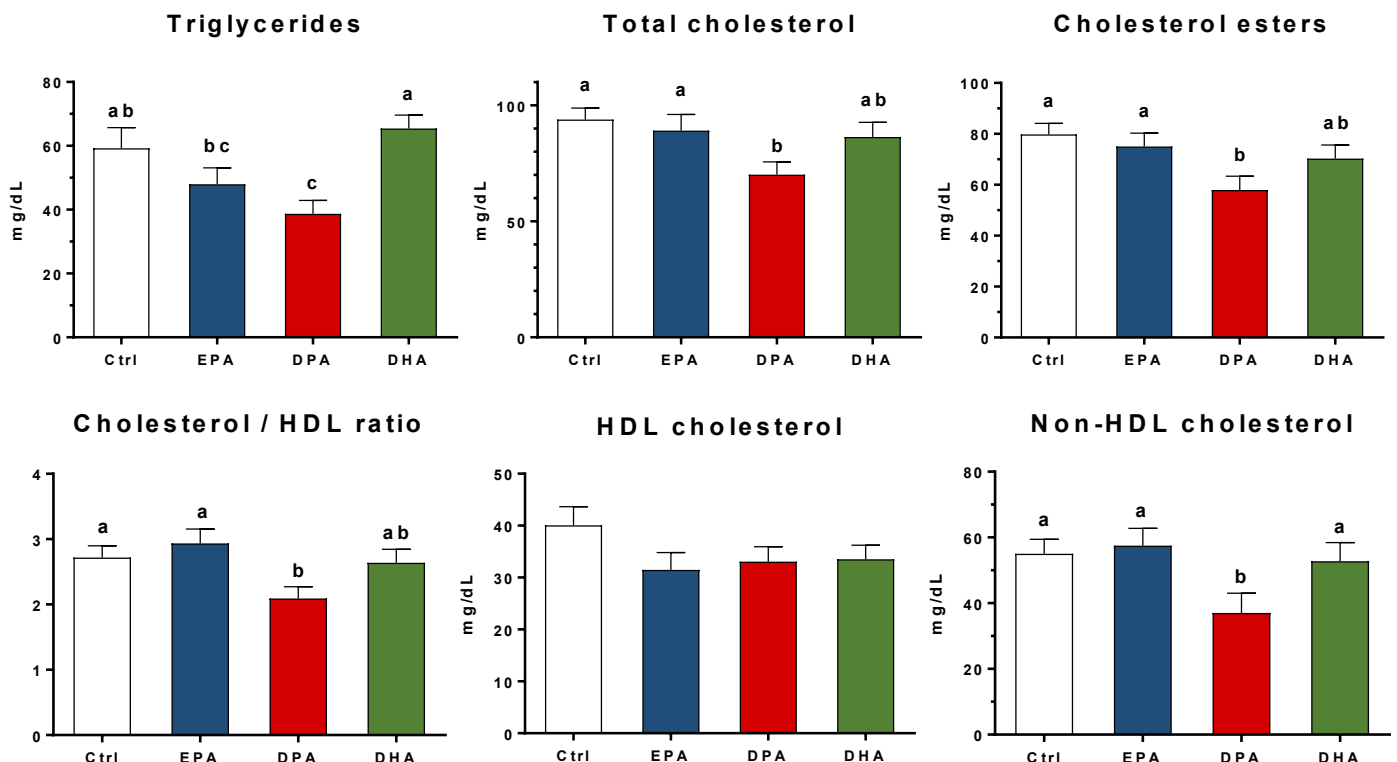


Figure 1. Plasma lipid profile of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Different superscript letters indicate a significant difference between groups following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$).

3 Results

3.1 Animals, food intake, and n-3 fatty acids excretion

At the end of the experiment, animals supplemented with DHA had a body weight gain and a final body weight higher than the control group but did not differ from EPA and DPA supplemented groups (Table 2). The weight of the kidney was increased in DPA group only compared to control and did not differ from EPA and DHA groups. No difference was observed between groups for the other organ weights. All food and n-3 FA intake measurements did not differ between groups and the supplemented animals consumed between 7.5 and 7.8 mg/day/kg.bw during the 6 weeks of the experiment.

We collected and analyzed feces to estimate the digestibility of EPA, DPA, and DHA as ethyl esters during the last week of the study (Table 2). No difference was observed between animals for feces weight. The mass of ALA found in feces in the control group was higher than in supplemented groups. The amount of EPA found in feces in the EPA group was lower than the amount of DHA found in feces in the DHA group and more lower than the amount of DPA found in feces in the DPA group. Finally, the estimated digestibility of supplemented-PUFA was higher in DPA and DHA groups than in EPA group. However, more than 95% of the total n-3 FA intake were digested for all groups.

3.2 DPA supplementation decreased plasma lipids

The DPA supplementation was the only one which led to a decrease in plasma triglycerides, total cholesterol, non-HDL-cholesterol, cholesterol esters and total cholesterol / HDL-cholesterol ratio compared to control group (Figure 1). The EPA group exhibited a plasma triglycerides concentration intermediate between control and DPA groups but the differences were not significant between EPA and control groups. The DHA group exhibited plasma total cholesterol, cholesterol esters concentrations and cholesterol / HDL-cholesterol ratio intermediate between control and DPA groups but the differences were not significant between DHA and control groups. No difference was observed between the groups in plasma HDL-cholesterol (Figure 1) and free-cholesterol concentrations (Appendix A).

3.3 DPA supplementation increased antioxidant status and aspartate transaminase activity

Compared to the control group, all supplemented groups had increased plasma total antioxidant status and superoxide dismutase activity in the same way, (Figure 2). However, no difference was observed between groups for glutathione peroxidase activities (Figure 2) and plasma

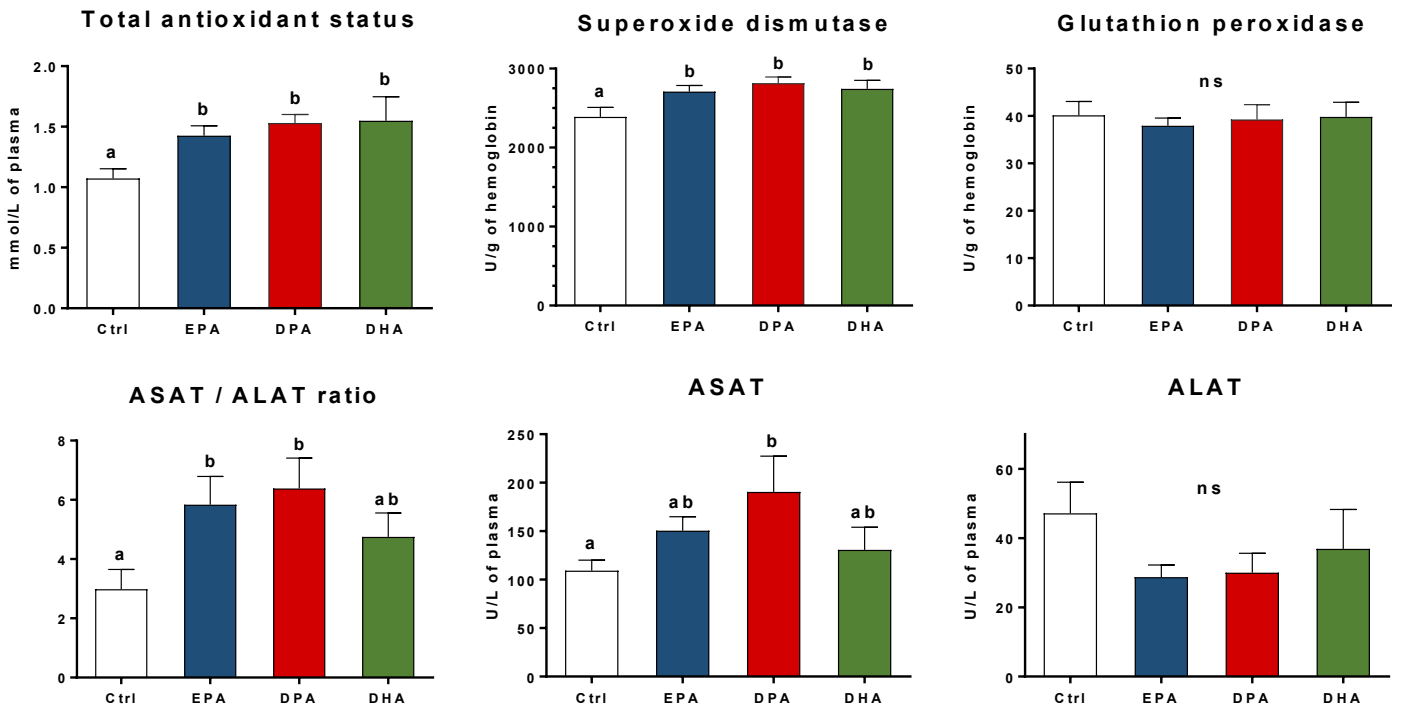


Figure 2. Antioxidant status, plasma aspartate transaminase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) activities of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Superoxide dismutase activity was assayed in erythrocytes and glutathione peroxidase activity in whole blood. Different superscript letters indicate a significant difference between groups following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$).

malondialdehyde concentrations (Appendix A). The ASAT/ALAT ratio increased in DPA and EPA groups compared to control group. However, the plasma ASAT activity increased in DPA group only but did not differ from EPA and DHA groups. The plasma ALAT activity was not affected by the diets (Figure 2). Moreover, plasma cytokines, creatinine, and urine creatinine concentrations were not different between the four groups (Appendix A).

3.4 DPA supplementation affected tissue fatty acid composition in a similar manner than EPA

3.4.1 Impact of n-3 PUFA supplementations on overall tissue fatty acid composition

The global impact of the diets on FA composition of tissues was assessed using RDA. All identified FA composing brain, heart, kidney, liver, lung, red blood cells, splenocytes and spleen were first included in the RDA model (Figure 3. A-B). The model expressed 22.0% of the constrained variance. The EPA and DPA groups were not discriminated, showing a similar impact of EPA and DPA supplementations on FA tissue compositions. In contrast, the control and the DHA groups were significantly different from the three other groups (Figure 3. A). The first component expressed 51.6% of the constrained variance and significantly discriminated the three supplemented groups from the control group. All supplemented groups were positively discriminated by their EPA and DPA content (Figure 3 B). Conversely, the control group was positively associated with its content in arachidonic acid (C20:4 n-6), adrenic acid (C22:4 n-6) and n-6 docosapentaenoic acid (C22:5 n-6). The second component expressed 33.7% of the constrained variance and significantly discriminated the DHA group from all the other groups (Figure 3A). The DHA group only was positively correlated with DHA content in tissues (Figure 3B).

Then, only n-6 and n-3 PUFA were included in the model (Figure 3. C-D). The model expressed 33.1% of the constrained variance. The discrimination between groups (Figure 3. C) was similar to the model including total fatty acids (Figure 3. A). Conversely, all groups were different from each other, showing a discrimination between EPA and DPA groups (Figure 3. C). The difference between EPA and DPA groups was positively associated with EPA and DPA tissue content, respectively (Figure 3. D). All the Pearson correlation coefficient tests are presented in Appendix B.

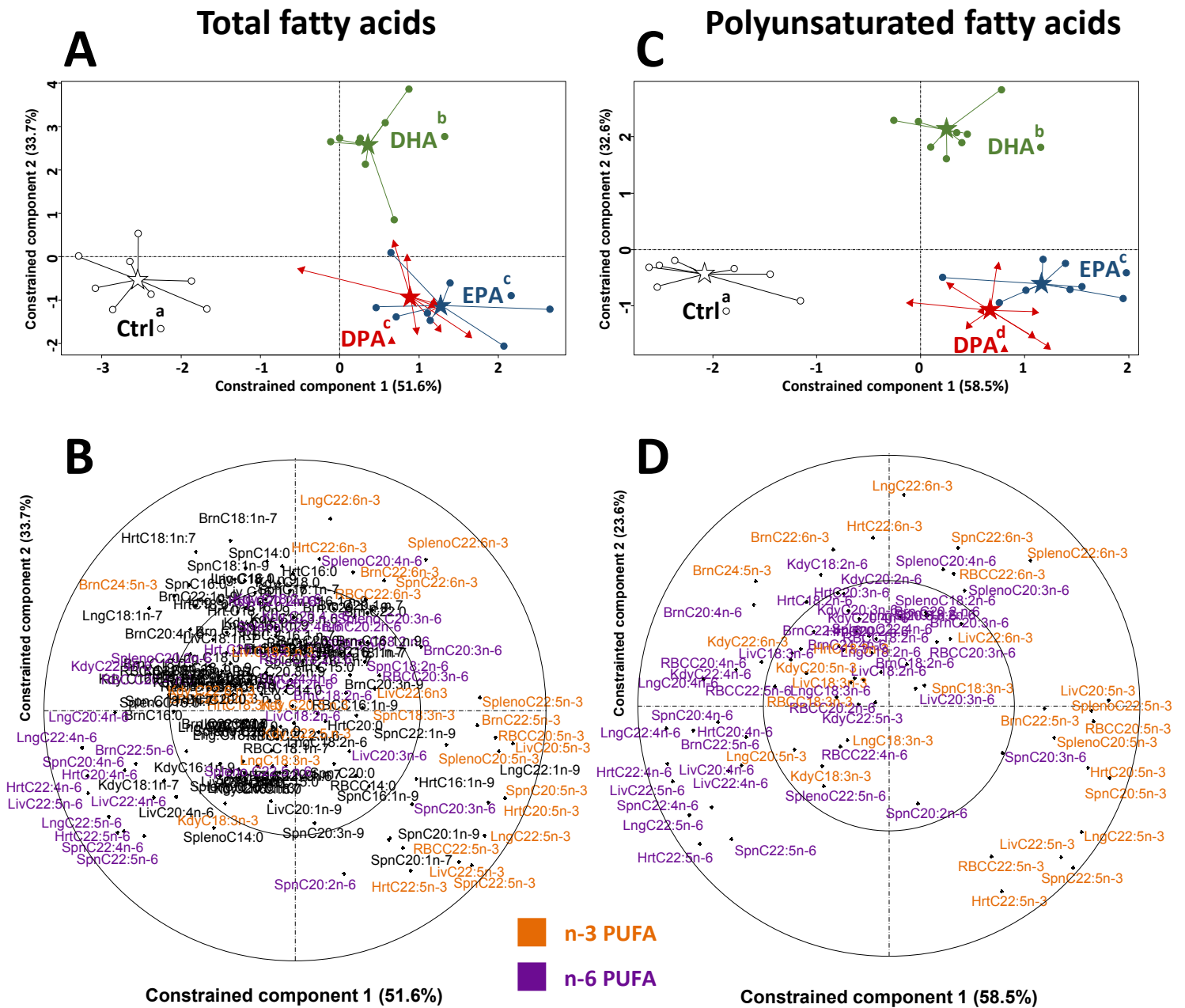


Figure 3. Redundancy analysis of fatty acid compositions of brain (Brn), heart (Hrt), kidney (Kdy), liver (Liv), lung, red blood cells (RBC), splenocytes (spleno) and spleen (Spn) of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA) (●), docosapentaenoic acid (DPA) (▲), docosahexaenoic acid (DHA) (●) or not supplemented (Ctrl) (o) for 6 weeks. Scatter plots showed individuals scores for total fatty acids (A) and polyunsaturated fatty acids (C) included in the models, expressing 22.0% (A-B) and 33.1% (C-D) of the total constrained variance. The ★ represented barycenter of each group of rats. A permutation test was used to consider the significance of the model ($\alpha=0.05$, $p<0.001$ for all constrained components). This test was followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination to assess the significance between the 4 groups for the global model; different superscript letters on group labels indicate a significant difference between groups ($p<0.05$). For both models, EPA, DPA, and DHA groups were significantly different from the control group for the component 1 (horizontal). For the component 2, only DHA differed from all other groups. Loadings plots showed correlation coefficient between FA data of each tissue and individual scores for total fatty acids (B) and polyunsaturated fatty acids (D) included in the model. A Pearson correlation coefficient test was used to test the significance of FA for each component (See Appendix C).

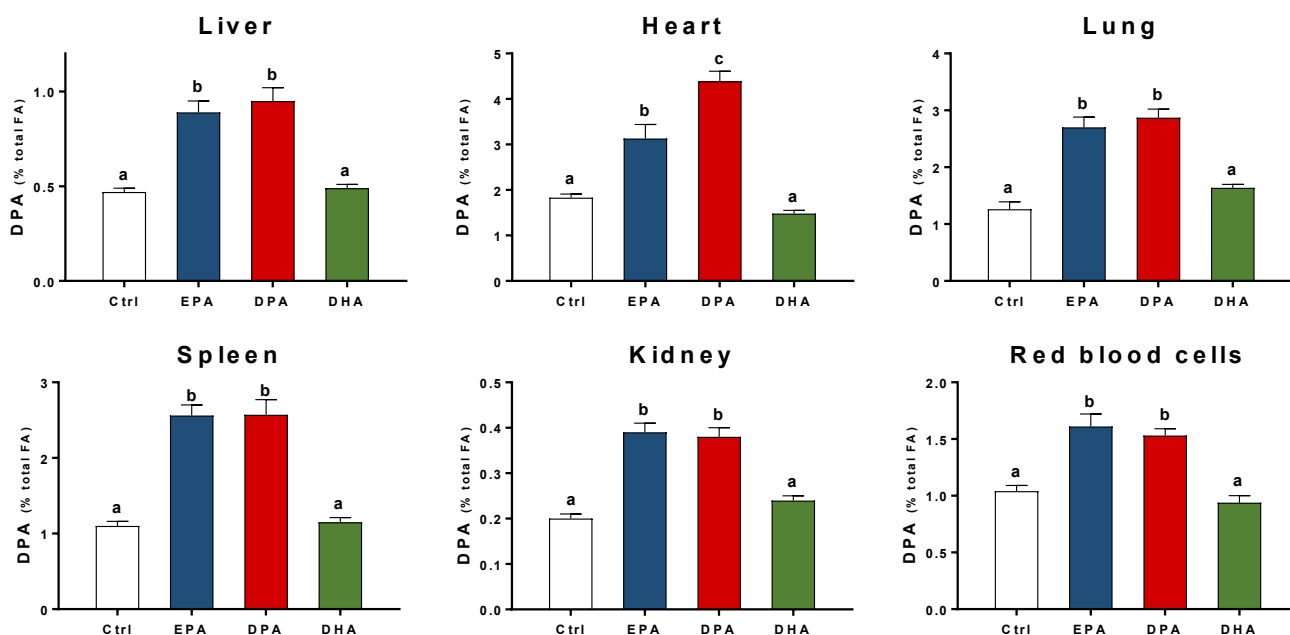


Figure 4: Docosapentaenoic acid (DPA, C22:5 n-3) status in tissues of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Different superscript letters indicate a significant difference between groups following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). FA: fatty acids

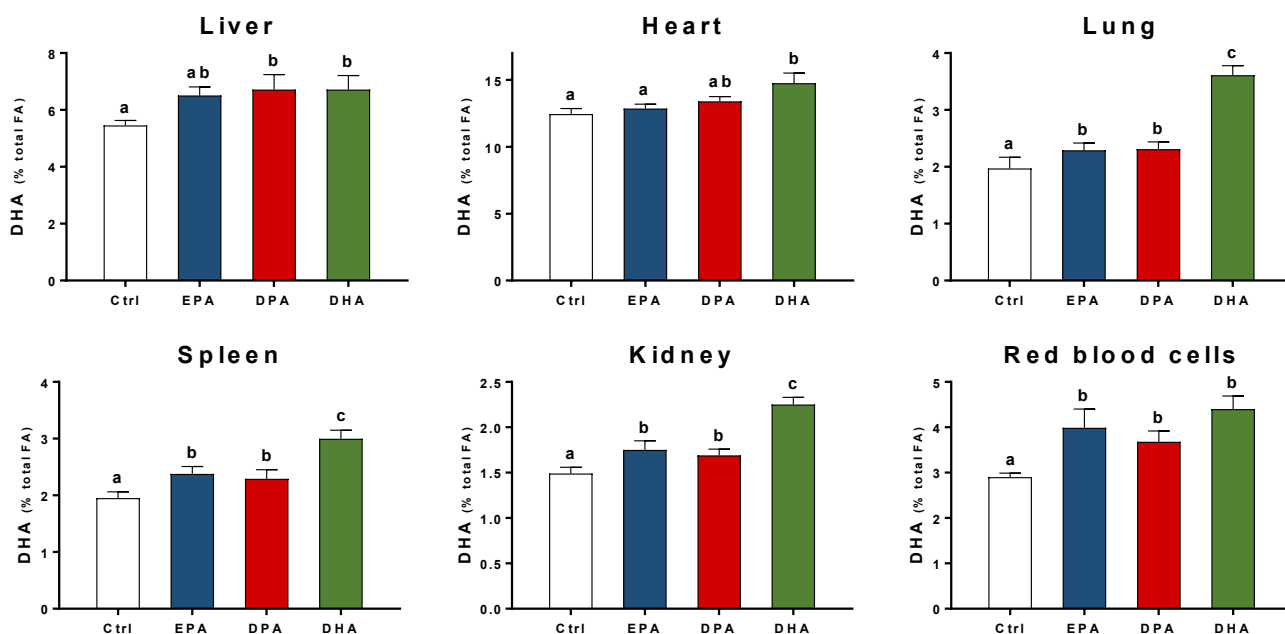


Figure 5: Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) status in tissues of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Different superscript letters indicate a significant difference between groups following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). FA: fatty acids

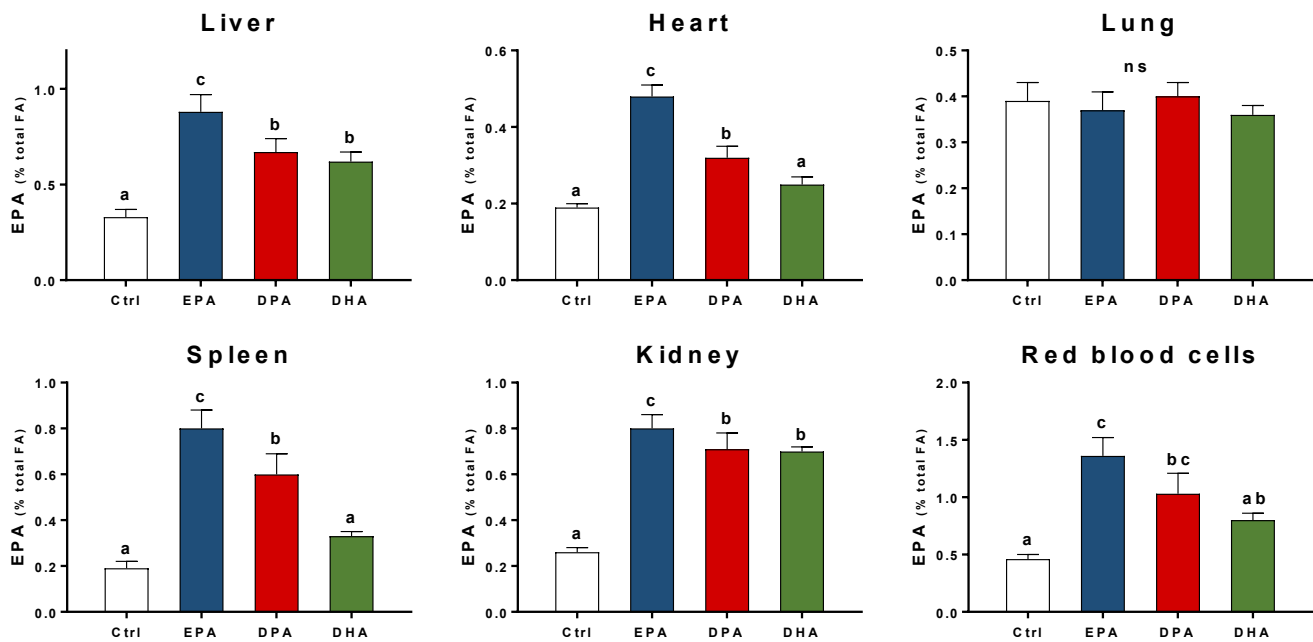


Figure 6: Eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3) status in tissues of rats supplemented with % eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Different superscript letters indicate a significant difference between groups following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). FA: fatty acids; ns: non-significant

Table 3. Percentage of apparent retroconversion of DPA and DHA into EPA

	DPA to EPA in the DPA group	DHA to EPA in the DHA group
Liver	38.5 ±4.5	21.0 ±5.1
Heart	5.1 ±1.4	3.4 ±1.6
Lung	nd	nd
Spleen	20.2 ±4.1	14.0 ±3.3
Kidney	68.6 ±2.2	37.3 ±1.7
Brain	nd	nd

Values are mean ± SEM. The * represents significant difference between DPA and DHA respective retroconversion for each tissue.

DPA: n-3 docosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; nd: not detected

3.4.2 Impact of *n*-3 PUFA supplementations on *n*-3 fatty acids tissue contents

To further underline the differences in FA tissue contents following supplementations, we then considered independently each PUFA tissue composition (see Appendix B for tables of complete tissue FA profiles). As the FA composition of the brain remained slightly affected by the different supplementations (see Appendix C), this tissue was not included in Figures 4; 5; 6 and the complete fatty acid composition was available in Appendix D – Table 7.

The DPA tissue contents (Figure 4) observed in the control group were as follows: the highest DPA levels were found in the heart (1.8%), lung (1.3%), spleen (1.1%), RBC (1.0%), liver (0.5%) and finally in the kidney (0.2%). Compared to the similar values observed in the control and DHA groups, both DPA and EPA supplementation increased the DPA content in a same extend in the liver (x1.9-fold), the lung (x1.9-fold), the spleen (x2.3-fold), the kidney (x1.7-fold) and RBC (x1.6-fold). Especially in the heart, the increase in DPA content was higher for the DPA group (x2.6-fold) than for the EPA group (x1.9-fold) as compared to both control and DHA groups. The DHA supplementation did not affect the DPA tissue content compared to control group.

The DHA tissue contents (Figure 5) observed in the control group were as follows: the highest DHA levels were found in the heart (12.5%), then in the liver (5.5%), RBC (2.9%), lung (2.0%), spleen (1.9%) and finally in the kidney (1.5%). In the liver, the DPA supplementation increased DHA content at the same level than the DHA supplementation (x1.2-fold), while the EPA supplementation tended to increase DHA content but was not significantly different from the control group. In the heart, only the DHA supplementation increased the DHA content compared to control and EPA groups. However, the heart DHA content of the DPA group was intermediate and not significantly different from the DHA and EPA groups. Both DPA and EPA groups increased the DHA content in the lung (x1.2-fold), spleen (x1.2-fold) and kidney (x1.2-fold) compared to control group. However, the DHA content in DPA and EPA groups remained lower than in the DHA group for these tissues. In RBC, the three supplemented groups increased their DHA content compared to the control group and did not differ between them (x1.4-fold).

The EPA tissue contents (Figure 6) observed in the control group were always lower than DHA and DPA contents in all studied tissues, in a range of proportions from 0.2% in the spleen to 1.3% in RBC. Following both the EPA and DPA supplementations, the EPA content increased in liver, heart, spleen, kidney, and RBC but not in the lung. The increase in EPA content was

Table 4. n-6 fatty acids content in tissues

% total FA				
	Ctrl	EPA	DPA	DHA
LA (C18:2 n-6)				
Liver	9.37 ±0.27	10.12 ±0.63	10.18 ±0.25	9.67 ±0.42
Heart	15.04 ±0.34	15.55 ±0.47	14.36 ±0.22	15.21 ±0.31
Lung	4.89 ±0.22	5.42 ±0.22	4.97 ±0.11	5.00 ±0.16
Spleen	6.39 ^a ±0.13	7.06 ^b ±0.17	7.01 ^b ±0.21	6.95 ^b ±0.17
Kidney	9.29 ^a ±0.26	10.80 ^b ±0.33	10.54 ^b ±0.31	10.62 ^b ±0.13
RBC	8.22 ±0.27	9.00 ±0.57	7.90 ±0.31	8.61 ±0.89
ARA (C20:4 n-6)				
Liver	14.05 ^a ±0.54	11.76 ^b ±0.73	11.77 ^b ±0.90	10.77 ^b ±0.68
Heart	20.94 ^a ±0.33	18.86 ^b ±0.57	19.01 ^b ±0.26	17.60 ^c ±0.42
Lung	13.56 ^a ±0.37	12.51 ^b ±0.43	12.88 ^b ±0.31	12.79 ^b ±0.32
Spleen	19.74 ^a ±0.65	17.95 ^b ±0.27	17.40 ^b ±0.44	16.97 ^b ±0.78
Kidney	23.00 ±1.22	20.77 ±0.95	21.52 ±0.93	22.95 ±0.73
RBC	21.55 ±0.76	18.73 ±0.97	18.32 ±1.03	19.21 ±1.43
AdA (C22:4 n-6)				
Liver	0.19 ^a ±0.01	0.15 ^b ±0.01	0.16 ^b ±0.01	0.13 ^b ±0.01
Heart	0.91 ^a ±0.03	0.54 ^b ±0.02	0.60 ^b ±0.02	0.52 ^b ±0.03
Lung	2.89 ^a ±0.24	2.04 ^b ±0.15	2.27 ^b ±0.11	2.18 ^b ±0.07
Spleen	2.12 ^a ±0.08	1.60 ^b ±0.06	1.56 ^b ±0.08	1.33 ^c ±0.09
Kidney	0.40 ^a ±0.02	0.32 ^b ±0.02	0.30 ^b ±0.02	0.34 ^b ±0.02
RBC	0.67 ±0.03	0.74 ±0.10	0.66 ±0.04	0.58 ±0.07
n-6 DPA (C22:5 n-6)				
Liver	0.19 ^a ±0.01	0.08 ^b ±0.01	0.11 ^b ±0.01	0.08 ^b ±0.01
Heart	0.86 ^a ±0.06	0.31 ^c ±0.03	0.53 ^b ±0.03	0.24 ^c ±0.02
Lung	0.25 ^a ±0.03	0.12 ^b ±0.01	0.16 ^b ±0.02	0.12 ^b ±0.01
Spleen	0.24 ^a ±0.01	0.15 ^b ±0.01	0.19 ^b ±0.02	0.12 ^b ±0.01
Kidney	Tr	Tr	Tr	Tr
RBC	0.40 ±0.05	0.29 ±0.08	0.31 ±0.03	0.32 ±0.08

Proportions of linoleic acid (LA, C18:2n-6), arachidonic acid (ARA, C20:4n-6), adrenic acid (AdA, C22:4n-6) and n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA, C22:5n-6) in tissues of rats supplemented or not with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Values are mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant differences between groups for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). RBC: Red blood cells.

Table 5. n-3 and n-6 fatty acid contents in splenocytes and peripheral blood mononuclear cells

% total fatty acids	Splenocytes				↔	Peripheral blood mononuclear cells			
	Ctrl	EPA	DPA	DHA		Ctrl	EPA	DPA	DHA
Σ n-3	1,65 ^a ±0.22	3,51 ^b ±0.35	3,26 ^b ±0.39	3,32 ^b ±0.23	***	1,55 ^a ±0.09	2,16 ^b ±0.25	2,02 ^b ±0.23	1,98 ^b ±0.13
DHA	0,76 ^a ±0.08	1,24 ^b ±0.08	1,30 ^b ±0.16	1,88 ^c ±0.16	***	0,55 ^a ±0.03	0,66 ^{ab} ±0.09	0,71 ^{ab} ±0.07	0,80 ^b ±0.06
DPA	0,59 ^a ±0.05	1,55 ^c ±0.18	1,46 ^c ±0.14	1,10 ^b ±0.11	***	0,35 ^a ±0.03	0,66 ^b ±0.10	0,62 ^b ±0.10	0,44 ^{ab} ±0.05
EPA	0,31 ^a ±0.14	0,71 ^b ±0.15	0,50 ^{ab} ±0.12	0,35 ^{ab} ±0.03	*	0,16 ^a ±0.03	0,43 ^b ±0.09	0,29 ^{ab} ±0.06	0,26 ^a ±0.03
ALA	Tr	Tr	Tr	Tr	***	0,49 ±0.07	0,41 ±0.05	0,40 ±0.11	0,48 ±0.03
Σ n-6	19,16 ^a ±0.83	21,33 ^{ab} ±0.96	20,10 ^a ±0.87	23,77 ^b ±1.32	***	19,18 ^a ±1.03	15,99 ^b ±1.32	14,87 ^b ±1.78	17,59 ^{ab} ±1.73
n-6 DPA	0,29 ^{ab} ±0.04	0,24 ^a ±0.04	0,34 ^b ±0.07	0,19 ^a ±0.03	*	0,13 ±0.03	0,26 ±0.08	0,25 ±0.07	0,12 ±0.02
ADA	1,35 ±0.14	1,47 ±0.10	1,14 ±0.15	1,57 ±0.13	*	1,41 ^a ±0.11	1,00 ^b ±0.10	1,00 ^b ±0.11	1,26 ^{ab} ±0.13
ARA	10,34 ±0.91	11,78 ±0.62	11,27 ±0.67	12,67 ±0.97	**	10,56 ±0.56	8,84 ±1.17	8,55 ±0.99	10,39 ±1.15
LA	5,38 ±0.59	6,02 ±0.32	5,81 ±0.10	6,47 ±0.39		6,69 ±0.97	5,48 ±0.55	4,77 ±0.68	5,40 ±0.51

Proportions of sum of n-3 fatty acids (Σ n-3), docosahexaenoic acid (DHA), n-3 docosapentaenoic acid (DPA), eicosapentaenoic acid (EPA), α-linolenic acid (ALA), sum of n-6 fatty acids (Σ n-6), n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA), adrenic acid (ADA), arachidonic acid (ARA) and linoleic acid (LA) of rats supplemented or not with 1% EPA, DPA or DHA for 6 weeks. Values are mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant differences between groups for each tissue for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). The * in the centered column represents significant differences between the splenocytes and PBMC for all groups following two-way ANOVA (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

higher in EPA supplemented group than in DPA group, except in RBC where the EPA content in DPA group was not significantly different from EPA group. The DHA supplementation increased EPA content in liver and kidney only, at the same level than the DPA group.

The apparent retroconversion of DPA into EPA was higher in the kidney (68.6%) and in the liver (38.5%) compared to spleen (20.2%) and heart (5.1%) (Table 3). In addition, DHA retroconversion into EPA was also higher in the kidney (37.3%) and liver (21.0%) than in spleen (12.0%) and heart (3.4%) (Table 3). On the other hand, the apparent retroversion of DHA into EPA was lower than the retroconversion of DPA into EPA in the liver and the kidney. Moreover, both DPA and DHA apparent retroconversions into EPA were not detected in the lung and the brain.

The overall ALA content was not affected in studied tissues (see AppendixD).

3.4.3 Impact of n-3 PUFA supplementations on n-6 fatty acids tissue contents

Concerning n-6 PUFA content in tissues (Table 4), EPA, DPA and DHA supplementation decreased n-6 PUFA tissue contents and increased the n-6 PUFA precursor (LA). The arachidonic acid (C20:4 n-6) content decreased in liver, heart, lung, and spleen in all supplemented groups and at the same level for all tissues except for the heart where arachidonic acid decreased more in the DHA group than in the EPA and DPA groups. The adrenic acid (C22:4 n-6) content also decreased in liver, heart, lung, spleen, and kidney in all supplemented groups and at the same level, except in the spleen where adrenic acid decreased more in the DHA group than in the EPA and DPA groups. The n-6 DPA (C22:5 n-6) content decreased in liver, heart, lung, and spleen in all supplemented groups and at the same level, except in the heart where n-6 DPA decreased more in the DHA group than in the EPA and DPA groups. Finally, the LA content increased in the spleen and in the kidney in all supplemented groups.

3.5 DPA supplementation affected whole blood cells and splenocytes

We first focused on white blood cells from the whole blood, as PBMC, and from the spleen, as splenocytes. The amount of each n-3 PUFA was higher in the splenocytes than in PBMC (Table 5). DHA content increased in splenocytes in all supplemented group compared to control group, and more for DHA group than for EPA and DPA groups. In PBMC, the DHA content increased only in the DHA group. Conversely, DPA content increased in DPA and EPA groups in splenocytes

Table 6. Complete blood count, white blood cell, and splenocyte subpopulations

Diets	Ctrl	EPA	DPA	DHA
Complete blood count				
RBC ($10^6/\mu\text{L}$) ¹	7.8 ^a ±0.1	7.7 ^a ±0.1	8.2 ^b ±0.1	8.3 ^b ±0.1
Hemoglobin (g/dL)	14.7 ^a ±0.4	15.2 ^{ab} ±0.1	15.6 ^b ±0.1	15.6 ^b ±0.2
Hematocrit (%)	44.5 ^a ±0.8	44.8 ^a ±0.7	47.1 ^b ±0.4	45.9 ^{ab} ±0.6
MCV (fL) ²	57.4 ±0.7	57.0 ±0.6	56.5 ±0.6	56.3 ±0.9
Platelets ($10^6/\mu\text{L}$)	559 ^a ±79	670 ^{ab} ±20	660 ^{ab} ±17	747 ^b ±13
WBC ($10^3/\mu\text{L}$) ³	6.3 ±1.4	9.2 ±1.0	7.2 ±1.5	7.6 ±1.1
White blood cell subpopulations				
Lymphocytes (%)	80.6 ±0.9	78.1 ±2.8	79.1 ±1.3	81.0 ±2.1
Monocytes (%) ⁴	0.2 ±0.0	0.3 ±0.1	0.2 ±0.1	0.2 ±0.1
Neutrophils (%)	18.3 ±0.9	19.5 ±2.5	17.9 ±1.9	17.8 ±2.1
Eosinophils (%)	0.9 ±0.1	0.8 ±0.1	2.7 ±1.7	0.9 ±0.1
Basophils (%)	0.0 ±0.0	1.2 ±0.9	0.1 ±0.1	0.2 ±0.2
Splenocyte subpopulations				
Lymphocytes: CD3 ⁺ (%)	58.9 ^a ±3.1	47.5 ^b ±2.5	52.3 ^{ab} ±4.1	45.0 ^b ±2.4
T-lymphocytes CD4 ⁺ (%)	40.0 ^a ±3.0	34.6 ^b ±1.6	36.6 ^{ab} ±2.5	31.8 ^b ±1.7
T-lymphocytes CD8 ⁺ (%)	18.9 ^a ±2.3	12.9 ^b ±1.1	15.7 ^{ab} ±1.8	13.2 ^b ±1.0
B-lymphocytes CD45RA ⁺ (%)	37 ^a ±3.1	47.7 ^b ±2.1	43.3 ^{ab} ±3.8	49.9 ^b ±2.5
Monocytes CD11b ⁺ (%) ⁴	4.1 ±0.2	4.8 ±0.6	4.4 ±0.5	5.1 ±0.8

Whole blood and purified splenocytes of rats supplemented or not with 1% EPA, DPA or DHA for 6 weeks were analyzed after blood and organs collection. Values are mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant differences between groups for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). ¹ Red blood cells ² Mean corpuscular volume ³ White blood cells ⁴ Including macrophages

and PBMC, while DHA group exhibited an intermediate status between the control group and DPA group in splenocytes and did not differ from the control group in PBMC. The EPA content increased only in the EPA group compared to control. Concerning n-6 FA contents, no clear difference appeared in these cells among the four groups.

If we now consider complete blood count (Table 6), surprisingly, the number of RBC increased in whole blood in DPA and DHA groups compared to control group as well as hemoglobin concentration, and hematocrit increased in DPA group only. While the diets did not affect the number and the subpopulations of white blood cells, in splenocytes the proportion of total lymphocytes decreased from both EPA and DHA groups, including a decrease in all helper T cells, cytotoxic T cells and B cells subpopulations.

4 Discussion

Nowadays, only a few studies have examined the nutritional, physiological and biochemical effects of n-3 DPA in vivo. In the most part of available studies, DPA was administrated by gavage or was not pure [9,10,12,16,38–40]. This could be mainly due to the high cost and the limited availability of highly purified DPA nowadays [11,41,42]. We proposed in this study an innovative approach to purify n-3 DPA > 99% from fish oils enriched in n-3 PUFA by liquid chromatography in sufficient amount to perform in vivo studies (See section 2.2).

Recently, Guo & al. reported that DPA and DHA exerted similar effects in cardio-metabolic protection compared to EPA in a high-fat mouse model leading to a cardio-metabolic syndrome [39]. The aim of the present study was to evaluate the effects of DPA supplementation on different markers involved in the prevention of cardio-metabolic risk in healthy rats and compare them to the effects of EPA and DHA supplementation. We confirmed the good health of our animals by the very low cytokine levels as inflammatory markers and all measured parameters, which were in the range of values of healthy animals even for the control group, according to the Sprague Dawley rats supplier [43].

We first showed that the DPA supplementation was the only one, which decreased triglycerides, total cholesterol, as well as non-HDL cholesterol and total cholesterol / HDL-cholesterol ratio compared to control group. Moreover, the three supplementations (DPA, EPA and DHA) increased plasma total antioxidant status and superoxide dismutase activity in RBC. Thus, we suggest that

DPA could be involved in the regulation of markers of coronary heart diseases risk, and in a most efficient manner than EPA and DHA, according to some recent cohort study [44] and meta-analysis for the prevention of metabolic syndrome [45]. One recent “prescription-only omega-3 fatty acid agent” containing EPA and DPA but not DHA decreased plasma triglycerides and cholesterol more than EPA-EE supplementation [46]. These results are interesting and could be explained by the specific effect of the DPA supplementation on plasma lipids in our study. To our knowledge, the potential synergic effect of DPA supplementation with EPA or DHA has not been evaluated yet and it could be taken into account in further studies.

Several studies describe that dietary DHA intake decreases plasma cholesterol [47]. In our conditions, we did not confirm these results. This apparent discrepancy could be explained first by the low level of cholesterol and triglycerides in all animals here [43]. Then, the differential hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of EPA and DHA still remain unclear in the literature [1,2,4,5]. However, in our study, the plasma cholesterol concentration tend to decrease in DHA-fed rats, and the triglycerides concentration tend to decrease in EPA-fed rats.

In addition, the decrease of triglycerides and cholesterol following DPA supplementation could be explained by the inhibition of the expression of genes and enzyme activities involved in lipogenesis in the liver. Indeed, some authors showed in db/db mice that a supplementation of (tri-)DPA decreased the hepatic activities of fatty acid synthase and malic enzymes [40]. Moreover, in FAO hepatoma cell line incubated with 50 μ M of DPA, EPA or DHA for 48 h, the mRNA expression levels of Sterol Regulating Element Binding Protein (SREBP), Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), 3-Hydroxy-3- Methyl-Glutaryl-Coenzyme A reductase, Acetyl Coenzyme A Carboxylase and Fatty Acid Synthase were decreased [48]. Unexpectedly, in our study the plasma activity of ASAT and the ASAT/ALAT ratio increased with the three supplementations, while we rather expected a decrease in the ratio and ALAT activity as previously described [49]. Nevertheless, the increase of ASAT activity has been previously showed in serum of rat supplemented with a high dose of n-3 PUFA [50], in our study both the ALAT and ASAT activities remained in the range of values found in healthy rats for all groups [43].

Interestingly, we also showed that DPA status differently increased in tissues of DPA-fed rats and this increase could be of physiological interest. Indeed, concerning the lung (x1.9 fold), one epidemiological study showed that n-3 DPA is the most potent fatty acid associated with better

forced expiratory volume [51]. Concerning the blood (x1.6 fold), a high n-3 DPA level in RBC was associated with a lower risk of metabolic syndrome in human adults [52,53]. Concerning the heart (2.6x fold), it has been shown that 50% of total DPA was mainly incorporated into phospholipids and principally in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine species in DPA-supplemented rats by oral gavage [54]. Nevertheless, no data shows whether the membrane enrichment of the heart with DPA into the phospholipid bilayer has the same effects than with EPA or DHA on the modulation of cell membrane properties and on the potential specific mechanisms involved in DPA cardio-protection [47]. Curiously, DPA supplementation did not affect the overall brain fatty acid composition in our experiment, but only increased brain DPA content. Moreover, some in vitro studies describe beneficial effects of DPA for this tissue [55]. These beneficial effects could be due more to the suggested effects of bioactive metabolites derived from DPA and recently discovered than from DPA itself [13].

We also showed that the DPA supplementation increased DPA content in splenocytes and PBMC and DHA content in splenocytes, cell families mainly composed of lymphocytes. Some studies showed that DPA supplementation is the more potent supplementation for resolving inflammation compared to DHA supplementation [56–58]. The suggested mechanism is the reduction of the secretion of pro inflammatory cytokines in a rheumatoid arthritis model [56] and the downregulation mRNA expression of pro-inflammatory factors in LPS-activated murine macrophage [57], maybe associated with some enzymatic or non-enzymatic metabolites derived from DPA [58]. Nevertheless, the action mechanisms and the specific effects of an increase of DPA into white blood cell membranes remain poorly known.

Considering now the n-3 PUFA conversion pathway, one could suggest that DPA could be a precursor for both DHA and even EPA. Indeed, It is well known that the PUFA conversion pathway was described as limited by the Δ -6 desaturase, the elongase-2 enzymes and the final step of β -peroxisomal oxidation involving in the PUFA conversion pathway [23]. The elongase-2 acts two times in PUFA conversion pathway, one time in association with the elongase-5 to convert EPA to DPA and another time to convert DPA to C24:5 n-3 [59]. Some authors showed that the elongase-2 enzyme could be the more limiting step to the conversion of n-3 DPA to DHA in rat liver [22]. As the direct supplementation with n-3 DPA shunted the contribution of the elongase-2 for converting EPA to n-3 DPA, one could hypothesize that n-3 DPA could be a good precursor for

DHA or to act as an *in vivo* stock of DHA [60]. We showed a significant increase in the DHA content in liver of DPA-fed rats at the same level than DHA-fed rats and a slight increase of DHA in the heart and RBC.

Moreover, the DPA supplementation increased EPA status and the EPA supplementation increased DPA status, showing that these PUFA were interconverted *in vivo* and that DPA could also be a source of EPA by retroconversion. Recently, the DPA apparent retroconversion to EPA was described *in vitro* [62] and *in vivo* [63], indicating that DPA involved the peroxisomal acyl-CoA oxidase, like the DHA retroconversion into EPA [64]. Our results showed that a large part of the DPA content was retroconverted into EPA in the liver (38.5%) and to a larger extent in the kidney (68.6%) (Table 3). These results are in accordance with some short-term DPA supplementation studies, as concerns the higher retroconversion found in the kidney [54]. The retroconversion of DHA into EPA was also well described [61]. We showed that the apparent retroconversion of DPA was higher than that of DHA in liver and kidney. This could partly explained the only slight increase in DHA after DPA supplementation. It could also explained that the overall FA tissue composition of DPA-fed rats was similar to that of EPA-fed rats by considering either complete FA profile or PUFA tissue contents (Figure 3).

As expected, the three supplementations decreased the content in the n-6 PUFA arachidonic acid, adrenic acid and n-6 DPA, surely associated with the competition effect between n-3 and n-6 PUFA for the Δ -6, Δ -5 desaturases and elongase-2 enzymes which act in the synthesis of n-6 DPA from linoleic acid [65].

In our study, the supplemented n-3 PUFA intake were included directly in the kibble. In fact, the supplemented animals consumed around 7.6 mg/day of EPA-EE, DPA-EE or DHA-EE, which would correspond to an adult man to an intake of 56 mg/day. These amounts appear nutritional as the average human consumption of DPA is between 12 and 80 mg/day in European adults [8]. It is interesting to show that this current DPA intake was sufficient to have some specific effects compared to EPA and DHA intake, which did not have any effect on plasma lipid parameters in these nutritional and physiological conditions. We could thereby hypothesize that DPA could act in the same way but at smaller amount than EPA and DHA on the concentrations of these cardio-metabolic risk markers. However, to our knowledge, only one short-time study has been realized in humans with a pure supplementation in DPA [66]. In consequence, the level of evidence remains

insufficient to propose a specific nutritional recommendation for DPA, but to include DPA in the sum of n-3 PUFA recommendations, as henceforth done by some guideline.

The bioavailability of DPA-EE has not been addressed yet. We showed that the amount of DPA excreted in the DPA group (0.8% of the daily intake) was higher than the amount of EPA (0.2% of the daily intake) in the EPA group and then the amount of DHA (0.6% of the daily intake) in the DHA group. Moreover, no difference was found between groups in the total amount of lipids excreted (data not shown) and no clear difference was found in the delivery of n-3 PUFA in tissues for DPA and EPA groups, even if the DPA apparent digestibility was reduced. This could be explained by the fact that DPA is preserved from β -oxidation compared to EPA, as described by some authors [17]. This result is in accordance with some reports who showed a 4.6-fold increase in DPA excretion compared to EPA excretion in rats fed a semi-synthetic high fat pellet for 3 days containing 250mg/day of EPA or DPA under free fatty acid form [16]. Moreover, the limitation of our measure is that we did not use a metabolic cage or similar to collect feces, so the collected feces could be digested more than one time due to rat caecotrophy [67]. However, in our study, the 7.7 g/day of collected feces were similar to another using metabolic cage in rats [68].

5 Conclusion

A 1% DPA nutritional supplementation in healthy rats for 6 weeks decreased plasma cholesterol and triglycerides more than a supplementation with EPA or DHA. The DPA supplementation increased DHA in the liver at the same level than DHA supplementation but affected global FA tissue contents similarly to EPA supplementation. The digestibility of DPA was lower than EPA and DHA.

6 Acknowledgments

We would like to thank Morgan Lucas for his technical assistance. We are indebted to Gwenaël Jan, Jean-Jacques Dubois (STLO, Rennes, France) and to David Kouakou N’Goran (National Polytechnic Institute, Yamoussoukro, Ivory Coast) for their assistance with animal tissue sampling. The authors thank Xavier Blanc (UPAE, INRA Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the

lipid-free base necessary for the realization of the diets. We thank Laurent Deleurme (CytomeTRI, Biosit, Rennes, France) to realize the flow cytometry analysis. We also thank Jacques Portanguen (UMR Pegase, INRA, Rennes) and Michèle Marty (Regional center for the fight against cancer Eugène Marquis, Rennes, France) to give us free access to the equipment for plasma assays. We are grateful to Josephine Aronica for proofreading the English editing and academic writing of the paper.

7 Author contributions statement

GD, PL, CB, PG, PLR, DC, and VR contributed to the conception and design of the project. GD conducted the literature search, the experimentations, the acquisition and analysis of data, statistical analysis and wrote the first version of the manuscript. EG, PG realized whole blood counts. PL, DC, CB, VR, and EG contributed to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final work.

8 Conflict of interest statement

This work received financial support from Lactalis Group (Grant number: R2014-247, France). Baudry C. and Le Ruyet P. are employed by Lactalis group.

9 References

- [1] Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc* 2011;70:215–231. doi:10.1017/S0029665111000061.
- [2] Innes JK, Calder PC. The differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiometabolic risk factors: A systematic review. *Int J Mol Sci* 2018;19. doi:10.3390/ijms19020532.
- [3] Aursnes M, Tungen JE, Vik A, Colas R, Cheng CC, Dalli J, et al. Total Synthesis of the Lipid Mediator PD1 2013:4–10.
- [4] AbuMweis S, Jew S, Tayyem R, Agraib L. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid containing supplements modulate risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised placebo-control human clinical trials. *J Hum Nutr Diet* 2018;31:67–84. doi:10.1111/jhn.12493.
- [5] Alexander DD, Miller PE, Van Elswyk ME, Kuratko CN, Bylsma LC. A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Prospective Cohort Studies of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk. *Mayo Clin Proc* 2017;92:15–29. doi:10.1016/j.mayocp.2016.10.018.
- [6] Rhee JJ, Kim E, Buring JE, Kurth T. Fish Consumption, Omega-3 Fatty Acids, and Risk of Cardiovascular Disease. *Am J Prev Med* 2017;52:10–9. doi:10.1016/j.amepre.2016.07.020.
- [7] Rahmawaty S, Charlton K, Lyons-Wall P, Meyer BJ. Dietary Intake and Food Sources of EPA, DPA and DHA in Australian Children. *Lipids* 2013;48:869–77. doi:10.1007/s11745-013-3812-4.
- [8] Enti SCI, Opi FIC, On NI. Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid 2012;10:1–48. doi:10.2903/j.efsa.2012.2815.Available.
- [9] Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Prog Lipid Res* 2011;50:28–34. doi:10.1016/j.plipres.2010.07.004.

- [10] Kaur G, Guo XF, Sinclair AJ. Short update on docosapentaenoic acid: A bioactive long-chain n-3 fatty acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;19:88–91. doi:10.1097/MCO.0000000000000252.
- [11] Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol* 2015;27:79–82. doi:10.1002/lite.201500013.
- [12] Yazdi PG. A review of the biologic and pharmacological role of docosapentaenoic acid. *F1000Research* 2013. doi:10.12688/f1000research.2-256.v1.
- [13] Weylandt K-H. Docosapentaenoic acid derived metabolites and mediators – The new world of lipid mediator medicine in a nutshell. *Eur J Pharmacol* 2016;785:108–15. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.002.
- [14] Yamamura R, Shimomura Y. Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil. *J Am Oil Chem Soc* 1997;74:1435–40. doi:10.1007/s11746-997-0250-6.
- [15] Lin W, Wu FW, Yue L, Du QG, Tian L, Wang ZX. Combination of Urea Complexation and Molecular Distillation to Purify DHA and EPA from Sardine Oil Ethyl Esters. *J Am Oil Chem Soc* 2014;91:687–95. doi:10.1007/s11746-013-2402-1.
- [16] Ghasemi Fard S, Linderborg KM, Turchini GM, Sinclair AJ. Comparison of the bioavailability of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) in the rat. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2014;90:23–6. doi:10.1016/j.plefa.2013.10.001.
- [17] Kaur G, Molero JC, Weisinger HS, Sinclair AJ. Orally administered [14C]DPA and [14C]DHA are metabolised differently to [14C]EPA in rats. *Br J Nutr* 2013;109:441–448. doi:10.1017/S0007114512001419.
- [18] Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:17. doi:10.1051/rnd:2005047.
- [19] Brenna JT, Salem Jr. N, Sinclair AJ, Cunnane SC. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2009;80:85–91. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004.

- [20] Legrand P, Morise A, Kalonji E. Update of French nutritional recommendations for fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 2011;102:137–43. doi:10.1159/000327800.
- [21] Lin YH, Salem N. Whole body distribution of deuterated linoleic and α -linolenic acids and their metabolites in the rat. *J Lipid Res* 2007;48:2709–24. doi:10.1194/jlr.M700369-JLR200.
- [22] Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ. Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. *PLoS One* 2011;6:e29662. doi:10.1371/journal.pone.0029662.
- [23] Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2006;1763:1413–26. doi:10.1016/j.bbamer.2006.08.034.
- [24] Markworth JF, Kaur G, Miller EG, Larsen AE, Sinclair AJ, Maddipati KR, et al. Divergent shifts in lipid mediator profile following supplementation with n-3 docosapentaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *FASEB J* 2016;30:3714–25. doi:10.1096/fj.201600360R.
- [25] Dalli J, Colas RA, Serhan CN. Novel n-3 Immunoresolvents: Structures and Actions. *Sci Rep* 2013;3:1940. doi:10.1038/srep01940.
- [26] Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromatogr* 2015. doi:10.1002/bmc.3361.
- [27] ANSES. Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras. 2011.
- [28] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9.
- [29] Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:599–612. doi:10.1051/rnd:2005048.
- [30] Metherel AH, Henao JJA, Stark KD. EPA and DHA Levels in Whole Blood Decrease More Rapidly when Stored at -20 °C as Compared with Room Temperature, 4 and -75 °C. *Lipids* 2013;48:1079–91. doi:10.1007/s11745-013-3827-x.

- [31] Ametaj BN, Bobe G, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Effect of Sample Preparation, Length of Time, and Sample Size on Quantification of Total Lipids from Bovine Liver. *J Agric Food Chem* 2003;51:2105–10. doi:10.1021/jf0259011.
- [32] Delsal JL. New method of extraction of serum lipids by methylal. Application to micro-estimation of total cholesterol, phospho-aminolipins and proteins. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 1944;26:99–105.
- [33] Ezanno H, Beauchamp E, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver. *Eur J Lipid Sci Technol* 2015;117:281–90. doi:10.1002/ejlt.201400304.
- [34] Hervé MR, Nicolè F, Cao KL. *Multivariate Analysis of Multiple Datasets : a Practical Guide for Chemical Ecology* 2018. doi:<https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6>.
- [35] van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006;7:142. doi:10.1186/1471-2164-7-142.
- [36] Legendre Pierre & Legendre L. *Numerical Ecology*. *J Chem Inf Model* 1998;53:1689–99. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [37] Huang W, Zwimpfer E, Hervé MR, Bont Z, Erb M. Neighbourhood effects determine plant-herbivore interactions below-ground. *J Ecol* 2017;1–10. doi:10.1111/1365-2745.12805.
- [38] Poudyal H, Brown L. Should the pharmacological actions of dietary fatty acids in cardiometabolic disorders be classified based on biological or chemical function? *Prog Lipid Res* 2015;59:172–200. doi:10.1016/j.plipres.2015.07.002.
- [39] Guo X, Sinclair AJ, Kaur G, Li D. Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2017. doi:10.1016/j.plefa.2017.09.011.
- [40] Gotoh N, Nagao K, Onoda S, Shirouchi B, Furuya K, Nagai T, et al. Effects of Three Different Highly Purified n-3 Series Highly Unsaturated Fatty Acids on Lipid Metabolism in C57BL/KsJ-db/db Mice. *J Agric Food Chem* 2009;57:11047–54. doi:10.1021/jf9026553.

- [41] Mu H, Jin J, Xie D, Zou X, Wang X, Wang X, et al. Combined Urea Complexation and Argentated Silica Gel Column Chromatography for Concentration and Separation of PUFAs from Tuna Oil: Based on Improved DPA Level. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc* 2016;93:1157–67. doi:10.1007/s11746-016-2842-5.
- [42] Yamamura R, Shimomura Y. Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil. *J Am Oil Chem Soc* 1997;74:1435–40. doi:10.1007/s11746-997-0250-6.
- [43] Janvier. Sprague Dawley rat research models. *Fiche Res Model* 2013:2013.
- [44] Del Gobbo LC, Imamura F, Aslibekyan S, Marklund M, Virtanen JK, Wennberg M, et al. ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern Med* 2016. doi:10.1001/jamainternmed.2016.2925.
- [45] Guo X, Li X, Shi M, Li D. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients* 2017;9:703. doi:10.3390/nu9070703.
- [46] Maki KC, Bobotas G, Dicklin MR, Huebner M, Keane WF. Effects of MAT9001 containing eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid, compared to eicosapentaenoic acid ethyl esters, on triglycerides, lipoprotein cholesterol, and related variables. *J Clin Lipidol* 2017;11:102–9. doi:10.1016/j.jacl.2016.10.010.
- [47] Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiol* n.d. doi:10.1016/j.jjcc.2015.08.002.
- [48] Kaur G, Sinclair A, Cameron-Smith D. Docosapentaenoic acid (22: 5n-3) down-regulates the expression of genes involved in fat synthesis in liver cells. 2011.
- [49] Guo X fei, Sinclair AJ, Kaur G, Li D. Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2017. doi:10.1016/j.plefa.2017.09.011.
- [50] Ketsa O V., Marchenko MM. [The effect of diet ratio of polyunsaturated fatty acids of omega-3 and omega-6 families on activity of aminotransferases and gamma-glutamyltransferase in rat blood serum]. *Vopr Pitan* 2014;83:27–32.

- [51] Leng S, Picchi MA, Wu G, Belinsky SA. Dietary nutrients associated with preservation of lung function in Hispanic and non-Hispanic white smokers from New Mexico 2017:1–11. doi:10.2147/COPD.S142237.
- [52] Dai X, Chen Y, Zeng F, Sun L, Chen C, Su Y. Association between n-3 polyunsaturated fatty acids in erythrocytes and metabolic syndrome in Chinese men and women. *Eur J Nutr* 2015. doi:10.1007/s00394-015-0912-3.
- [53] Skulas-Ray AC, Flock MR, Richter CK, Harris WS, West SG, Kris-Etherton PM. Red blood cell docosapentaenoic acid (DPA n-3) is inversely associated with triglycerides and C-reactive protein (CRP) in healthy adults and dose-dependently increases following n-3 fatty acid supplementation. *Nutrients* 2015;7:6390–404. doi:10.3390/nu7085291.
- [54] Holub BJ, Swidinsky P, Park E. Oral docosapentaenoic acid (22:5n-3) is differentially incorporated into phospholipid pools and differentially metabolized to eicosapentaenoic acid in tissues from young rats. *Lipids* 2011;46:399–407. doi:10.1007/s11745-011-3535-3.
- [55] Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci* 2015;7. doi:10.3389/fnagi.2015.00052.
- [56] Morin C, Blier PU, Fortin S. Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potent than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Res Ther* 2015;17. doi:10.1186/s13075-015-0653-y.
- [57] Tian Y, Katsuki A, Romanazzi D, Miller MR, Adams SL, Miyashita K, et al. Docosapentaenoic acid (22:5n-3) Downregulates mRNA Expression of Pro-inflammatory Factors in LPS-activated Murine Macrophage Like RAW264.7 Cells. *J Oleo Sci* 2017. doi:10.5650/jos.ess17111.
- [58] Dalli J, Colas RA, Serhan CN. Novel n-3 Immunoresolvents: Structures and Actions. *Sci Rep* 2013;3:1940. doi:10.1038/srep01940.

- [59] Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 2006;45:237–49. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004.
- [60] Du Q, Martin J-C, Agnani G, Pages N, Leruyet P, Carayon P, et al. Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats. *J Nutr Biochem* 2012;23:1573–82. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.011.
- [61] Metherel AH, Chouinard-Watkins R, Trépanier M-O, Lacombe RJS, Bazinet RP. Retroconversion is a minor contributor to increases in eicosapentaenoic acid following docosahexaenoic acid feeding as determined by compound specific isotope analysis in rat liver. *Nutr Metab (Lond)* 2017;14:75. doi:10.1186/s12986-017-0230-2.
- [62] Morin C, Rousseau É, Fortin S. Anti-proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride in colorectal carcinoma cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2013;89:203–13. doi:10.1016/j.plefa.2013.07.004.
- [63] Kaur G, Begg DP, Barr D, Garg M, Cameron-Smith D, Sinclair AJ. Short-term docosapentaenoic acid (22 : 5 n-3) supplementation increases tissue docosapentaenoic acid, DHA and EPA concentrations in rats. *Br J Nutr* 2010;103:32–37. doi:10.1017/S0007114509991334.
- [64] Christensen E, Woldseth B, Hagve TA, Poll-The BT, Wanders RJ, Sprecher H, et al. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1993;215:61–74.
- [65] Tosi F, Sartori F, Guarini P, Olivieri O, Martinelli N. Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease, Springer, Cham; 2014, p. 61–81. doi:10.1007/978-3-319-07320-0_7.
- [66] Miller E, Kaur G, Larsen A, Loh SP, Linderborg K, Weisinger HS, et al. A short-term n-3 DPA supplementation study in humans. *Eur J Nutr* 2013;52:895–904. doi:10.1007/s00394-012-0396-3.

[67] Sukemori S, Ikeda S, Kurihara Y, Ito S. Amino acid, mineral and vitamin levels in hydrous faeces obtained from coprophagy-prevented rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2003;87:213–20. doi:10.1046/j.1439-0396.2003.00415.x.

[68] Eriksson E, Royo F, Lyberg K, Carlsson H-E, Hau J. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. *Exp Physiol* 2004;89:427–33. doi:10.1113/expphysiol.2004.027656.

3 Discussion générale, conclusion et perspectives des parties 1 et 2

Les objectifs des parties I et II étaient d'étudier l'impact d'une supplémentation en DPA sur le métabolisme des acides gras et les profils lipidiques de rats.

Source et biodisponibilité

Nous avons tout d'abord montré une méthode originale de purification par LC du DPA à haute pureté (>99% des acides gras totaux) et en quantité suffisante pour la réalisation d'expérimentation *in vivo* chez le rongeur. Purifier et supplémenter du DPA sous forme d'EE a été choisi car les huiles enrichies en AGPI-LC n-3 sous forme d'EE sont facilement accessibles mais aussi parce que c'est une forme directement consommable. Des essais avec d'autres formes purifiables et consommables de DPA pourraient être envisagés par la suite, comme du DPA sous forme d'acide gras libre, forme qui devrait sûrement améliorer la séparation des composés par LC.

Dans la consommation humaine, le DPA-EE est principalement présent dans les compléments alimentaires à base d'huiles de poissons enrichies en AGPI-LC n-3 et ne constitue donc pas la forme principale d'apport en DPA (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015). En effet les principales sources de DPA proviennent des poissons gras, de la viande et du lait au sein desquels le DPA est inclus dans les TG et les phospholipides préférentiellement en position sn-2 comme pour les autres AGPI-LC n-3 (Guesnet et al. 2005). Or la biodisponibilité des AGPI-LC, et donc sûrement aussi celle du DPA, dépend de leur forme d'apport et de la matrice alimentaire dans laquelle ils sont inclus (Ghasemi Fard et al. 2014; Ghasemifard et al. 2015). Il a ainsi été montré que la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 pouvait être classée comme suit : $AGL \approx PL > TG$ ré-estérifiés $> TG > ester$ éthyliques d'acides gras (EE) (Schuchardt and Hahn 2013), ce qui placerait notre forme d'apport comme la moins biodisponible, malgré une digestibilité du DPA-EE de 96% retrouvée dans l'article 2. Néanmoins aucune étude ne s'est encore intéressée à la biodisponibilité spécifique du DPA en fonction de sa forme d'apport, sûrement à cause de l'impossibilité de se procurer du DPA sous ces différentes structures. Les récentes avancées de la recherche sur le DPA pourraient bientôt permettre ces expérimentations, demandant un effort de collaboration entre les différents laboratoires utilisant et/ou produisant les formes purifiées du DPA sous forme d'AGL (E.

Miller et al. 2013), de TG ré-estérifiés (Gotoh et al. 2009), de monoglycéride (C. Morin et al. 2014) et d'EE comme purifié ici au laboratoire. Aucune source de PL enrichie en DPA ni aucune piste de recherche pour sa purification n'a été retrouvée. Nous avons montré dans l'article 1 que le statut tissulaire en AGPI-LC n-3 était globalement augmenté lorsque le DPA-EE était inclus dans une matrice lipidique plus complexe sous forme de mélange d'huiles végétales et de lipides laitiers (régimes MGL), par rapport à un mélange d'huile végétale (régimes MGv).

Métabolisme des acides gras

Nous avons montré pour la première fois que chez le rat sain, une supplémentation nutritionnelle en DPA entraînait une augmentation du DPA dans la plupart des tissus et particulièrement dans les tissus spontanément les plus riches en DPA comme le cœur, le foie la rate et les poumons (Article 1), laissant présager des effets spécifiques potentiels du DPA au sein de ces tissus. Le DPA augmente fortement le statut en EPA dans la plupart des tissus, et faiblement le statut en DHA dans le foie et le cœur principalement. Ainsi le DPA serait plutôt un source d'EPA et nous avons montré dans l'article 2 que sa supplémentation impacte globalement la composition en acides gras des tissus de manière plutôt similaire à une supplémentation en EPA quand il est donné chez l'individu sain, nourri avec un ratio LA/ALA « optimal » de 5 pour alimenter la voie de bioconversion des AGPI n-3. En effet, il serait intéressant de voir si la supplémentation en DPA n'engendrerait pas une meilleure conversion jusqu'au DHA dans des conditions nutritionnelles plus proche de la consommation globale des sociétés occidentalisées c'est-à-dire avec un ratio LA/ALA de 12 à 18.

La rétroconversion du DPA en EPA semble importante mais n'a pu être mesurée directement. En effet elle a toujours été mesurée avec un ratio relatif au groupe contrôle. La disponibilité commerciale d'un ^{13}C -DPA ou d'un ^{14}C -DPA restant encore limitée, nous avons posé les bases d'une collaboration avec l'équipe SYMBIOSE du laboratoire de « Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation » (CEISAM) de la Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes pour marquer du ^{13}C -DPA en position méthyl terminal. Ce marquage nécessite néanmoins d'importante quantité d'acide gras au départ, à cause des faibles rendements réactionnels (Harwood, Gunstone, and Dijkstra 2007). Il n'a donc pas été possible de le mettre en place au cours de ce projet avant que la purification du DPA par LC soit effective. La supplémentation *in vivo* ou *in vitro* du DPA marqué combiné à l'utilisation du MS pour analyser les acides gras issus du DPA

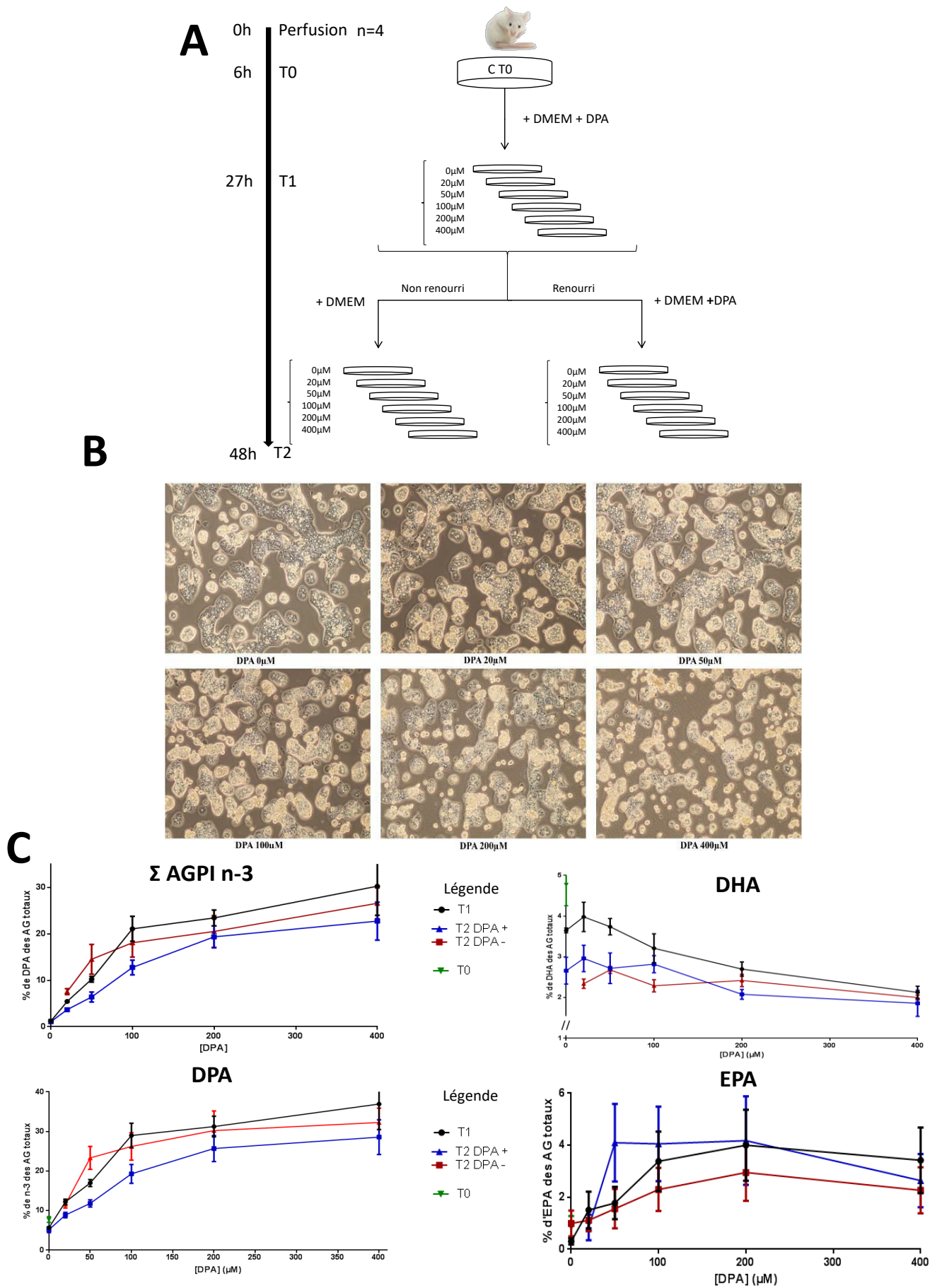


Figure 63. Effet de la dose de DPA dans un modèle de culture de hépatocytes primaires de rat

(A) Protocole expérimental : à T1, le milieu est changé pour toutes les conditions mais contient soit du DMEM supplémenté en DPA, soit du DMEM seul. (B) Photographie des cultures à T48h (x100). (C) Proportions des acides gras totaux des hépatocytes.

marqués pourrait être une perspective très intéressante de ce travail, permettant de quantifier réellement les flux du métabolisme du DPA dans une étude ultérieure.

Alors que les voies de régulation et les activités des désaturases sont très documentées, principalement pour la $\Delta 6$ -désaturase et sûrement à cause de sa description en tant qu'enzyme limitante dans la voie de biosynthèse des AGPI-LC, les élongases sont beaucoup moins étudiées (J. M. Lee et al. 2016; Guillou et al. 2010). Plus récemment, certaines études ont montré que les élongases, et principalement ELOVL2, pourraient être impliquées majoritairement dans la limitation de la conversion du DPA jusqu'au DHA (Gregory et al. 2011; J. Y. Zhang, Kothapalli, and Brenna 2016). La mesure de l'activité ELOVL2 des microsomes de foie en utilisant du DPA et du ^{14}C -malonyl-CoA a été mise en place au laboratoire au cours de ce projet de doctorat, basée sur la revue méthodologique de Jump (Jump 2009). Cette activité enzymatique n'a pas pu être mesurée lors des sacrifices des rats pour des raisons logistiques mais son approfondissement pourrait être également une des perspectives de ce projet.

Approche *in vitro* de l'effet dose d'une supplémentation en DPA

Il nous a paru intéressant d'enrichir nos résultats avec une approche *in vitro*. Ainsi, des cultures d'hépatocytes primaires de rat ont été réalisées pour évaluer l'effet de la dose de DPA ajouté au milieu (0, 20, 50, 100, 200, 400 μM) en fonction du temps de culture (T6h, T27h, T48h) et du changement de milieu à 24h (renourri / non-renourri) (**Figure 63-A**). La présence de SVF n'a pas impacté les compositions cellulaires en acides gras. La confluence des cellules est plus importante après 27h de culture qu'après 48h et tend à diminuer à partir de 200 μM (**Figure 63-B**). La supplémentation des milieux en DPA a entraîné une augmentation du contenu cellulaire en AGPI n-3, en DPA et en l'EPA de façon dose dépendante selon une courbe en plateau dont le plateau est atteint à la dose de 200 μM (**Figure 63-C**). En revanche, la proportion de DHA des hépatocytes n'a pas augmenté en fonction de la dose de DPA. Cela confirme nos résultats *in vivo* montrant une rétroconversion estimée importante du DPA vers l'EPA. La sécrétion des acides gras dans le milieu de culture est en cours d'analyse et pourrait être intéressante à relier avec les résultats des expérimentations *in vivo* (effet des deux doses de DPA des groupes MGL, MGL+DPA0,5%, MGL+DPA1% des articles 1 et 2).

Aspects biochimiques

Nous nous sommes intéressés uniquement au AGT dans ce projet de thèse, à part pour le cerveau pour lequel les acides gras de la fraction des phospholipides ont été quantifiés. Pour approfondir la répartition tissulaire du DPA et l'impact de sa supplémentation nutritionnelle sur la composition en acides des tissus, les classes principales de lipides (PL, TG, EC, AGL) sont en cours de séparation et d'analyse à l'écriture de ce manuscrit pour les animaux associés aux articles 1 et 2. Ces résultats seront mis en relation avec les résultats biochimiques qui seront entrepris par la suite.

En effet, nous avons montré pour la première fois chez le mammifère sain que la supplémentation en DPA améliorerait le statut lipidique plasmatique ainsi que le statut anti-oxydant, et de manière plus importante que pour les rats supplémentés en EPA ou en DHA. Néanmoins, ces résultats restent très descriptifs et les mécanismes moléculaires d'inhibition des gènes de la lipogénèse montrés précédemment *in vitro* avec une supplémentation en DPA n'ont pas été investigués. Ainsi, la mesure des expressions géniques des enzymes et des facteurs de transcription impliqués dans l'anabolisme et le catabolisme des lipides fera suite au projet. De plus, la mesure des concentrations tissulaires en cholestérol total, en EC et en TG est prévue pour les animaux associés à l'article 1 et 2. Ces expérimentations devraient nous donner plus d'informations sur les mécanismes spécifiques au DPA, impliqués dans les effets que nous avons observés.

Agrégation plaquettaire

L'effet d'inhibition de l'agrégation plaquettaire associé aux AGPI-LC n-3 fait partie des marqueurs de prévention des AGPI-LC n-3 vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Cottin, Sanders, and Hall 2011). Certaines études *ex vivo* ont montré que le DPA pouvait inhiber l'agrégation plaquettaire mais certains résultats restent contradictoires. Chez l'homme sain, la supplémentation en DPA du plasma riche en plaquette (PRP) inhibe l'agrégation plaquettaire au même niveau que le DHA mais moins que l'EPA (Melinda Phang, Garg, and Sinclair 2009). Le DPA et ses métabolites pourraient entrer en compétition avec l'ARA pour les voies COX et LOX plaquettaires et ainsi diminuer l'agrégation plaquettaire induite par l'ARA (Careaga and Sprecher 1984). Ainsi le DPA était l'inhibiteur le plus puissant de l'agrégation plaquettaire de lapin induite par l'ARA et par le collagène, comparé à l'EPA et au DHA, et cela de façon dose-dépendante (AKIBA et al. 2000).

Dans ces études, une des remarques récurrentes est l'impossibilité de savoir si les effets observés proviennent de l'action du DPA ajouté dans les PRP ou de l'augmentation supposée des proportions de DPA dans les membranes plaquettaires pouvant entraîner la production de métabolites oxygénés spécifiques du DPA, après action de la PLA2.

Les plaquettes sont des marqueurs à court terme de l'apport alimentaire en acide gras (Mains, Sulston, and Wood 1990). Ainsi nous avons supposé que les membranes plaquettaires des animaux supplémentés en EPA, DPA ou DHA étaient enrichis en AGPI-LC n-3 et vérifié si l'enrichissement nutritionnel des plaquettes en DPA entraînait une inhibition de l'agrégation plaquettaire. Pour cela, un tube de 2,7mL de sang Hirudiné® (Starstedt) a été prélevé pour chaque rat de l'expérimentation associée à l'article 2. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par 1mM d'ARA (BioData) ou 5µM d'adénosine Diphosphate (ADP, Sigma) ou 5µg/mL de collagène équin (Sigma) ou 5µM de U46619, l'analogue chimique du thromboxane-2 (CalbioChem) a été mesurée. Les mesures ont été réalisées au Laboratoire d'hémostase du CHU Ponchaillou de Rennes par transmission de lumière avec un agrégomètre (Platelet Aggregation Profiler, Biodata) selon les standardisations méthodologiques du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) (Cattaneo et al. 2013; CRPP 2008). Pour cela les plasmas ont subi deux centrifugations successives : 150g, 10min, 20°C pour la préparation du PRP et 2500g, 15 min, 20°C pour la préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP). La concentration en plaquettes du PRP a été quantifiée avec un automate d'hématologie DXH et l'échantillon a été dilué avec le PPP à 375 000 plaquettes/mL. Le PRP ensuite été incubé à 37°C sous agitation (1000rpm, barreau aimanté), l'agoniste a été ajouté et le suivi de la turbidimétrie a été réalisé. Le pourcentage d'agrégation maximal, les vitesses maximale et initiale, le temps de latence, la stabilité de l'agrégation et les aires sous la courbe d'inhibition ont été mesurés. Malheureusement, la qualité des prélèvements sanguins en intra-cardiaque avec des Vacuette sous vide n'ont pas été suffisants pour mesurer l'agrégation sur la majorité des échantillons et seul le prélèvement d'un animal par lot à permis une mesure fiable. Il est quand même intéressant de noter que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire relative au contrôle induite par l'ARA et le collagène du rat du groupe DPA était de 20% supérieure à celles induites par l'EPA et le DHA (résultats non présenté). Au contraire, aucune différence n'a été observée entre les supplémentations avec U46619. Cela sous-entend que l'action du DPA sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire pourrait provenir de la compétition du DPA pour les enzymes COX et LOX avec l'ARA, comme proposé précédemment (AKIBA et al. 2000). Les prélèvements sanguins

chez le rongeur ont par la suite été améliorés au laboratoire en utilisant des seringues Monovettes permettant d'exanguiner les animaux par aspiration. Ainsi, nous avons gagné 3 points d'hémolyse sur l'échelle de coloration d'hémolyse plasmatique avec cette méthode et l'étude de l'agrégation plaquettaire devrait être envisagée lors d'une prochaine expérimentation de supplémentation en DPA *in vivo*.

Activité splénocytaire

Comme montré dans l'article 2, le statut inflammatoire des rats, évalué par le dosage des cytokines plasmatiques, était très bas pour tous les régimes étudiés. En effet le modèle nutritionnel utilisé dans cette étude n'était pas vraiment pertinent pour une étude de l'inflammation et le statut inflammatoire des rats a été mesuré comme contrôle de la « bonne santé » des animaux. Les premières publications sur les effets physiologiques du DPA se sont intéressées à la réduction de l'inflammation associée à une consommation ou à une supplémentation des milieux en DPA (Kaur, Cameron-Smith, et al. 2011). Ces expérimentations sont réalisées par ajout de DPA dans un milieu de culture de splénocytes, monocytes, lymphocytes ou de macrophages incubés avec l'acide gras pour l'introduire dans les membranes cellulaires avant de tester les différents paramètres associés à l'inflammation. L'une des perspectives de l'article 2 est l'étude de l'influence d'un enrichissement nutritionnel des splénocytes en DPA, sur leur prolifération, leur activité et leur cytotoxicité *in vitro*, ce qui n'a jamais été entrepris à ce jour et à notre connaissance. Ainsi, pendant les sacrifices, les splénocytes issus de chaque rat (n=32) ont été purifiés, dénombrés ($> 10^8$ splénocytes par rat, $> 99\%$ de viabilité) mis en culture jusqu'en phase de prolifération, et cryoconservés dans l'azote liquide dans un milieu contenant 90% de SVF et 10% de (DMSO) pour mise en culture ultérieure. Comme le laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine d'Agrocampus Ouest n'est pas équipé pour la culture de lymphocyte en microplaque, il recherche actuellement une collaboration pour mettre en culture ces splénocytes enrichis nutritionnellement en AGPI-LC n-3, comme le montre les profils d'AGT présentés dans l'article 2. L'objectif est de réaliser (i) une prolifération cellulaire après activation des splénocytes (10^5 cellules/mL) avec un agent mitogène (Concanavaline A $5\mu\text{M}$) pendant 48 h et mesure de la prolifération par mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée (ou du BrDu) dans les cellules ; (ii) une mesure de l'activité des splénocytes après activation, par mesure des cytokines relarguées dans le milieu de culture

(IL2, TNF- α , IL-6) par ELISA ou Luminex ; (iii) une étude de la répartition des sous-populations splénocytaires après activation ; (iv) une étude de la cytotoxicité des cellules « *Natural Killer* » (NK) par co-culture des splénocytes avec des lymphoblastes de souris Yac-1 et estimation de la cytotoxicité des NK par mesure de la Lactate-déshydrogénase (LDH) du milieu. La mise en place des conditions optimales de culture a été réalisées au cours du projet au laboratoire.

Métabolites du DPA

L'activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice du DPA a été principalement associée à ses métabolites oxygénés (Weylandt 2016). Les métabolites du DPA sont pour le moment étudiés séparément par les équipes les synthétisant. En effet les standards de ces molécules ne sont pas commerciaux et une seule étude récente chez l'Homme a dosé les concentrations plasmatiques de certains métabolites oxygénés issus du DPA après une supplémentation de 7 jours en DPA ou en EPA (Markworth et al. 2016). Nous avons montré que la supplémentation en DPA impactait le statut en AGPI-LC n-3 de la plupart des tissus, et augmentait le DPA cérébral dans l'article 2. De plus, la MGL augmentait aussi le DPA aussi bien que le DHA dans les phospholipides du cerveau par rapport à un régime MG. Ainsi une autre expérimentation est en cours, s'axant sur le dosage des eicosanoïdes et des docosanoïdes dont les métabolites issus du DPA dans le plasma et le cerveau des rats des articles 1 et 2 soumis aux régimes : MG, MGL, MGL+DPA1% et MGL+DHA1%. Le but de cette étude est d'observer si (i) l'augmentation du DPA et du DHA induite par la MGL entraîne une augmentation des métabolites issus du DPA et du DHA en comparant les régimes MG et MGL. (ii) si la supplémentation en DPA entraîne une augmentation de la concentration de métabolites spécifiques ayant des effets neuroprotecteurs potentiels en comparant les régimes MGL, MGL+DPA1% et MGL+DHA1%. Pour cela, les isoprostanes sont en cours de dosages à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247) de Montpellier, y compris les isoprostanes récemment identifiées issues du DPA : 14-F_{3t}-NeuroP_{n-3}, 20-F_{3t}-NeuroP_{n-3} et dihydroxy-DPA_{n-3} (De las Heras-Gómez et al. 2017) par LC-MS/MS selon une méthode décrite récemment (Dupuy et al. 2016). En fonction des résultats obtenus de cette étude, les effets métaboliques potentiels de ces nouvelles isoprostanes pourront être étudiés *in vitro* en modèle d'hépatocyte primaire ou *in vivo* par gavage, l'ICBM pouvant fournir au laboratoire des quantités de substrat suffisantes pour ces expérimentations. De plus, l'optimisation du dosage des

métabolites oxygénés issus du DPA sont en cours de mise en place par LC-MS/MS à la plateforme METATOUL de Toulouse, à l'écriture de ce manuscrit. Ces métabolites seront associés aux dosages des eicosanoïdes et des docosanoïdes décrits précédemment par la plateforme (Le Faouder et al. 2013). Cette étude a été rendu possible par la mise en place d'une collaboration avec le Centre de Thérapeutique Expérimentale et de Reperfusion de l'Hôpital Brigham de l'Ecole de Médecine d'Harvard (Boston, USA) qui nous a gracieusement fourni les standards non-commerciaux des métabolites issus du DPA : MaR1DPA_{n-3}, PD1DPA_{n-3}, 17-HDPA DPA_{n-3}, RvD1 DPA_{n-3}, RvD5 DPA_{n-3}. Les métabolites commerciaux issus du DPA seront aussi dosés : PDX-DPA_{n-3}, 3-Hydroxy-7(Z),10(Z),13(Z)16(Z),19(Z)-DPA_{n-3} et le 17-oxo-7(Z),10(Z),13(Z),15(E),19(Z)-DPA_{n-3}. Selon les résultats obtenus, la mesure de l'activité de la PLA2 et les expressions géniques de COX et de LOX pourraient être appréhendées.

Conclusion nutritionnelle

Ce travail de thèse présente des informations en faveur d'une prise en compte du DPA tant dans les mesures de consommation alimentaire d'AGPI-LC n-3 que dans le calcul et l'interprétation des biomarqueurs de consommation alimentaire, surtout que ces marqueurs semblent plus fiables et plus stables quand le DPA y est inclu (Bibus and Lands 2015). En effet, alors que de nombreux laboratoires et entreprises recherchent de nouvelles sources d'AGPI-LC n-3 pour l'Homme à cause d'une diminution des ressources naturelles de poisson gras, principales sources d'AGPI-LC n-3 (Salem and Eggersdorfer 2015), il semble important de montrer que le DPA pourrait en plus de ses propres effets positifs, aussi être pris en compte comme source indirecte d'EPA et peut être de DHA dans certaines conditions nutritionnelles. Ainsi, nous pouvons spéculer que le DPA sera sûrement pris en compte en France dans les recommandations nutritionnelles avec l'EPA et le DHA, comme c'est déjà le cas dans certains pays (Byelashov, Sinclair, and Kaur 2015; Rahmawaty et al. 2013).

Une supplémentation directe en DPA chez l'Homme semble difficile, principalement à cause du coût associé à la purification du produit, tout du moins en tant que complément alimentaire disponible commercialement. Néanmoins, la mise sur le marché à venir d'un médicament contenant de l'EPA et du DPA majoritairement (sous forme d'EE) dont l'explication des effets est attribuée aussi à la présence de DPA, laisse présager une augmentation des études sur le DPA et de l'intérêt porté à cet acide gras dont les effets sont encore méconnus (Maki et al. 2017). En effet, un développement d'essai clinique d'un des métabolites oxygéné du DPA est par exemple en cours aux USA et deux autres en cours de brevetage (communication personnelle, confidentielle)

PARTIE 3 :
LA MATIÈRE GRASSE LAITIÈRE COMME VECTEUR
D'INDUCTION DU STATUT TISSULAIRE EN AGPI

1 Une incorporation de lipides laitiers dans le régime augmente le statut en AGPI n-3

1.1 Contexte de l'étude

L'obtention d'un statut maximal en DHA cérébral et rétinien pendant les premières années de la vie fait partie des enjeux de nutrition actuels dans les pays occidentalisés (Bernadette Delplanque et al. 2015). En effet le DHA va jouer un rôle fonctionnel important, principalement au niveau des fonctions visuelles et cognitives et s'accumule majoritairement dans ces tissus pendant les 5 premières années de la vie chez l'Homme. Le DHA exogène préformé apporté aux nourrissons provient soit du lait maternel, soit de formules infantiles commerciales. La part lipidique de la plupart de ces formules infantiles est composée d'un mélange d'huiles végétales apportant le précurseur ALA, et sont parfois supplémentées depuis les années 2000 en DHA et/ou en ARA nécessaires à la croissance. Ainsi, les enfants nourris avec des formules non supplémentées en DHA, qui constituent encore la majorité des formules actuellement disponibles, ont uniquement un apport en AGPI n-3 sous forme du précurseur ALA. L'absence de DHA dans de trop nombreuses formules est problématique puisqu'il est bien documenté que la voie de conversion de l'ALA jusqu'au DHA est très faible et insuffisante.

La composition lipidique des formules infantiles a fortement évolué au cours de ces dernières dizaines d'années pour subvenir au mieux aux besoins du nourrisson. Cela a amené certaines entreprises à incorporer partiellement des lipides laitiers dans leurs formules infantiles. En effet, alors que le lait maternel sert de référence et que l'OMS recommande un allaitement exclusif pendant les 6 premiers mois de la vie, l'incorporation de lipides laitiers dans les formules infantiles rapproche leurs compositions lipidiques de celle du lait maternel par rapport à l'usage exclusif des mélanges d'huiles végétales, en incluant une plus grande diversité de structure, d'espèces lipidiques et d'acides gras (AGS principalement), tout en apportant du cholestérol. De plus, plusieurs études ont montré dans différentes conditions physiologiques et nutritionnelles qu'une incorporation partielle de matière grasse laitière pouvait être bénéfique pour augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3 et principalement en augmentant l'accumulation de DHA dans le cerveau (Dinel et al. 2016; Priego et al. 2013; Du et al. 2012). Néanmoins ces résultats restent controversés (Aidoud et al. 2018). Ainsi, la seconde partie de cette thèse s'est intéressée à l'impact d'une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime sur l'augmentation de l'activité de la voie de conversion des AGPI n-3 et sur l'enrichissement en AGPI-LC n-3 des tissus chez le rat.

Cette étude est présentée sous la forme d'un article accepté dans le journal *Frontiers in Nutrition*, section *Lipidology* en avril 2018. La version éditée de l'article est présentée en **Annexe IV-A** de ce manuscrit.

Abstract

In human nutrition, optimized the status of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) and especially docosahexaenoic acid (DHA) during growth appears to be one of the most important goal. We investigated the potential impact of a partial incorporation of dairy lipids (DL) in the diet to increase the n-3 LCPUFA content in tissues, compared to a mixture of vegetable oils. Rats were fed with vegetable oil diet or DL diet, supplemented or not supplemented with DHA, from weaning for six weeks. All diets provided the same quantity of 2.3% of total fatty acids of precursor α -linolenic acid. LCPUFA levels in brain, retina, liver, heart, red blood cells and epididymal adipose tissue, Δ -6 desaturase activity and mRNA expression in liver, and plasma cholesterol were measured. Rats fed a DL diet increased their DHA content in brain and retina compared with rats fed a vegetable oil diet and reached the same level than rats directly supplemented with DHA. The status of n-3 docosapentaenoic acid increased with DL diet in heart, red blood cells and liver. The n-3 docosapentaenoic acid specifically discriminated DL diets in the heart. DL diet increased α -linolenic acid content in liver and epididymal adipose tissue, provided specific fatty acids as short- and medium-chain fatty acids and myristic acid, and increased plasma cholesterol. We hypothesized that dairy lipids may increase the n-3 LCPUFA enrichment in tissues by preserving precursor α -linolenic acid from β -mitochondrial oxidation, associated with the presence of short- and medium-chain fatty acids in DL diets. In conclusion, a partial incorporation of dairy lipids in the diet with an adequate α -linolenic acid content improved the n-3 LCPUFA status, especially DHA in brain and retina.

Article 3: Incorporation of dairy lipids in the diet increased long-chain Omega-3 fatty acids status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Anaëlle Siquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest - INRA USC1378, Rennes F-35000, France

²Lactalis, R&D, Retiers F-35240, France

Keywords: dairy lipids¹, omega 3 fatty acids², docosahexaenoic acid DHA³, n-3 docosapentaenoic acid n-3 DPA⁴, brains⁵, infant formula⁶, cholesterol, dietary⁷, polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism

⁸

* Correspondence:

Corresponding Author

philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Manuscript length: 8166

Number of figures: 5

Number of tables: 4

Number of supplementary material: 4

Abbreviations

ALA, n-3 α -linolenic acid; **DHA**, n-3 docosahexaenoic acid; **DL**, blend of vegetable oils and dairy lipids; **n-3 DPA**, n-3 docosapentaenoic acid; **EAT**, epididymal adipose tissue; **EPA**, n-3 eicosapentaenoic acid; **FA**, fatty acid(s); **Fads2**, fatty acids desaturase 2 gene; **HDL**, high-density lipoprotein(s); **LA**, n-6 linoleic acid; **LCPUFA**, long-chain polyunsaturated fatty acid(s); **PCA**, principal component analysis; **RBC**, red blood cells; **RDA**, redundancy analysis; **SMCFA**, short- and medium-chain fatty acids; **VO**, blend of vegetable oils.

1 Introduction

It is well known that n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) are essential fatty acids (FA) and required for humans throughout life (1–4). Inside the n-3 family, docosahexaenoic acid (DHA) is the most important n-3 LCPUFA in the tissues, especially in the brain and retina (5). Precisely in infants, it has been shown that DHA is essential for brain development and functions (1,3,6), as the major component of neural membrane phospholipids (2), and promotes neuroplasticity (7) and learning (8). DHA is also necessary for a good visual development (9,10) and could prevent cardiovascular diseases (11) and neurodegenerative disorders in adults (12).

The n-3 LCPUFA, as DHA, n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) and eicosapentaenoic acid (EPA) can be directly obtained from fish oils and seafood or provided by the conversion from their essential vegetal precursor α -linolenic acid (ALA) (1). The conversion from ALA occurs through a sequence of desaturations and elongations including two enzymes considered as limiting steps: the Δ -6 desaturase and the elongase-2 (13). ALA must also be provided by the diet (14), and the intake of ALA and others n-3 LCPUFA intakes are far lower than the dietary recommendations in Europe (15,16). Therefore, the conversion rate from ALA to n-3 LCPUFA is not sufficient to provide DHA in adequate amounts in humans (17,18), as well as in rodents (19). Moreover, several studies showed that DHA content in tissues does not respond linearly to dietary ALA intake (18) and that ALA supplementation results in an increase in EPA and n-3 DPA but not in DHA (20).

The maximal cerebral accumulation of DHA occurs during the first years of life (21). The intake of DHA is provided by breast milk in infants, which contains between 0.2 and 0.4% DHA (22), and which corresponds to the optimum for infant nutrition, as recommended by the WHO for the first 6 months of life. After this period, the milk supply continues, often from commercial infant formulas, whose lipid part is most often composed of a mixture of vegetable oils. More and more infant formulas are supplemented with DHA, as it will be mandatory in a few years in Europe (23). Nevertheless, the direct addition of preformed DHA may be difficult for economic and sustainability reasons, since sources of DHA are still limited (24,25). For these reasons, it seems crucial to find the optimal nutritional conditions to increase ALA conversion pathway towards derivatives and to the incorporation of DHA in tissues and specifically in the brain and in the retina. The optimization of infant formulas is needed during the period of growth where brain DHA requirements are high.

Some studies showed that infants receiving formulas containing dairy lipids had an intermediate status in n-3 LCPUFA between breastfed infants and infants fed formulas containing a mixture of vegetable oils (26). Moreover, in rodents, the partial incorporation of dairy lipids in diets could improve conversion pathway from ALA to n-3 LCPUFA. However, these studies in rodents were often performed in specific conditions with a deficiency of ALA before the administration of the diet (27,28), or with different quantities of ALA in diets (7). Dairy lipids also provide numerous species of specific lipids, including cholesterol, and offer a composition closer to breastmilk than a blend of vegetable oils (29).

Providing a higher n-3 LCPUFA amount during growth is essential for optimal development. The purpose of this study was to evaluate the impact of a partial replacement of vegetable oils by dairy lipids, supplemented or not with DHA, on n-3 LCPUFA metabolism in different tissues. This experiment was performed in post-weaning rats fed the same amount of ALA and without any n-3 FA deficiency before the experimental diets. We also investigated the capacity of dairy lipids to provide diversified FA and cholesterol in comparison to vegetable oils.

2 Material and methods

2.1 Chemicals and products

Solvents and chemicals were obtained from Thermo Scientific (Elancourt, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) or from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Butterfat and oleic sunflower oil were provided by Lactalis group (Retiers, France). High n-3 LCPUFA fish oil (Omegavie® DHA 80 EE Qualitysilver®) was graciously provided by Polaris (Quimper, France).

2.2 Ethyl docosahexaenoate (DHA-EE) purification

The DHA-EE > 99% was obtained from a high n-3 LCPUFA fish oil (Omegavie® DHA 80 EE Qualitysilver®). The purification was performed by liquid chromatography with a puriFlash®4250 system (Interchim, Montluçon, France) with a Chromabond® flash column (RS 330 C18 ec, porosity 45 µm, diameter 60 mm, length 200 mm, Macherey Nagel, Hoerd, France) followed by a Puriflash flash column (PF-15C18 HP-F0330, porosity 15µm, diameter 60 mm, length 226 mm, Interchim). An elution was performed at room temperature in an isocratic mode of methanol/water (95/5, v/v) with a constant flow of 120 mL/min. Each fraction of the first injection was collected

Table 1. Oil mixtures and fatty acid composition of the lipid blends composing the four experimental diets.

Diets	VO	VO±DHA	DL	DL±DHA
Lipid sources composing the lipid blends (g/100g)				
Butterfat			50	50
Palm oil	35	35		
High oleic sunflower	42	42	22	22
Sunflower oil			7	7
Colza oil	23	23	21	21
DHA-EE ¹		0.5		0.5
Fatty acid (FA) composition of the lipid blends (%)				
Saturated FA	21.0	20.9	37.5	37.3
SMCFA ²			4.8	4.8
Branched-chain FA ³			0.9	0.9
C14:0	0.3	0.3	5.5	5.5
C16:0	17.2	17.1	17.1	17.0
C18:0	3.1	3.1	6.7	6.7
Odd FA			0.6	0.6
Monounsaturated FA	65.3	65.0	48.0	47.8
C16:1 n-7	0.1	0.1	0.9	0.9
C18:1 n-7	1.7	1.7	1.6	1.6
C18:1 n-9	63.3	63.0	43.1	42.9
Others	0.2	0.2	2.4	2.4
Polyunsaturated FA	13.7	14.1	14.5	14.9
C18:2 n-6 (LA)	11.3	11.2	11.5	11.4
C18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.3	2.3	2.3
C22:6 n-3 EE (DHA)		0.5		0.5
Others			0.7	0.7
LA/ALA ratio	5.3	5.0	5.0	5.0

All diets contained for 1kg of diet: 100.0 g of fat (21% of total energy), 220.0 g of HCl-casein, 1.5 g of DL-methionine, 402.3 g of cornstarch, 201.2 g of sucrose, 20.0 g of cellulose, 45.0 g of mineral mix 102 and 10.0 g of vitamin mix 102.

¹ Ethyl esters purified by preparative liquid chromatography; ² Short- and Medium-Chain Fatty Acids (C4:0 to C10:0); ³ iso-C16:0, iso- and ante-C17:0.

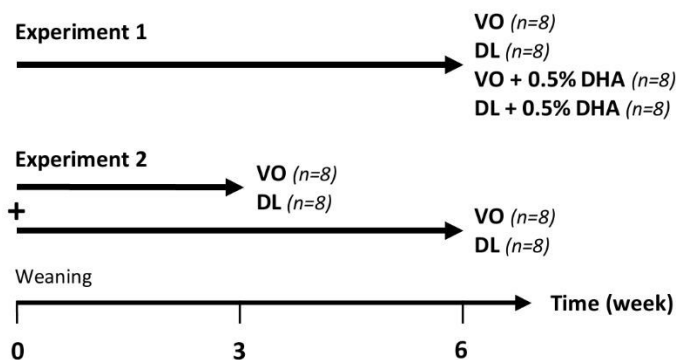
every 30 seconds and was evaporated with a vacuum evaporator, then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). For the following injections, we pooled fractions which had DHA-EE > 97% purity in the first injection. This fraction was injected under the same conditions in a preparative Interchrom column (Uptisphere strategy C18-HQ, porosity 5 μ m, diameter 50 mm, length 250 mm, Interchim) with an isocratic mode of methanol/water (98/2, v/v). All fractions corresponding to the DHA-EE peak has been collected and pooled to obtain DHA-EE >99% purity. DHA-EE possible peroxidation was controlled performing TBARS assay on DHA-EE oil at the beginning of the experimentation and on diets at the end of the experimentation (30,31). Malondialdehyde (TBARS) was not detected in DHA-EE oil or in diets.

2.3 Diets

Four different lipid blends (Table 1) were prepared from a combination of commercially available natural oil sources (Leclerc, Rennes, France). Lipid blends were composed of a blend of vegetable oils (VO) or of a blend of 50% vegetable oils and 50% dairy lipids (DL) (w/w), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Dairy lipids provided from butterfat. Lipid blends were made with particular attention to ALA and linoleic acid (LA) levels, with a LA/ALA ratio around 5, as nutritionally recommended in humans in France (32). The FA composition of the lipid blends and the oils used in the semi-synthetic diets were designed according to the fatty acid compositions of European infant formulas commercially available. The specific FA present exclusively in dairy lipids, like short- and medium-chain fatty acids (SMCFA), branched-chained and odd FA, were compensated for oleic acid provided by high oleic sunflower oil (Table 1) (33,34). FA composition of lipid blends was analyzed by GCMS after Folch extraction and derivation as described above in 2.5 (35). The FA composition of VO and DL diets were respectively the same in both experiments.

All the diets contained 10% (w/w, 21% of total energy) of lipid blend and 90% (w/w) of a lipid-free base. The lipid-free base was prepared at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). The lipid-free base contained: 220.0 g of HCl-casein, 1.5 g of DL-methionine, 402.3 g of cornstarch, 201.2 g of sucrose, 20.0 g of cellulose, 45.0 g of mineral mix 102 and 10.0 g of vitamin mix 102 for 1 kg of diet. Then, 100.0 g of fat / kg of diet of the lipid blend were added in our laboratory.

A Experimental design



B Overall data presentation and analysis

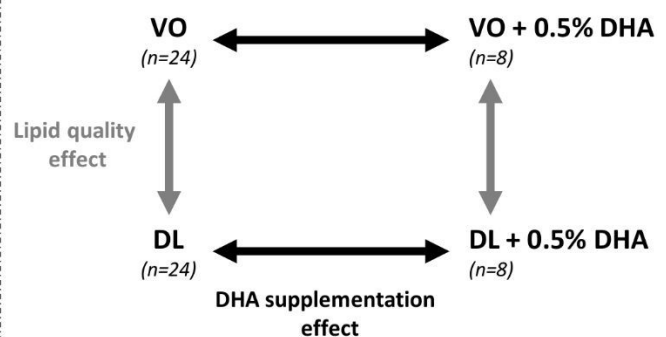


Figure 1. (A) Study design including two experiments. In experiment 1 ($n=8/\text{group}$), rats were fed from weaning for 6 weeks with the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). In experiment 2 ($n=8/\text{group}$), rats were fed the VO or the DL diet from weaning for 3 or 6 weeks. The two experiments were performed at one-year interval. **(B)** Data presentation and statistical analysis strategies. Results are presented as mean \pm SEM of combined groups from experiments 1 and 2. Consequently, a linear mixed-model with 2 fixed factors and 2 hierarchized random effects (experimentation/duration of diet) was used for statistical analysis.

To prepare the rat foods, the lipid-free base and the lipid blend were mixed then sifted twice, 13% water was added (w/w) then the mixture was homogenized and shaped as croquettes. The rat foods were sealed in an airtight package and frozen at -20°C because they were prepared at the beginning of the study. During the experiments, rat foods were thawed at +4°C 24 hours before being given to animals. Malondialdehyde concentration was measured in the diets to detect a potential peroxidation of DHA as described above in section 2.2. Malondialdehyde was not detected in diets, neither at the beginning nor at the end of the study. The diets were isoenergetic and isolipidic. Total sterols were measured in DL and VL blends using the Liebermann in order to quantify the cholesterol intake of animals as described previously (36).

2.4 Animals

This study is composed of two experiments performed at one-year interval (Figure 1-A). In the experiment 1, thirty-two rats (n=8/group) were fed VO or DL diets not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA) from weaning for 6 weeks. In the experiment 2, thirty-two rats (n=8/group) were fed VO or DL diets, not supplemented with DHA from weaning for 3 or 6 weeks. After doing a power calculation based on the brain DHA content difference between the VO and DL groups of the experiment 1, the experiment 2 was realized in order to increase the number of individuals included in the VO and DL groups to increase the power of the study. For both experiments, Sprague Dawley rats (mean body weight 60±1g, 3 weeks old at the beginning of the experiment) were randomly assigned into the 4 groups and were housed 4 animals by cage on a 12h light-dark cycle and maintained at 21°C±2°C with free access to water and food. Body weight, food and water intakes were measured 3 times a week.

At the end of the experiment, fasted rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodic pentobarbital (140 mg/kg of body weight) (Euthasol Vet, France). Blood samples were collected by cardiac punctures into heparin-treated vacutainers (Dominique Dutscher, Brumath, France) and plasma was separated from blood cells by centrifugation (3000 g, 20 min, amb T°) and stored at -80°C. After removing the peripheral blood mononucleated cells layer, red blood cells (RBC) were mixed, weighed and stored at +4°C (37). Whole eyes were removed and stored in 4% formol-PBS at 4°C during 1 week before the dissection of the retina. Tissues were removed, washed with PBS, weighted and separated in two parts: around 200 mg of the left lobe of liver, left ventricle of heart and part of the brain from frontal cortex to striatum were stored at -20°C in 4 mL of

dimethoxymethane/methanol (4:1, v/v); 50 mg of liver was homogenized with an Ultra-Turrax in RNA-extraction mixture and stored at -80°C; the rest of the organs were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (38,39).

All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for Animal Care and Use (2003/35/CEE). The experimental procedures (n° APAFIS#1389-2015080411586889 v4 and n°APAFIS#5139-201605121200996 v1) were approved by the French Animal Care Committee (Rennes, approval number A3523838) and the Ministry of Higher Education and Research and Innovation, in compliance with recommendations of the 2013–118 directive for animal experimentation.

2.5 Lipid extraction and fatty acid composition

Lipids were extracted twice from tissues with 20 volumes dimethoxymethane: methanol (4:1, v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax (40,41). RBC lipids membranes were extracted twice with hexane/isopropanol (3/2, v/v) after acidification with HCl 3M, as previously described (42). Brain phospholipids were separated from total lipids on preparative thin-layer chromatography (TLC) using silica gel H (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) plates impregnated with a mixture of hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/1, v/v/v). Total lipids and phospholipids were saponified by 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol at 70°C for 30 min and then methylated with 1 mL of BF₃ (14% in methanol) at 70°C for 30 min. Fatty acid methyl esters were extracted twice with pentane, washed twice with NaCl 0.9% and were taken up in hexane. Fatty acid methyl esters from brain phospholipids were purified by another step of TLC with a mixture of hexane/diethyl ether (80:20, v/v), extracted a first time by a mixture of methanol/hexane/NaCl 0.9% (3:4:3, v/v/v), then extracted a second time with 4 volumes of hexane and washed with NaCl 0.9% (43).

GCMS analysis was performed using an Agilent Technologies 7890A (Bios Analytic, Santa Clara, CA, RRID:SCR_015742) with a bonded silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm; SGE, Melbourne, Australia) containing a polar stationary phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (0.25 μm film thickness). Helium was used as carrier gas (average velocity 36 cm/s). The column temperature program started at 150°C and gradually increased at 4°C/min to 250°C, and held at 250°C for 10 min. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 5975C inert MSD with triple axis detector. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in

the full scan mode with a mass range of m/z 50–550 atomic mass units (amu), using the MSD Chemstation software E.02.02.14.31 (RRID: SCR_015742). Identification of the FA methyl esters was based upon retention times obtained for a homemade pool of FA methyl ester commercial standards with a purity >99% (Sigma) when available. The National Institute of Standards and Technology database (version 2.0, RRID: SCR_006440) was also sometimes used to identify unknown FA. All identified FA with a signal/noise > 10 were considered in the analysis of the proportions, FA identified with a signal/noise between 3 and 10 were marked as a trace.

2.6 Biochemical parameters of the plasma

Total cholesterol (cholesterol CHOL, Randox Laboratories, Crumlin, UK, RRID: SCR_005525) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) (HDL-CHOL, Randox Laboratories) were assayed with commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions on heparinized plasma in triplicate. HDL cholesterol levels were measured after precipitation of apolipoprotein-B containing lipoproteins using phosphotungstic acid. Non-HDL cholesterol was calculated by the difference between total cholesterol and HDL-cholesterol.

2.7 Δ -6 desaturase activity assay

The liver was homogenized in a phosphate buffer containing 0.25 M sucrose to recover the post-mitochondrial supernatant, as previously described (36).

Enzymatic activity was determined using a 1-mL assay mixture containing 100 μ L of supernatant (100 μ g proteins), 150 mmol/L phosphate buffer (pH 7.16), 6 mmol/L NADH, 6 mmol/L $MgCl_2$, 7.2 mmol/L ATP and 0.54 mmol/L CoA. The incubation was carried out in duplicate at 37°C for 20 min, after addition of 60 nmol of [1- ^{14}C]-ALA (60 μ mol/L, 10 mCi/mmol, ARC, Saint Louis, MO, USA). The reactions were stopped by adding 1 mL of 2 M KOH in ethanol. After 30 min at 70°C, the FA were liberated by acidification, extracted with diethyl ether, converted to FA naphthacyl esters and separated on HPLC (Alliance 2695 integrated system, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as previously described (44). Peaks corresponding to radiolabeled FA substrate and product of each desaturase assay were collected and subjected to liquid scintillation counting (PerkinElmer 2810, Waltham, MA, USA). The enzyme activity was determined and expressed as pmol of substrate converted to product per min per mg of protein. Protein in the supernatant used for the desaturase assays was determined by Lowry method (45).

2.8 RNA isolation and real-time qPCR

Total RNA were isolated from 50 mg of the liver with Nucleospin® RNA commercial kit (Machery Nagel) according to the manufacturer's instructions. RNA purity and concentration were verified by colorimetric A260/A280 ratio and A260/A230 ratio with a nano-spectrophotometer (DS11 spectrophotometer, DeNovix, Wilmington, DE, USA), all calculated ratio exceeded 2.0 and 2.2, respectively. Total RNA were retrotranscribed by using the High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, Fisher, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions.

Transcript of fatty acid desaturase 2 gene (Fads2) coding for the Δ -6 desaturase enzyme was quantified by Real-time qPCR in optical 96-well plates on a CFX 96 real-time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) with the TaqMan 2X Universal PCR MasterMix (Applied Biosystem) containing 50 ng of cDNA, 500 nM of each forward and reverse primers and 10 μ L of MasterMix. Primers and 5'-FAM/TAMRA-3' Taqman probes specific to Fads2 gene (forward primer 5'-TCCACAAGGACCCCGACATA-3'; reverse primer 5'-TTGTAGGGCAGATATTTTCAGCTTCTT-3') and TaqMan probe (5'-FAM-TTGGAGAGTGGCAGCCCCTCGAGTA-TAMRA3') were designed (Eurogentec, Angers, France). Amplification was performed over 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The 18S expression was quantified as an endogenous control using the 18S RNA Control kit Yakima-Yellow Eclipse Dark Quencher (Eurogentec) and relative gene expression was determined from the threshold cycle (Ct) using the $\Delta\Delta$ Ct method (46).

2.9 Statistical analysis

We combined the results of experiments 1 and 2 in order to present and analyze the data (Figure 1-B). FA composition of tissues, plasma assays, and organs weight were statistically analyzed with a linear mixed-model with 2 fixed factors (lipid quality, DHA supplementation) and 2 hierarchized random effects (experimentation/duration of diet). The major aim was to compare the potential effect between lipid quality effect (VO and VO+DHA vs DL and DL+DHA) and DHA supplementation effect (VO and DL vs VO+DHA and DL+DHA) on tissues FA composition. Consequently, the diet duration effect was included as a random effect, as no interaction was found between lipid quality effect and diet duration effect. Body weight and food consumption were analyzed with the same linear mixed-model for repeated measures. Multiple comparisons between

groups were performed by Tukey-Kramer procedure adjusted with false discovery rate method (fdr). Prior to analysis, the model was assessed by verifying the normality of the model and the normality of the residuals graphically, homoscedasticity was supposed true. When normality of model was not validated, groups were compared by non-parametric ANOVA using Kruskal-Wallis test followed with Dunn's post-hoc test (PCR and enzymatic activity results). For all procedures, p-value <0.05 was considered as significant. All data were reported as mean \pm SEM.

To identify fatty acid biomarkers across groups, multivariate analysis was used in this study on FA composition of rats fed for 6 weeks. First, principal component analysis (PCA) was performed to study the model overview. Secondly, redundancy analysis (RDA), a variant of partial least square analysis (PLS-DA), was used (47). RDA was performed to assess differences in FA metabolic profiles, considering as constraints the lipid quality effect, the DHA supplementation effect and the interaction between these two factors. The analysis was assessed separately for each tissue. As FA compositions were presented as the percentage of total detected FA, and that the FA proportion took place in a large range of values (0.10 - 56.74), the data were transformed by centering log-ratio (clr), then by centering-scaling (48). A permutation test was used to consider the significance of these three terms (49). This test was followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with fdr method to assess the significance of the 4 diets. FA explaining most of the variability between lipid quality effect (LQ, DL and DL+DHA vs VO and VO+DHA) or DHA supplementation effect (S, VO and DL vs VO+DHA and DL+DHA) were chosen by considering the test of Pearson correlation coefficient between FA data and individual scores, and a Pearson correlation coefficient $R^2 > 0.5$ (50). FA were discussed using the directions in the two-dimensional vector spaces which discriminate these effects (LQ and S), as previously described (27).

Statistical analysis were realized using R software v3.4.2 (RRID:SCR_001905) and R packages nlme v3.1.131 (RRID:SCR_015655), RVAideMemoire v0.9.68 (RRID:SCR_015657), chemometrics (v0.1) and vegan v2.4.4 (RRID:SCR_011950).

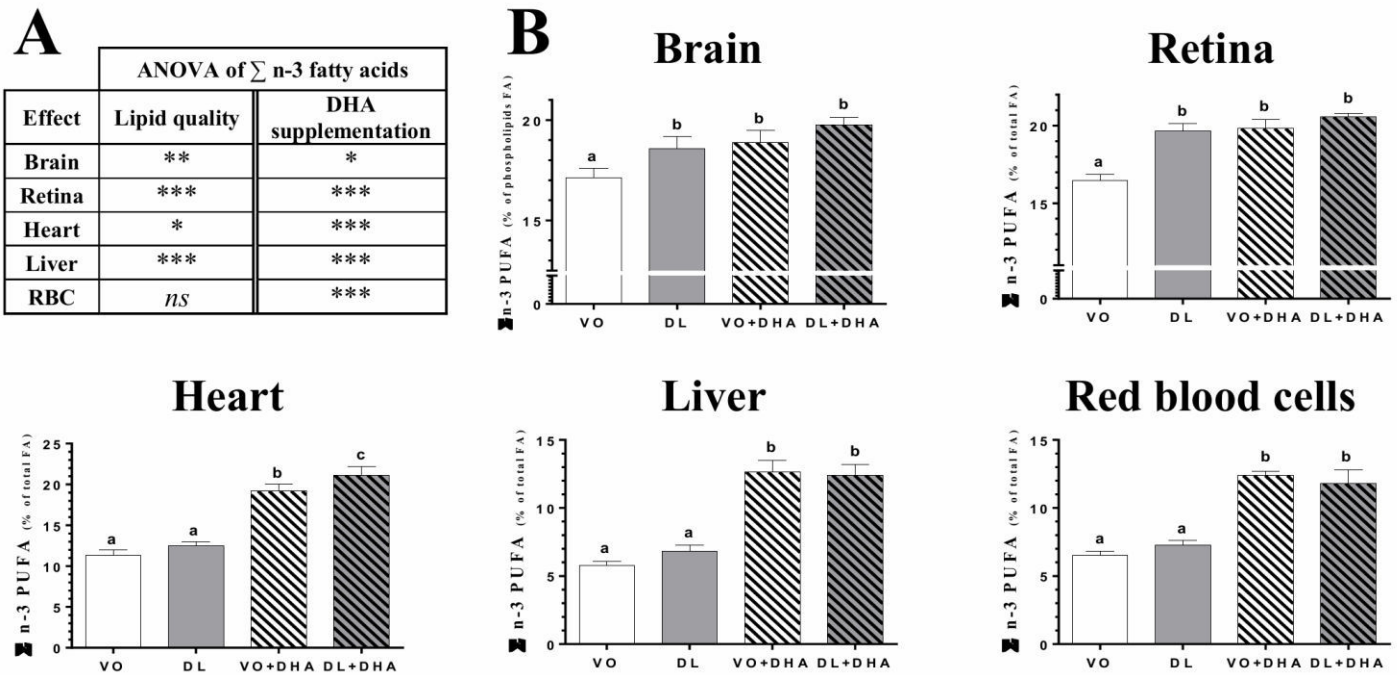


Figure 2. (A) Overall lipid quality (LQ) effect and DHA supplementation (S) effect of the sum of n-3 PUFA (ALA+EPA+DPA+DHA) proportions in brain, retina, heart, liver and red blood cells (RBC) of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). The significance of the two effects was assessed by two-ways ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). * represents globally an increase in favor of the DL groups for the LQ effect and in favor of the lots supplemented with DHA for the S effect. *ns*: not significant (B) Proportions of the sum of n-3 PUFA (ALA+EPA+DPA+DHA) in tissues. Values are mean \pm SEM. Different superscript letters indicate significant differences for multiple comparisons ($p < 0.05$).

3 Results

3.1 Body weight and food intake.

At the end of the experimentation, body weight gains and organ weights did not differ significantly between groups, except for brain weight which was higher in rats fed the diet partially enriched with dairy lipids (DL) in comparison to rats fed the vegetable oils blend diet (VO) (+11% w/w, $p < 0.01$) (See Supplementary material 1, Table 1). Means of cumulated food, water consumption, and organ weight did not differ amongst the groups (See Supplementary material 1, Figure 1).

3.2 Dairy lipids differently increased n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in tissues.

The main objective of this study was to address the impact of DL diets on n-3 LCPUFA content in tissues, compared to VO diets in post-weaning rats fed the same amount of precursors α -linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA). Our study focused on six tissues: brain, retina, heart, liver, red blood cells (RBC) and epididymal adipose tissue (EAT). The complete fatty acids composition of tissues are presented in Supplementary Material 2, Tables 1-5.

Concerning the overall lipid quality and DHA supplementation effects on total n-3 PUFA tissue contents as the sum of n-3 LCPUFA (EPA+n-3 DPA+DHA) and n-3 LCPUFA precursor (ALA) (Figure 2), rats fed DL diets had higher total n-3 PUFA contents in brain, retina, heart and liver but not in RBC (Figure 2-A). The direct supplementation with DHA increased total n-3 PUFA content in all studied tissues. More precisely (Figure 2-B), total n-3 PUFA content was higher in brain and retina in the DL group, in comparison to the VO group and this increase reached the same level than in both groups directly supplemented with DHA. In the heart, the total n-3 PUFA content was higher for the DL+DHA group than for the VO+DHA group.

Concerning DHA tissue contents (Figure 3), if we first consider the overall effects (Figure 3-A), rats fed DL diets had higher DHA contents in brain, retina and heart but not in liver and RBC. The direct supplementation with DHA, increased DHA content in all studied tissues. More precisely (Figure 3-B), the DHA content was similarly affected by the diets than the total n-3 LCPUFA status, as DHA was the major n-3 LCPUFA found in tissues. The DHA content was higher in brain and retina in the DL group, in comparison to the VO group and this increase reached the same

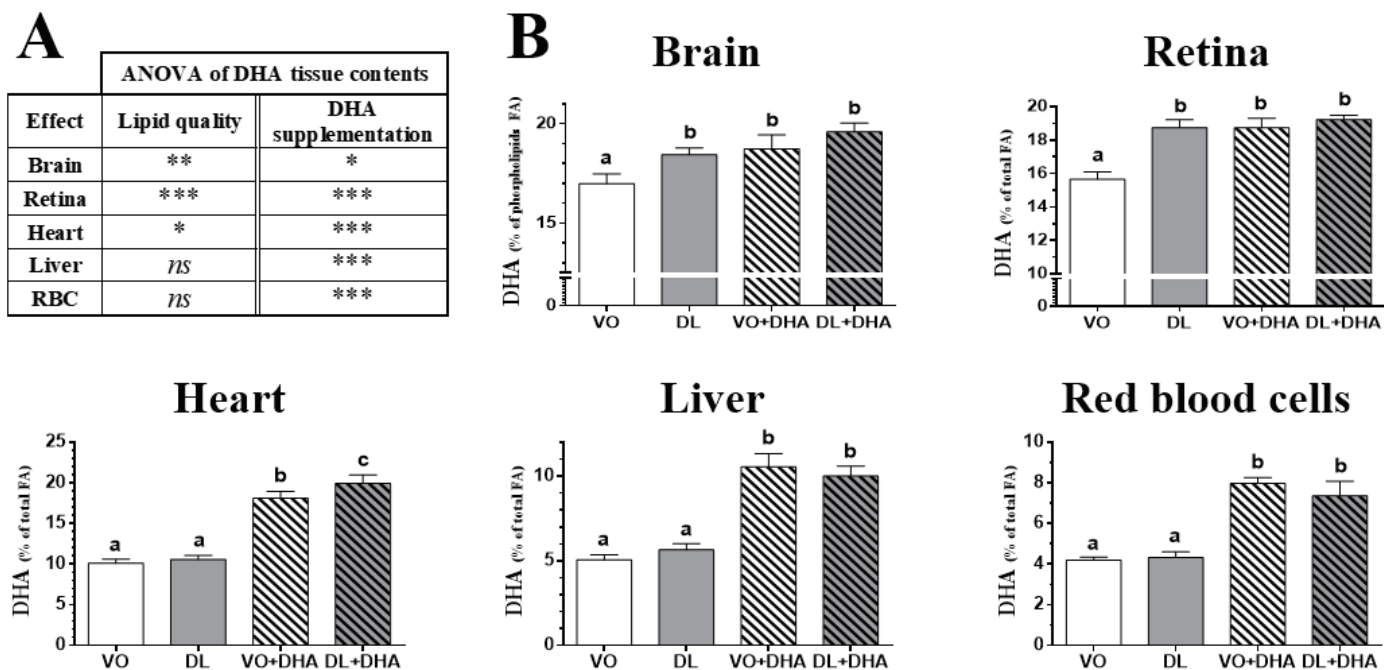


Figure 3. (A) Overall lipid quality (LQ) effect and DHA supplementation (S) effect of the docosahexaenoic acid (DHA) proportions in brain, retina, heart, liver and red blood cells (RBC) of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL); not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). The significance of the two effects was assessed by two-ways ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). * represents globally an increase in favor of the DL groups for the LQ effect, and in favor of the lots supplemented with DHA for the S effect. *ns*: not significant (B) Proportions of DHA in tissues. Values are mean \pm SEM. Different superscript letters indicate significant differences for multiple comparisons ($p < 0.05$).

DHA level than in both groups directly supplemented with DHA. In the heart, the total n-3 LCPUFA content was higher for the DL+DHA group than for the VO+DHA group.

Concerning n-3 DPA contents (Figure 4), if we first consider the overall effects (Figure 4-A), rats fed DL diets had higher n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) contents in heart, liver and RBC but not in brain and retina conversely than found for DHA. Moreover, n-3 DPA content increased with DHA supplementation in all tissues except in the heart. More precisely (Figure 4-B), the n-3 DPA content was higher in the heart, liver and RBC of DL-fed rats compared to the VO group but remained lower than in rats supplemented with DHA in liver and RBC. We underline a point of interest demonstrated by redundancy analysis approach: the n-3 DPA was the FA, which positively discriminated the most DL groups compared to VO groups (See Supplementary Material 3).

Concerning eicosapentaenoic acid (EPA), its content was also higher with DL diets in retina and liver compared to VO group but not in other tissues (See Supplementary material 2, Tables 1-5). In the liver, the retroconversion of DHA towards EPA was estimated at 72.4% with no difference between DHA-supplemented groups.

By contrast with the interesting effect of DL diets on n-3 LCPUFA, no clear effect was observed on n-6 LCPUFA, except in retina where DL diets increased all n-6 polyunsaturated FA, except for the n-6 DPA (Table 2). The DHA supplementation decreased all the n-6 LCPUFA contents in all studied tissues.

3.3 Dairy lipids saved LCPUFA precursors α -linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA).

We have also considered the effects of the different diets on the n-3 LCPUFA precursor ALA and n-6 LCPUFA precursor LA (Figure 5). First, if we consider the overall effects (Figure 5-A), we showed that DL diets increased both ALA and LA amounts in all studied tissues, except in brain and retina. Specifically, in the retina, DL diets decreased the LA proportion while increasing the ALA proportion. In the brain, only the proportion of LA was increased with DL diets, and ALA was not detected (Supplementary material 2, Table 1). The DHA supplemented diets increased LA in the liver, RBC and EAT, and ALA in liver only.

If we compare now each group (Figure 5-B), the ALA content was higher in the liver in rats fed DL compared to the VO group, reaching the same level than the VO+DHA group. Moreover, ALA

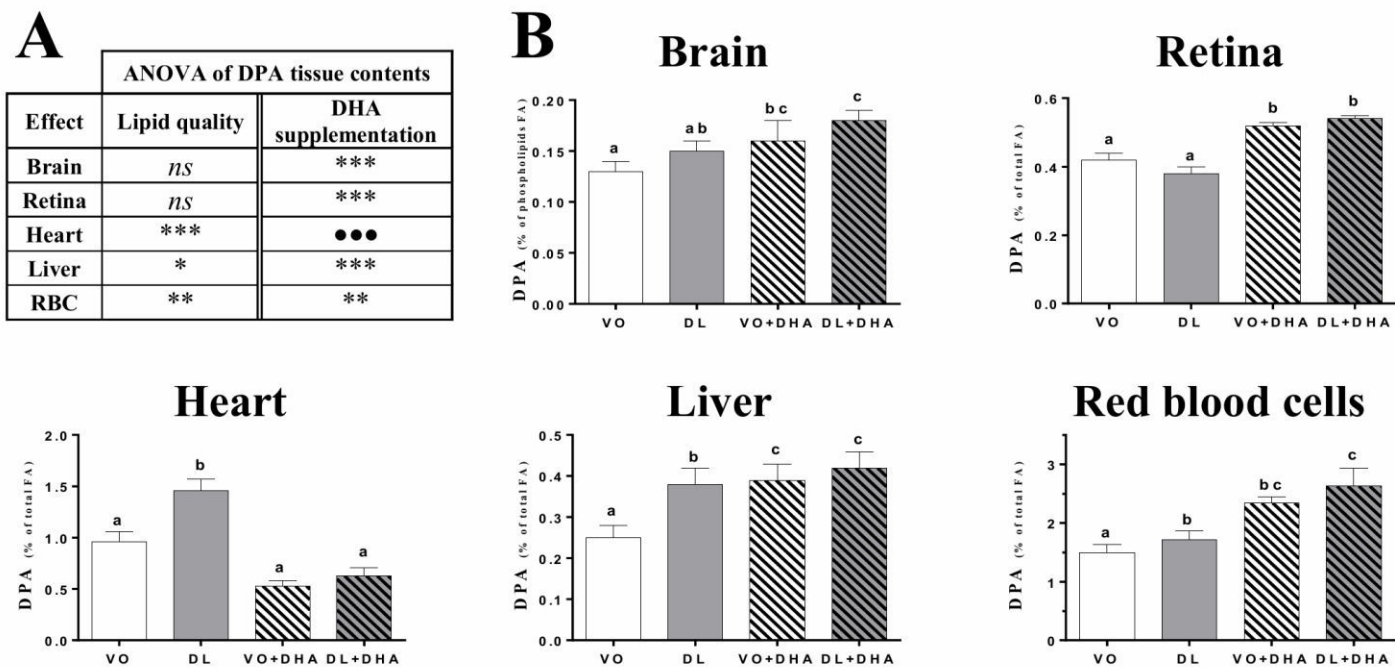


Figure 4. (A) Overall lipid quality (LQ) effect and DHA supplementation (S) effect of the n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) proportions in brain, retina, heart, liver and red blood cells (RBC) of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). The significance of the two effects was assessed by two-ways ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). * represents globally an increase in favor of the DL groups for the LQ effect, and in favor of the lots supplemented with DHA for the S effect. *ns*: not significant (B) Proportions of DHA in tissues. Values are mean \pm SEM. Different superscript letters indicate significant differences for multiple comparisons ($p < 0.05$).

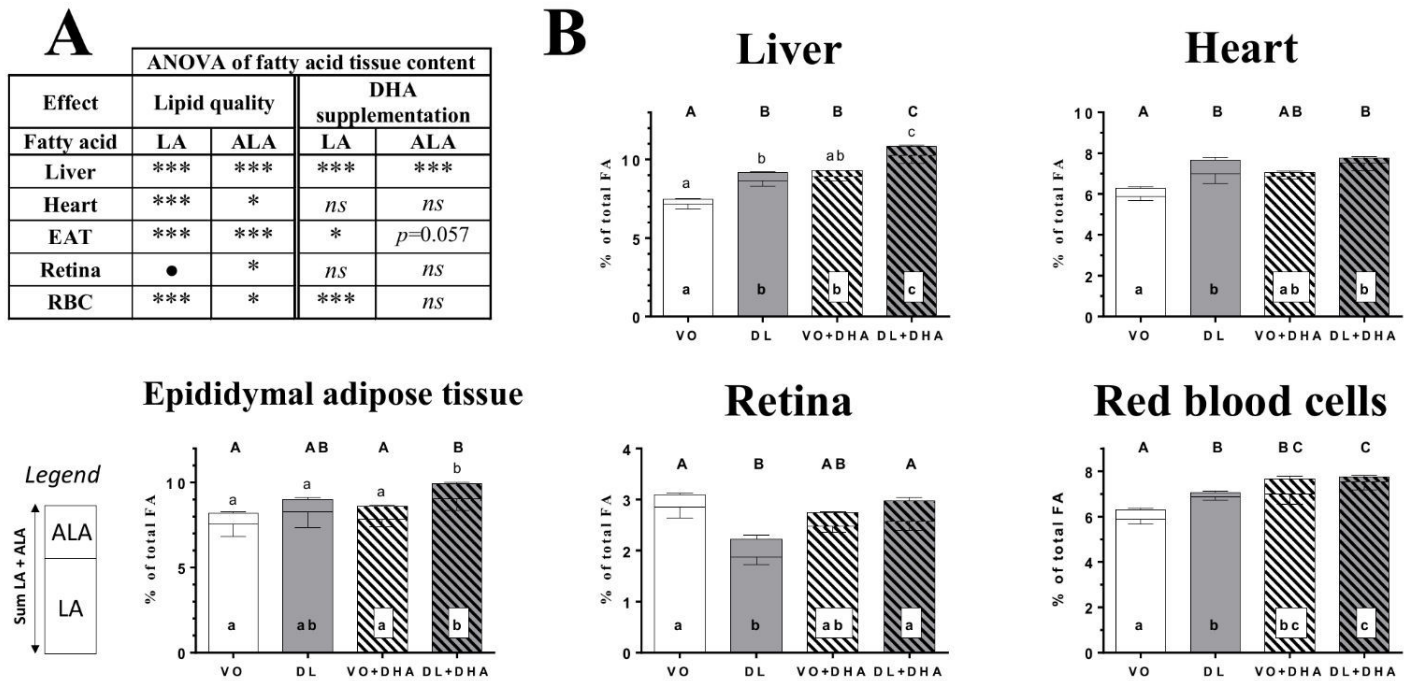


Figure 5. (A) Overall lipid quality (LQ) effect and DHA supplementation (S) effect of linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA) proportions in brain, retina, heart, liver and red blood cells (RBC) of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). * represents globally an increase and ● a decrease in favor of the DL groups for the LQ effect, and in favor of the lots supplemented with DHA for the S effect. *ns*: not significant. **(B)** Proportions of LA (bottom), ALA (top) and sum ALA+LA (whole histogram, uppercase letters) in tissues. Values are mean \pm SEM. Different superscript letters indicate significant differences for multiple comparisons ($p < 0.05$).

Table 2. The n-6 polyunsaturated fatty acids composition in tissues of rats fed the four diets.

	Fatty acids	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	LQ	S
Brain	ARA	11.04 ^{ab} ±0.31	11.87 ^b ±0.30	9.84 ^a ±0.40	10.38 ^{ab} ±0.39	.	●
	AdA	3.04 ^a ±0.17	3.04 ^a ±0.16	1.76 ^b ±0.09	1.85 ^b ±0.10		●●●
	n-6 DPA	0.54 ^a ±0.06	0.50 ^a ±0.05	0.14 ^b ±0.02	0.14 ^b ±0.02		●●●
	Σ n-6	15.73^a ±0.44	16.57^a ±0.42	12.92^b ±0.38	13.76^{ab} ±0.40	.	●●
Retina	ARA	7.72 ^a ±0.27	9.09 ^b ±0.13	7.58 ^a ±0.14	7.71 ^a ±0.11	***	●●●
	AdA	1.31 ^a ±0.04	1.61 ^b ±0.10	0.97 ^c ±0.04	1.04 ^c ±0.05	**	●●●
	n-6 DPA	0.28 ^a ±0.02	0.30 ^a ±0.01	tr 0.10 ^b	±0.01 ***	●●●	
	Σ n-6	12.36^{ab} ±0.35	13.07^a ±0.09	11.25^c ±0.13	11.68^{bc} ±0.20	*	●●●
Heart	ARA	22.62 ^a ±0.26	21.32 ^a ±0.47	13.83 ^b ±0.35	13.71 ^b ±0.24		●●●
	AdA	0.65 ^a ±0.06	0.80 ^a ±0.06	0.08 ^b ±0.02	0.09 ^b ±0.02		●●●
	n-6 DPA	0.78 ^a ±0.08	0.73 ^a ±0.05	tr	tr		●●●
	Σ n-6	37.18^a ±0.29	37.58^b ±0.51	27.91^c ±0.53	28.40^c ±0.45	*	●●●
Liver	ARA	13.43 ^a ±0.82	13.48 ^a ±0.56	9.07 ^b ±0.67	8.01 ^b ±0.86		●●●
	AdA	0.15 ^a ±0.02	0.17 ^a ±0.02	0.06 ^b ±0.01	0.06 ^b ±0.01	.	●●
	n-6 DPA	0.15 ^a ±0.02	0.16 ^a ±0.02	0.02 ^b ±0.01	0.01 ^b ±0.01		●●●
	Σ n-6	21.5 ±1.05	23.23 ±0.81	18.93 ±0.92	19.14 ±1.18		●
RBC	ARA	25.57 ^a ±0.70	24.38 ^b ±0.88	17.69 ^c ±0.40	17.82 ^c ±1.07	.	●●●
	AdA	1.24 ^a ±0.08	1.24 ^a ±0.09	0.42 ^b ±0.05	0.60 ^b ±0.11		●●●
	n-6 DPA	0.59 ^a ±0.05	0.52 ^a ±0.04	0.10 ^b ±0.04	0.23 ^b ±0.06		●●●
	Σ n-6	34.39^a ±0.71	34.14^a ±0.71	26.63^b ±0.39	27.73^b ±0.86		●●●

Total fatty acid proportions of linoleic acid (LA, C18:2n-6), arachidonic acid (ARA, C20:4n-6), adrenic acid (AdA, C22:4n-6), n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA, C22:5n-6) and total n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids (Σ n-6), in tissues of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). For the brain, the fatty acid composition from phospholipids is presented. Values are mean ± SEM.

* indicates an increase and ● a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, . 0.1<p<0.05).

levels were higher in the DL+DHA group than in other groups. We showed that the sum of ALA+LA was higher in DL group compared to the VO group in liver, heart, and RBC, reaching the same level than VO+DHA group. In contrast, the retina was the only tissue where the sum ALA+LA decreased in DL group. DL+DHA group exhibited a higher sum of ALA+LA than other groups in the liver, RBC and EAT. For all groups in all tissues, LA contents and the sum ALA+LA showed the same effects.

Finally, in the liver, the Δ -6 desaturase specific activity as well as the FA desaturase 2 mRNA relative expression (Fads2) did not change whatever the groups (Supplementary material 4, Figure 1).

3.4 Dairy lipids enriched fatty acid composition of tissues.

DL diets contained 50% (w/w) of dairy lipids from butterfat, which provides specific FA absent in vegetable oils: 4.8% short- and medium-chain fatty acids (SMCFA) (C4:0 to C12:0), 5.5% of myristic acid (C14:0) and 2.1% of branched-chain FA (BFA), odd FA (C15:0) (Table 1).

The FA composition of the epididymal adipose tissue (EAT) was used as a marker of the long-term storage of FA provided by the diets (Table 3). As expected, the specific FA present in dairy lipids increased in DL and DL+DHA groups compared to VO and VO+DHA groups. More precisely, the content in C12:0 and C15:0 increased in EAT with DL diets. The content in C10:0, C14:1 n-5, C16:0 iso, C17:0 iso and C17:0 ante-iso were quantifiable in both DL groups and only detected as trace in VO and VO+DHA groups.

In addition, myristic acid was present in all diets but mainly in DL diets, so myristic acid was higher in EAT of DL groups compared to VO groups. A similar observation was made in the liver, as in EAT for myristic acid and C15:0 (See Supplementary Material 2, Table 3).

3.5 Dairy lipids increased plasma cholesterol

DL diets contained 6.6 mg of cholesterol /100g of diet, whereas cholesterol was absent in VO diets. The DHA supplementation led to an overall decrease in total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol. However, no significant effect was found in total cholesterol / HDL cholesterol ratio (Table 4). Plasmatic total cholesterol and non-HDL cholesterol were higher only in DL group

Table 3. Total fatty acids composition of epididymal adipose tissue of rats fed the four diets.

Total fatty acids (%)	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA	
					LQ	S
C10:0	tr	0.20 ^b ±0.02	tr	0.22 ^b ±0.03	***	
C12:0	0.18 ^a ±0.06	0.61 ^b ±0.06	0.15 ^a ±0.04	0.68 ^b ±0.08	***	
C14:0	1.21 ^a ±0.13	3.53 ^b ±0.17	1.19 ^a ±0.13	3.70 ^b ±0.17	***	
C15:0	0.12 ^a ±0.02	0.39 ^b ±0.05	0.12 ^a ±0.01	0.41 ^b ±0.03	***	
C16:0	22.57 ±1.78	24.54 ±1.70	23.71 ±1.26	25.51 ±1.30	**	.
C18:0	1.79 ^a ±0.17	2.46 ^b ±0.29	2.28 ^b ±0.30	3.24 ^c ±0.26	***	***
Σ SFA	25.81^a ±2.00	31.35^b ±1.57	27.39^a ±1.58	33.35^b ±1.31	***	**
C16:1 n-9	0.50 ^{ab} ±0.06	0.51 ^b ±0.04	0.44 ^a ±0.04	0.44 ^a ±0.04		●●●
C18:1 n-9	56.74 ^a ±2.38	46.93 ^b ±1.81	55.98 ^a ±1.66	46.47 ^b ±1.33	●●●	
C20:1 n-9	0.13 ±0.02	0.12 ±0.02	0.12 ±0.01	0.11 ±0.02	.	
Σ n-9	57.38^a ±2.37	47.56^b ±1.77	56.55^a ±1.66	47.02^b ±1.33	●●●	
C16:1 n-7	4.17 ^a ±0.76	5.92 ^b ±1.10	3.78 ^a ±0.68	4.60 ^a ±0.64	***	●●
C18:1 n-7	4.21 ^a ±0.57	4.98 ^b ±0.42	3.26 ^{ac} ±0.28	3.74 ^c ±0.31	***	●●●
Σ n-7	8.38^a ±1.22	10.90 ±1.48	7.03^{ab} ±0.73	8.34^a ±0.87	***	●●●
C18:2 n-6 (LA)	7.55 ^a ±0.71	8.29 ^{ab} ±0.92	7.85 ^a ±0.44	9.04 ^b ±0.68	***	*
C20:4 n-6 (ARA)	tr	tr	tr	tr		
Σ n-6	7.61^a ±0.74	8.33^{ab} ±0.93	7.88^a ±0.43	9.08^b ±0.69	***	.
C18:3 n-3 (ALA)	0.64 ^a ±0.07	0.74 ^a ±0.09	0.75 ^a ±0.07	0.88 ^b ±0.10	***	***
C22:6 n-3 (DHA)	tr	tr	0.21 ^b ±0.11	0.21 ^b ±0.10		***
Σ n-3	0.64^a ±0.07	0.75^a ±0.10	0.96^b ±0.14	1.09^b ±0.18	*	***
C14:1 n-5	tr	0.29 ^c ±0.03	tr	0.36 ^b ±0.02	***	.
C16:0 iso	tr	0.11 ^b ±0.01	tr	0.10 ^b ±0.02	***	
C17:0 iso	tr	0.14 ^b ±0.03	tr	0.13 ^b ±0.04	***	
C17:0 ante	tr	0.13 ^b ±0.02	tr	0.14 ^b ±0.02	***	
Σ others	tr	1.11^b ±0.07	tr	1.12^b ±0.08	***	

Rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Values are mean ± SEM. * indicates an increase and ● a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

compared to the three other groups. The supplementation of DL diet with DHA maintained the total cholesterol amount at the same level than both VO and VO+DHA groups.

4 Discussion

This study addressed the capacity of a partial incorporation of dairy lipids (DL) in diets to modulate the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) status in tissues, comparatively to a vegetable oils blend based diet (VO). Both diets were not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (DL+DHA and VO+DHA).

The main finding of our study is that DL diet increased DHA levels in brain and retina at the same levels than DHA-supplemented diets. Moreover, both DL and DL+DHA diets increased also α -linolenic acid (ALA) amount in the liver and increased linoleic acid (LA) amount in all studied tissues. The effect observed here on DHA status is consistent with several studies, obtained in different specific conditions. Precisely, dairy lipids increased the brain DHA status compared to palm oil (27) in a model of ALA deficiency fed diets containing 1.5% or 2.3% ALA of total FA (w/w). Under equivalent conditions of ALA deficiency (28), the same authors confirmed that the amount of DHA in the brain increased in rats fed butter blend diet containing 2.3% ALA compared to 1.5%, but showed no additional increase of DHA with rats fed pure rapeseed diet containing 8.3% ALA. This latter consideration led us to choose the 2.3% ALA value for our present experimental diets. Another study recently showed that dairy lipid-enriched diet also increased DHA status in the brain of young and adult mice, beginning the diets on the first day of gestation until offspring's adulthood and with a different LA/ALA ratio than in our study (7). Finally, the increase of brain DHA status presented here is significant but smaller than in other studies, and was observed in brain phospholipids (not in brain total FA, data not shown). There was no deficiency before the experiment under our conditions, all rats were fed experimental diets from weaning with the same proportion of 2.3% ALA in diets. Then, both lipid bases of the diets had the same LA/ALA ratio of 5, closed to recommendations in humans (32), to overcome the known effects of the LA/ALA ratio on the LCPUFA metabolism (28,42,51,52).

A first mechanistic hypothesis to explain the increase of DHA in brain and retina is that the DL diet could act on the n-3 LCPUFA conversion pathway. Indeed, it has been reported that the expression of *Elovl2* and *Fads2* genes, coding, respectively, for the elongase-2 and the Δ -6

Table 4. Plasma concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol.

mg cholesterol /dL of plasma	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
Total	79.85 ±4.1 ^a	94.56 ±4.13 ^b	70.94 ±2.20 ^{ac}	65.60 ±3.43 ^c	*	***	*
HDL	52.80 ±3.10 ^a	52.76 ±3.00 ^a	44.87 ±1.70 ^{ab}	37.90 ±3.02 ^b	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>
Non-HDL	27.06 ±2.29 ^a	41.80 ±2.81 ^b	26.07 ±1.51 ^a	27.73 ±1.59 ^a	***	●●	*
Total / HDL	1.54 ±0.06 ^a	1.83 ±0.07 ^c	1.59 ±0.04 ^{ab}	1.77 ±0.08 ^{bc}	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Values are mean ± SEM.

* indicates an increase and ● a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). *ns*: not significant.

desaturase enzymes, were increased with high butter blend diets in ALA (2.3%) compared to vegetable oils blend diets, lower in ALA (1.3%) (27). In our study, no effect of the diet was found on the Δ -6 desaturase activity and expression, with the limitation of measurements performed at the fasting state. This result is not surprising as we used conditions where the conversion pathway was highly activated. Moreover, another possibility to explain the increase of n-3 LCPUFA with DL diets is the specific presence of myristic acid (C14:0) in DL diet. It has been reported that this FA increased dose-dependently and specifically the activity of Δ -6 and Δ -5 desaturases in primary rat hepatocytes (53). And we previously demonstrated in our laboratory that C14:0 can improve the n-3 LCPUFA content (36,54,55). In another way, the Δ -6 desaturase has a better affinity for ALA than for LA (56), and could also explain that only n-3 LCPUFA and not n-6 LCPUFA increased in our study. However, it has been shown that the content of LCPUFA in tissue is less influenced by the regulation of the desaturase and elongase genes, than by the substrate level (51).

A second possibility to explain the increase in the n-3 LCPUFA content is the presence of saturated FA in DL diets, and especially short- and medium-chain FA (SMCFA, ≤ 12 carbons). The high mitochondrial β -oxidation of SMCFA could partially spare ALA and LA from β -oxidation and could orient ALA towards the n-3 LCPUFA conversion pathway instead of the β -oxidation pathway (2,57). Indeed, as the oxidation of FA is well correlated with the number of carbon and the number of double bonds (58), ALA and LA are also good substrates for the β -oxidation, as well as oleic acid (59), and the oxidation rate of FA is reported as follows : SMCFA \gg ALA $>$ oleic acid $>$ LA (60). Consequently, in our study, the consumption of SMCFA with DL diets could prevent part of the β -oxidation of LCPUFA precursors ALA and LA (61).

A third hypothesis to partly explain the increase in n-3 LCPUFA in tissues with DL diets is the lower level of oleic acid in DL diets than in VO diets. Indeed, oleic acid is also a substrate of Δ -6 desaturase and could compete with ALA and LA. In our study, oleic acid was higher in VO diets. However, the possible competition of oleic acid for the Δ -6 desaturase appears unlikely, since no lower content of n-6 LCPUFA was observed with VO diets (62).

The second major finding of our study is that n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) levels increased in heart, liver, and RBC with DL diet, by contrast with brain and retina where DHA status increased. The n-3 DPA is one intermediate compound in the n-3 LCPUFA conversion pathway. Compared to EPA, n-3 DPA is downstream in the n-3 LCPUFA conversion pathway, so it could be a better precursor of DHA in tissues. In the present study, brain n-3 DPA content

appears to remain relatively stable within the different diets. Moreover, only direct DHA supplementation resulted in a significant slight increase in n-3 DPA in the brain, possibly originating from the retroconversion of DHA to EPA, which is quickly converted into n-3 DPA or released from the brain into the bloodstream. Some authors hypothesized that n-3 DPA present in RBC could be a good predictor for brain DHA, showing a correlation ($R^2 = 0.478$) between the n-3 DPA present in the RBC and the brain DHA (27). We found a similar correlation in the present study ($R^2 = 0.464$) by using data from VO and DL groups in the model (data not shown), but this predictor hypothesis remains unclear in the absence of metabolic plausibility. Finally, the mechanisms of transport, use and conversion, specific to n-3 DPA are still poorly known and require further research, even if some studies report that n-3 DPA may react more like DHA than EPA for these aspects (2,63).

The metabolism of n-3 DPA is poorly studied yet, due to its lack of commercial availability at high level of purity to realize in vivo studies. However, recent in vitro and in vivo studies showed that n-3 DPA could have some specific physiological effect, and particularly to prevent cardiovascular diseases by decreasing cholesterol, triglycerides synthesis and inflammation (2,11,63–65). Interestingly, our results showed that for both DL diets, n-3 DPA is the most discriminated FA in the heart. The potential synergic effect of n-3 DPA combined with DL on cardiovascular prevention may be investigated in future studies. Moreover, some recent cohort studies suggest that n-3 DPA could be the more potent n-3 LCPUFA to prevent some pathologies like metabolic syndrome, depression or lung dysfunction (4,66,67). For further in vivo studies, we need to obtain highly purified n-3 DPA, as already proposed by some laboratories (68).

Concerning cholesterol, some studies showed that dairy lipid-enriched diets could affect the amount of cholesterol in some tissues (69,70). As a result, we showed in this study that plasma cholesterol increased only with DL group, and this is interesting as cholesterol is important during growth and was not provided by VO diets. Moreover, our results showed interestingly that plasma cholesterol was maintained at similar levels as the VO non-supplemented diet when DL diet was supplemented with DHA, while it was not significantly decreased when the VO diet was supplemented with DHA. Moreover, plasma cholesterol decreased with DL+DHA group compared to DL group, and at the same level than VO+DHA group. This observation is important because infant formula including DHA will be mandatory in a few years in Europe (23).

Obviously, the comparison between rats and humans remains a question and a limit of the putative extrapolation of the results of the present study (71). However, in the present work, we could compare the age of our male rats fed from weaning to 9 weeks of age with an interval of 6 months to 14 years old in humans (72), a period where the consumption of dairy products occurs.

In conclusion, our results showed that n-3 LCPUFA content was positively influenced by dairy lipids and differently according to the tissues. DL diet increased DHA in brain and retina at the same levels than groups supplemented with DHA; and increased n-3 DPA in heart, RBC and liver. This accretion of n-3 LCPUFA suggests interesting roles of specific FA or other components of dairy lipids.

5 Acknowledgments

We would like to thank Océane Sence and Coline Devillechabrolle for their technical assistance. The authors are indebted to Xavier Blanc (UPAE, INRA Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the lipid-free base necessary for the realization of the diets. We are grateful to Maxime Hervé for his assistance in the multivariate statistical analysis. We would also like to thank Josephine Aronica for proofreading the English editing and academic writing of the paper.

6 Author contributions statement

Under the supervision of PL and DC, GD completed these studies as part of his Ph.D. thesis. GD, PL, CB, PLR, DC and VR contributed to the conception and design of the project. GD, AS and DC performed experimentation. GD conducted the literature search, the acquisition and analysis of data, and wrote the first version of the manuscript. PL, VR, DC, CB, and PLR contributed to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final work.

7 Conflict of interest statement

This work received financial support from Lactalis Group (France). Baudry C. and Le Ruyet P. are employed by Lactalis group.

References

1. Brenna JT, Carlson SE. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *J Hum Evol* (2014) 77:99–106. doi:10.1016/j.jhevol.2014.02.017
2. Dyall SC. Long-chain Omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci* (2015) 7: doi:10.3389/fnagi.2015.00052
3. Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: Review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2005) 45:205–229. doi:10.1080/10408690590956378
4. Guo X, Li X, Shi M, Li D. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients* (2017) 9:703. doi:10.3390/nu9070703
5. Calder PC. Docosahexaenoic acid. *Ann Nutr Metab* (2016) 69:8–21. doi:10.1159/000448262
6. Innis S. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* (2007) 137:855–859. Available at: <http://jn.nutrition.org/content/137/4/855>
7. Dinel AL, Rey C, Bonhomme C, Le Ruyet P, Joffre C, Layé S. Dairy fat blend improves brain DHA and neuroplasticity and regulates corticosterone in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2016) 109:29–38. doi:10.1016/j.plefa.2016.03.013
8. Kuratko CN, Barrett EC, Nelson EB, Salem N, Jr. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: a review. *Nutrients* (2013) 5:2777–810. doi:10.3390/nu5072777
9. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* (2001) 36:885–895. doi:10.1007/s11745-001-0798-1
10. Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Bloch MH. Meta-analysis of LCPUFA supplementation of infant formula and visual acuity. *Pediatrics* (2013) 131:e262-72. doi:10.1542/peds.2012-0517
11. Guo X, Sinclair AJ, Kaur G, Li D. Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2017) doi:10.1016/j.plefa.2017.09.011

12. Zhang W, Li P, Hu X, Zhang F, Chen J, Gao Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci* (2011) 17:2653–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622201>
13. Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ. Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. *PLoS One* (2011) 6:e29662. doi:10.1371/journal.pone.0029662
14. Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings RR. Changes in consumption of Omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* (2011) 93:950–62. doi:10.3945/ajcn.110.006643
15. Legrand P, Morise A, Kalonji E. Update of French nutritional recommendations for fatty acids. *World Rev Nutr Diet* (2011) 102:137–143. doi:10.1159/000327800
16. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N. Workshop Statement on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2000) 63:119–121. doi:10.1054/PLEF.2000.0176
17. Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* (2005) 45:17. doi:10.1051/rnd:2005047
18. Brenna JT, Salem Jr. N, Sinclair AJ, Cunnane SC. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2009) 80:85–91. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004
19. Morise A, Combe N, Boué C, Legrand P, Catheline D, Delplanque B, Fénart E, Weille P, Hermier D. Dose effect of α -linolenic acid on PUFA conversion, bioavailability, and storage in the hamster. *Lipids* (2004) 39:325–334. doi:10.1007/s11745-004-1236-0
20. Gibson RA, Neumann MA, Lien EL, Boyd KA, Tu WC. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2013) 88:139–146. doi:10.1016/j.plefa.2012.04.003
21. Gibson RA, Muhlhausler B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr* (2011) 7:17–26. doi:10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x

22. Guesnet P, Alessandri J-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – Implications for dietary recommendations. *Biochimie* (2011) 93:7–12. doi:10.1016/J.BIOCHI.2010.05.005
23. European Commission. Commission delegated regulation (EU) 2016/127. *Off J Eur Union* (2016) L25:1–29. doi:http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/l_285/l_28520031101en00330037.pdf
24. Jenkins DJA, Sievenpiper JL, Pauly D, Sumaila UR, Kendall CWC, Mowat FM. Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? *CMAJ* (2009) 180:633–7. doi:10.1503/cmaj.081274
25. Lee JH, O’Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol* (2009) 6:753–758. doi:10.1038/nrcardio.2009.188
26. Courage ML, McCloy UR, Herzberg GR, Andrews WL, Simmons BS, McDonald AC, Mercer CN, Friel JK. Visual Acuity Development and Fatty Acid Composition of Erythrocytes in Full-Term Infants Fed Breast Milk, Commercial Formula, or Evaporated Milk. *J Dev Behav Pediatr* (1998) 19:9–17. doi:10.1097/00004703-199802000-00002
27. Du Q, Martin J-C, Agnani G, Pages N, Leruyet P, Carayon P, Delplanque B. Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats. *J Nutr Biochem* (2012) 23:1573–1582. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.011
28. Delplanque B, Du Q, Agnani G, Le Ruyet P, Martin JCC. A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2013) 88:115–120. doi:10.1016/j.plefa.2012.07.004
29. Delplanque B. Lipides et cerveau. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* (2007) 14:146–147. doi:10.1051/ocl.2007.9999
30. Albert BB, Cameron-Smith D, Hofman PL, Cutfield WS. Oxidation of marine Omega-3 supplements and human health. *Biomed Res Int* (2013) 2013: doi:10.1155/2013/464921

31. Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromatogr* (2015) doi:10.1002/bmc.3361
32. ANSES. Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras. (2011). Available at: <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>
33. Trautwein EA, Rieckhoff D, Kunath-Rau A, Erbersdobler HF. Replacing Saturated Fat with PUFA-Rich (Sunflower Oil) or MUFA-Rich (Rapeseed, Olive and High-Oleic Sunflower Oil) Fats Resulted in Comparable Hypocholesterolemic Effects in Cholesterol-Fed Hamsters. *Ann Nutr Metab* (1999) 43:159–172. doi:10.1159/000012782
34. Truswell AS, Choudhury N. Monounsaturated oils do not all have the same effect on plasma cholesterol. *Eur J Clin Nutr* (1998) 52:312–315. doi:10.1038/sj.ejcn.1600566
35. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* (1957) 226:497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9
36. Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev* (2005) 45:599–612. doi:10.1051/rnd:2005048
37. Metherel AH, Henao JJA, Stark KD. EPA and DHA Levels in Whole Blood Decrease More Rapidly when Stored at –20 °C as Compared with Room Temperature, 4 and –75 °C. *Lipids* (2013) 48:1079–1091. doi:10.1007/s11745-013-3827-x
38. Ametaj BN, Bobe G, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Effect of Sample Preparation, Length of Time, and Sample Size on Quantification of Total Lipids from Bovine Liver. *J Agric Food Chem* (2003) 51:2105–2110. doi:10.1021/jf0259011
39. Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res* (2000) 41:465–472. doi:10.1093/ije/dyh292
40. Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Laviaille M, Alessandri JM. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem* (2010) 21:180–187. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.10.008

41. Delsal JL. New method of extraction of serum lipids by methylal. Application to micro-estimation of total cholesterol, phospho-aminolipins and proteins. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* (1944) 26:99–105.
42. Ezanno H, Beauchamp E, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver. *Eur J Lipid Sci Technol* (2015) 117:281–290. doi:10.1002/ejlt.201400304
43. Wolff RL, Bayard CC, Fabien RJ. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters. *J Am Oil Chem Soc* (1995) 72:1471–1483. doi:10.1007/BF02577840
44. Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. High performance liquid chromatography of fatty acids as naphthacyl derivatives. *Analisis* (1999) 27:186–193. doi:10.1051/analisis:1999165
45. Randall RJ, Lewis a. The folin by oliver. *Readings* (1951) 193:265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4
46. Blanchard H, Pédrone F, Boulier-Monthéan N, Catheline D, Rioux V, Legrand P. Comparative effects of well-balanced diets enriched in α -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2013) 88:383–389. doi:10.1016/j.plefa.2013.03.006
47. Kalivodová A, Hron K, Filzmoser P, Najdekr L, Janečková H, Adam T. PLS-DA for compositional data with application to metabolomics. *J Chemom* (2015) 29:21–28. doi:10.1002/cem.2657
48. van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* (2006) 7:142. doi:10.1186/1471-2164-7-142
49. Legendre Pierre & Legendre L. Numerical Ecology. *J Chem Inf Model* (1998) 53:1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
50. Huang W, Zwimpfer E, Hervé MR, Bont Z, Erb M. Neighbourhood effects determine plant-herbivore interactions below-ground. *J Ecol* (2017)1–10. doi:10.1111/1365-2745.12805

51. Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2010) 83:61–68. doi:10.1016/j.plefa.2010.04.001
52. Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab* (1994) 1213:277–288. doi:10.1016/0005-2760(94)00054-9
53. Jan S, Guillou H, D'Andrea S, Daval S, Bouriel M, Rioux V, Legrand P. Myristic acid increases $\Delta 6$ -desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Reprod Nutr Dev* (2004) 44:131–140. doi:10.1051/rnd:2004020
54. Rioux V, Catheline D, Beauchamp E, Le Bloc 'h J, Pé F, Legrand P. Substitution of dietary oleic acid for myristic acid increases the tissue storage of α -linolenic acid and the concentration of docosahexaenoic acid in the brain, red blood cells and plasma in the rat. *Anim Anim Consort* (2008) 2:636–644. doi:10.1017/S1751731108001705
55. Legrand P, Beauchamp E, Catheline D, Pédrone F, Rioux V. Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue pufa content in the rat. *Lipids* (2010) 45:975–986. doi:10.1007/s11745-010-3481-5
56. Horrobin DF. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am J Clin Nutr* (1993) 57:736S–737S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386433>
57. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* (2013) 54:2325–40. doi:10.1194/jlr.R036012
58. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* (2000) 72:905–911. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11010930>
59. Jones PJH. Dietary linoleic, α -linolenic and oleic acids are oxidized at similar rates in rats fed a diet containing these acids in equal proportions. *Lipids* (1994) 29:491–495. doi:10.1007/BF02578246

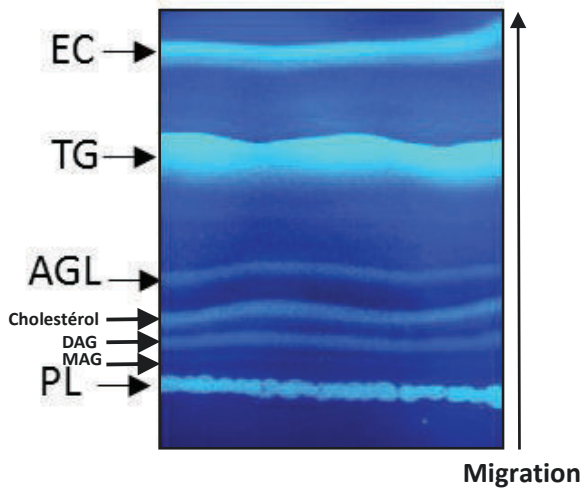
60. Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br J Nutr* (1987) 57:383–393. doi:10.1079/BJN19870046
61. Rolland V, Roseau S, Fromentin G, Nicolaidis S, Tomé D, Even PC. Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter. *Am J Clin Nutr* (2002) 75:21–30.
62. Park HG, Engel MG, Vogt-Lowell K, Lawrence P, Kothapalli KS, Brenna JT. The Role of Fatty Acid Desaturase (FADS) Genes in Oleic Acid Metabolism: FADS1 Δ 7 desaturates 11–20:1 to 7,11–20:2. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2017) 128:21–25. doi:10.1016/j.plefa.2017.11.004
63. Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of Omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol* (2015) 27:79–82. doi:10.1002/lite.201500013
64. Kaur G, Guo X-F, Sinclair AJ. Short update on docosapentaenoic acid: a bioactive long-chain n-3 fatty acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2016) doi:10.1097/MCO.0000000000000252
65. Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Prog Lipid Res* (2011) 50:28–34. doi:10.1016/j.plipres.2010.07.004
66. Matsuoka YJ, Sawada N, Mimura M, Shikimoto R, Nozaki S, Hamazaki K, Uchitomi Y, Tsugane S. Dietary fish, n-3 polyunsaturated fatty acid consumption, and depression risk in Japan: a population-based prospective cohort study. *Transl Psychiatry* (2017) 7:e1242. doi:10.1038/tp.2017.206
67. Leng S, Picchi MA, Wu G, Belinsky SA. Dietary nutrients associated with preservation of lung function in Hispanic and non-Hispanic white smokers from New Mexico. (2017)1–11. doi:10.2147/COPD.S142237
68. Mu H, Jin J, Xie D, Zou X, Wang X, Wang X, Jin Q. Combined Urea Complexation and Argentated Silica Gel Column Chromatography for Concentration and Separation of PUFAs from Tuna Oil: Based on Improved DPA Level. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc* (2016) 93:1157–1167. doi:10.1007/s11746-016-2842-5

69. Edmond J, Korsak RA, Morrow JW, Torok-Both G, Catlin DONH. Dietary Cholesterol and the Origin of Cholesterol in the Brain of Developing Rats. *J Nutr* (1991) 121:1323–1330. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1880610>
70. Innis SM, Hamilton JJ. Effects of developmental changes and early nutrition on cholesterol metabolism in infancy: A review. *J Am Coll Nutr* (1992) 11:63S–68S. doi:10.1080/07315724.1992.10737987
71. Innis SM. Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements. *Am J Clin Nutr* (2000) 71:238S–244S. Available at: <http://ajcn.nutrition.org/content/71/1/238S>
72. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med* (2013) 4:624–630. doi:23930179

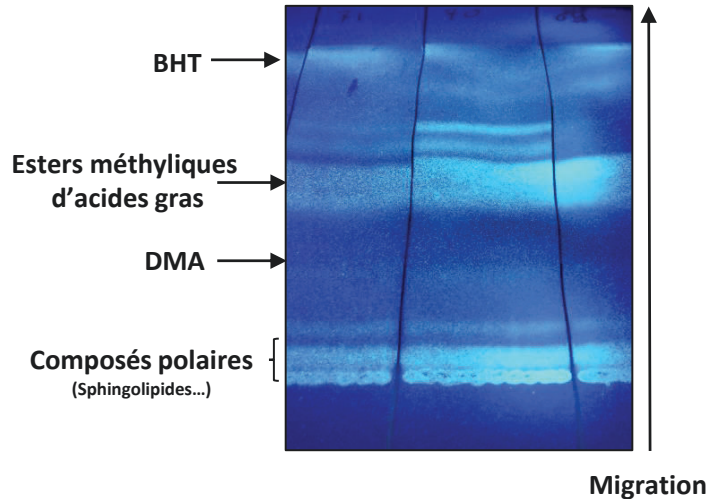
A Préparation des plaques de silice



B Séparation des classes de lipides



D Purification des esters méthyliques



Contrôle de la séparation des classes de lipides

C

	PL	AGL	TG	EC	
Dosages	Phosphate	✓	✗	✗	✗
	Triglycérides	✗	✗	✓	✗
	Cholestérol	✗	✗	✗	✓

✓ DéTECTÉ ✗ Non-déTECTÉ

Figure 69. Séparation des classes de lipides et purification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie sur couche mince.

A) Système de préparation des plaques de silice. B) CCM révélées de séparation des classes de lipides (4 échantillons par plaque). et C) de purification des esters méthyliques d'acides gras (4 échantillons par plaque). La technique de séparation des classes est validée par dosage des différentes espèces lipidique dans chacune des fractions.

AGL : acides gras libres ; BHT : hydroxytoluène butylé ; DAG : diglycérides ; DMA : diméthylacétal ; EC : esters de cholestérol ; MAG : monoglycérides ; TG : triglycérides.

1.3 *Résultats et discussion complémentaires*

1.3.1 Autres compositions tissulaires en acides gras

La composition en acides gras du plasma, du muscle, de l'intestin (jéjunum) et du rein a aussi été réalisée pour les animaux issus de l'expérimentation 1 de l'article 3, selon le même protocole expérimental d'extraction des lipides totaux et de séparation de acides gras totaux présentés dans l'article. Les tableaux de composition ne sont pas présentés dans ce manuscrit mais sont disponibles en **Annexe IV-A**. Succinctement, le régime MGL avait augmenté la teneur en DPA du muscle uniquement. Globalement, seule la supplémentation en DHA avait impacté la composition tissulaire en AGPI du plasma, de l'intestin et des reins.

1.3.2 Optimisation de la séparation des classes de lipides par CCM

Les profils de phospholipides de cerveau faisaient partis des résultats les plus attendus de l'expérimentation associée à l'article 3. Ainsi, la séparation des classes de lipides totaux de différents tissus et la purification des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) réalisées pour le cerveau dans l'article 3 et dans le reste du projet a entraîné une amélioration de la méthode de séparation et d'extraction des acides gras par chromatographie en couche mince dont les plaques de silice sont faites au laboratoire (**Figure 69-A**). Les essais de séparation ont été réalisés sur des extraits de foie. En effet le foie est riche en mono- di- et surtout en triglycérides, qui représentent la principale bande pouvant co-migrer avec les autres classes de lipides et donc entrainer des contaminations difficilement détectables par GCMS.

Concernant les classes de lipides, après optimisation, les différentes classes de lipides sont séparées sur des plaques de silice de 0,5mm d'épaisseur à l'aide d'un mélange de solvant d'hexane/diéthyl éther/acide acétique (80/20/1, v/v/v) (à la place de 85/15/1 v/v/v ultérieurement) et 4 échantillons de lipides totaux sont déposés sur chaque plaque (à la place de 2 précédemment) extraits de 200mg de foie (à la place de 50mg précédemment). L'extraction de 200mg de tissu à la place de 50mg provient d'une étude montrant une diminution de la variabilité pour cette quantité supérieure de tissu. La révélation sous UV à la primuline a montré une bonne séparation des différentes classes de lipides (**Figure 69-B**). Néanmoins, la révélation visuelle ne permet pas de détecter de potentiels chevauchements des classes. Ainsi, après grattage et extraction des lipides au pentane, les TG, le cholestérol total et le phosphore

Solution	Composition
RIPA	Nonylphénoxy polyéthoxyéthanol 40 1% ; Désoxycholate de sodium 0,5% ; SDS 0,1% ; EDTA 1mM ; Aprotinine 10µg/mL dans du PBS
Laemmli 4x	Glycérol 40% ; β-mercaptoéthanol 20% ; SDS 8% ; bleu de Bromophenol 0,02% ; Tris-HCl 0,25M pH=6,8
Tampon de migration Tris-Glycine	Tris 25mM ; Glycine 192mM ; SDS 0,1% ; pH=8,3
Tampon de transfert Tris-Glycine	Tris 48mM ; Glycine 39mM ; SDS 1,3mM ; Méthanol 20% ; pH=8,4
TBS	Tris 20mM ; NaCl 150mM
TBS-Tween 0,5%	TBS ; Tween 20 0,05% ; pH=7,35

Tableau 20. Composition des solutions utilisées pour les Western Blots

inorganique ont été dosés pour chacune des classes lipidiques prélevées. Les TG et le cholestérol total ont été dosés à l'aide de kits commerciaux (TRIG et CHOL, Randox). Le phosphate a été dosé à l'aide du kit Malachite Green Phosphate Assay (BioAssaySystem), après ajout d'acide perchlorique 70% (Fischer) aux lipides et chauffage à 180°C pendant 1h pour décrocher les groupements phosphates des phospholipides. Aucune contamination n'a été détectée dans les différentes classes de lipides (**Figure 69-C**).

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) provenant des lipides totaux ou de la fraction phospholipides sont purifiés par CCM pour retirer les résidus qui ne migrent pas lors de la séparation des classes de lipides et qui, non volatils, peuvent s'accumuler dans l'injecteur du GCMS. Les EMAG sont séparés 4 échantillons par plaques (à la place de 2 précédemment) avec un mélange de solvant d'hexane/diéthyl éther (90/10, v/v) permettant aussi de séparer les diméthylacétals (DMA) des EMAG (**Figure 69-D**). L'extraction des EMAG de la silice était préalablement réalisé par l'éther. L'extraction des EMAG au méthanol/hexane/NaCl par la méthode Wolf (Wolff, Bayard, and Fabien 1995) a permis de récupérer environ 20% d'AGPI supplémentaire par rapport à la méthode d'extraction à l'éther et de diminuer le coefficient de variation technique associé à cette étape de purification.

1.3.3 Etude de la Δ -9 désaturase

L'inhibition de l'activité de la Δ -9 désaturase et de l'expression de son gène SCDI par les AGPI-LC est bien connue (L. Zhang et al. 2010; Barber, Sinclair, and Cameron-Smith 2013). Comme nous avons montré dans l'article 3 qu'un régime à base de MGL augmentait le statut tissulaire en DPA, en ALA, en LA dans le foie, et plus globalement le statut en AGPI n-3 dans tous les tissus, nous avons voulu voir si l'incorporation partielle de MGL dans le régime impactait la Δ -9 désaturase.

1.3.3.1 *Matériels et méthodes*

Western Blot

Les échantillons de foie ont été broyés puis homogénéisés dans du tampon Radio Immune Precipitation Assay (RIPA) avant d'être centrifugés pendant 5 minutes à 2,300 g afin d'éliminer les débris cellulaires (**Tableau 20**). Le surnageant contenant les protéines hépatiques a alors été

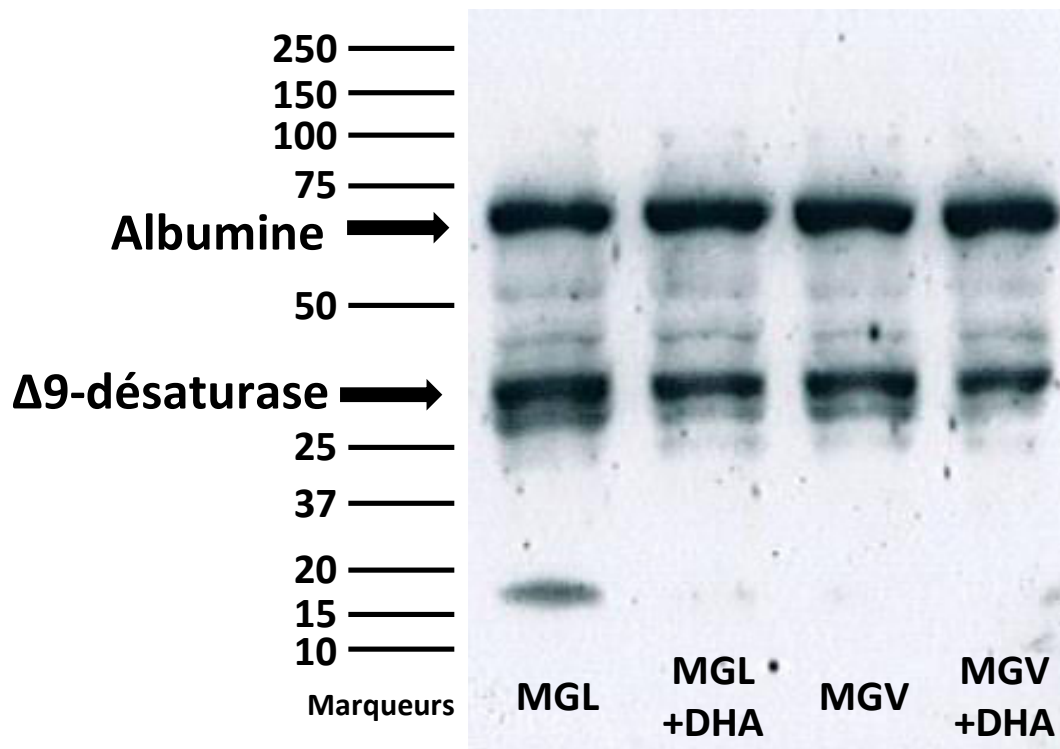


Figure 70. Western Blot de la $\Delta 9$ -désaturase

recupéré, constituant ainsi la solution protéique mère. Les protéines ont été dosées dans cette solution mère par la méthode de Bradford (Redmile-Gordon et al. 2013) par mesure de l'absorbance à 595nm par comparaison à une gamme d'Albumine Sérique Bovine (BSA). Les solutions protéiques mères ont alors été diluées afin d'obtenir une concentration à 1g/L de protéines puis dénaturées dans un tampon Laemmli 4X chauffé à 70°C pendant 10 minutes.

Les protéines ont ensuite été séparées selon leurs poids moléculaires par électrophorèse SDS-page (20µg/puits). Les gels utilisés étaient à 10% d'acrylamide et un marqueur de poids moléculaire apparent a été déposé dans l'un des puits (Kaléidoscope™, BioRad). La migration des protéines a été effectuée dans un tampon de migration Tris-Glycine à 60V puis à 90V pendant la phase de séparation. Les protéines ont par la suite été transférées (1h30, 50mA) sur une membrane de nitrocellulose préalablement imbibée de tampon de transfert Tris-Glycine. L'efficacité du transfert a été vérifiée par une coloration transitoire au rouge ponceau. La membrane a ensuite été rincée puis saturée dans du tampon Tris salin (TBS) -Tween 0.5% complété avec 10% de lait écrémé pendant 1h30 à température ambiante. Après rinçage au TBS-Tween 0.5% trois fois pendant 10 minutes, la membrane a été incubée avec un anticorps primaire anti- $\Delta 9$ -désaturase (Don de Juris Ozols, Farmington, Connecticut, USA) dilué au 1/2000^{ème} dans du TBS-Tween à 5% de lait écrémé sous agitation pendant une nuit à 4°C. Après une étape de rinçage, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin (chèvre anti-IgG de lapin, Sigma) couplé à l'Horseradish Peroxidase (HRP) à 2µg/mL dans du TBS-Tween à 10% de lait écrémé pendant 1h30 à température ambiante. La membrane a été rincée une dernière fois dans du TBS-Tween 0.5% (3 fois 10 minutes) puis dans du TBS pendant 10 minutes. Enfin, l'activité peroxydase a été déterminée par détection de la chimiluminescence sur des films photographiques (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) permise par l'utilisation d'Immobilon™ (Millipore). La membrane a par la suite été incubée pendant 1h30 à température ambiante sous agitation avec un anticorps anti-albumine (mouton anti-albumine rat, Thermo-Scientific) couplé à l'HRP à 5ng/mL dans du TBS-Tween à 10% de lait écrémé. L'albumine constituait ici le contrôle interne permettant la normalisation des résultats. La membrane contenant le pool des échantillons de chaque groupe (n=8) est présentée comme exemple (**Figure 70**).

Index de désaturation, triglycérides et RT-qPCR

L'activité de la $\Delta 9$ -désaturase est estimée par le calcul des index de désaturation (16:1 n-7+18:1 n-7) /16:0 issus des compositions tissulaires en AGT. Les TG plasmatiques sont dosés à l'aide d'un kit commercial (TRIG, Randox). L'expression génique de *SCD1* codant pour la $\Delta 9$ -désaturase et de

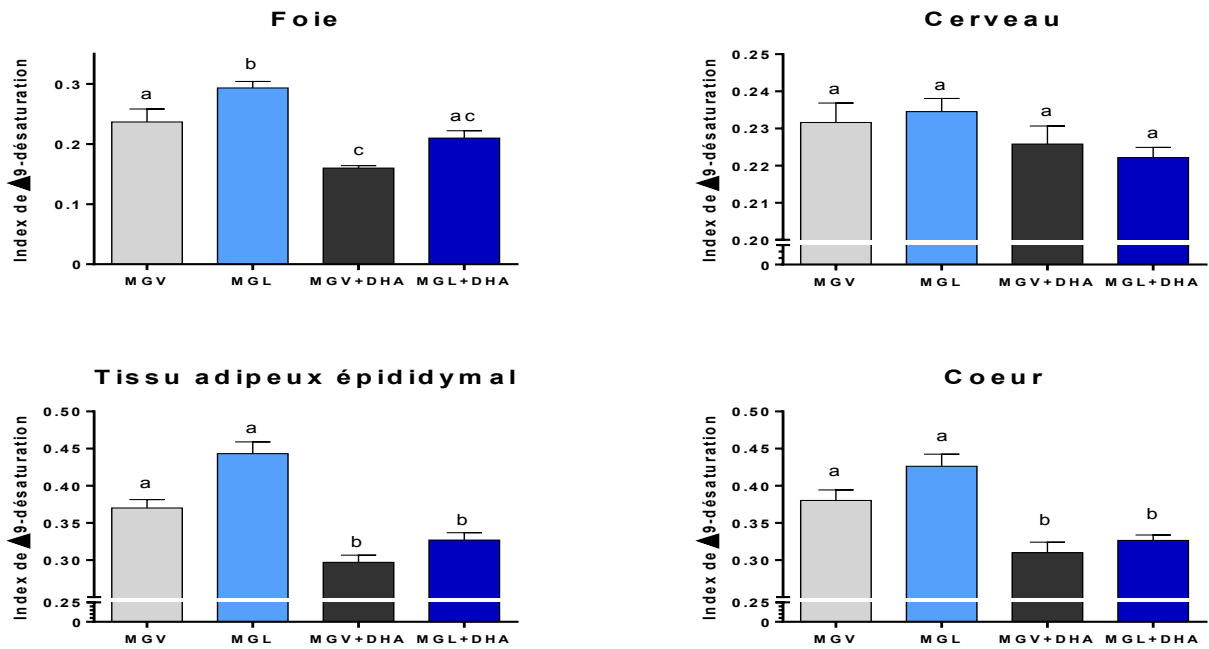
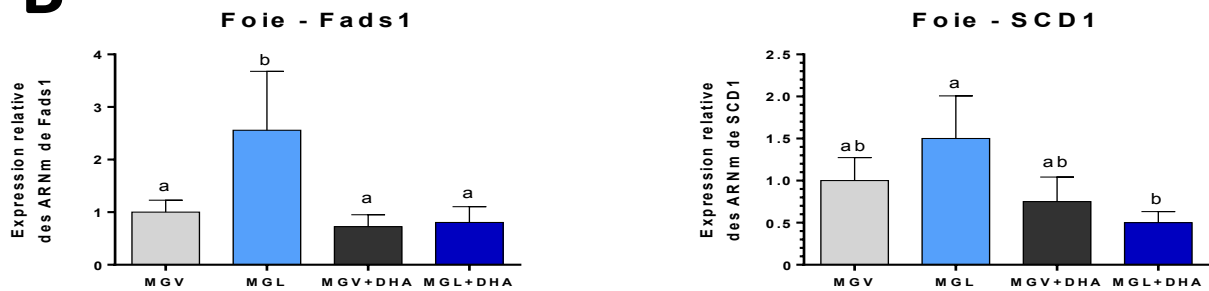
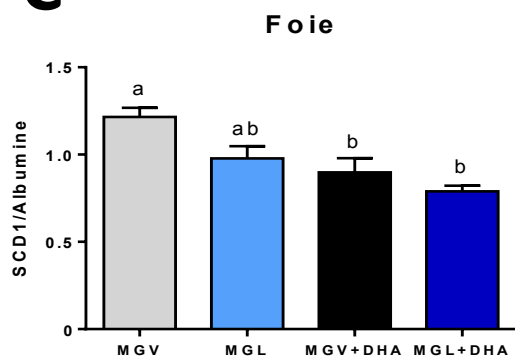
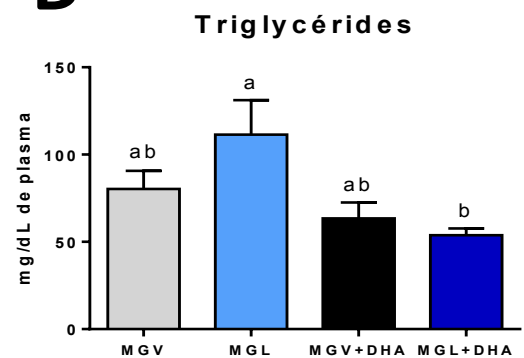
A**B****C****D**

Figure 71. Influence des régimes sur la delta-9 désaturase et les triglycérides plasmatiques

A) Index de désaturation de la $\Delta 9$ désaturase dans différents tissus estimé par le calcul du ratio $(16:1\ n-7+18:1\ n-7)/16:0$ **B)** Expression génique de SCD1 et de Fads1 et **C)** quantification protéique de SCD1 dans le foie. **D)** Taux de triglycérides plasmatiques pour des rats mâles soumis à partir du sevrage pendant 6 semaines à des régimes à base de MGV ou de MGL supplémentés ou non avec 0,5% de DHA ($n=8/\text{groupe}$, moyenne \pm SEM).

Fads1 codant pour la $\Delta 5$ -désaturase sont mesurée par RT-qPCR comme décrit dans l'article 3 pour la $\Delta 6$ -désaturase (*Fads2*). Les amorces et les sondes Taqman® utilisées sont les suivantes :

SCD1

Amorce sens (5'-3') : CAA AGA GAA GGG CGG AAA GC

Amorce anti-sens (5'-3') : AAA GTT TCG CCC CAG CAG TA

Sonde 5'FAM/TAMRA-3' : CTG GCC TCC TGC TCA TGT GCT TCA

Fads1

Amorce sens (5'-3') : AGC TTT GAA CCC ACC AAG AAT AAG

Amorce anti-sens (5'-3') : CAG CAG GAT GTG CAG CAG ATA G

Sonde 5'FAM/TAMRA-3' : TTC CGG GAG CTG CGG GCC

Les résultats sont exprimés en $\Delta\Delta C_t$ par la méthode de Pfaffl (Bacon et al. 2017), le groupe MGV étant utilisé comme contrôle.

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM (n=8/groupe). Les différences entre groupes sont analysées par ANOVA à 1 facteur (régime) suivi d'un test *post-hoc* de comparaison multiple de Tukey ajusté par méthode *fdr*. Le risque de première espèce α est fixé à 5%.

1.3.3.2 Résultats et discussion

Les index de désaturation ont été utilisés pour estimer l'activité de la $\Delta 9$ -désaturase (**Figure 71-A**). Les régimes à base de MGL augmentent l'activité estimée de la $\Delta 9$ -désaturase dans le foie et le tissu adipeux alors que la supplémentation en DHA diminue les index de $\Delta 9$ -désaturation pour les deux mélanges lipidiques étudiés dans l'ensemble des tissus étudiés à part dans le cerveau et les rétines, confirmant encore une fois la stabilité compositionnelle de ce tissu. Le ratio C18:1 n-9/C18:0 aurait également pu être mesuré, cependant, il n'aurait pas été représentatif ici de l'activité de SCD1 du fait de la compensation des régimes MGV par l'acide oléique (C18:1 n-9).

Les mêmes profils de résultats apparaissent pour l'expression des gènes SCD1 et *Fads1*. Ainsi, les expressions hépatiques de SCD1 et de *Fads1* tendent à augmenter avec un régime MGL et sont diminuées avec la supplémentation en DHA (**Figure 71-B**). Seule la supplémentation en

DHA impactait la quantité protéique de SCD1 en diminuant sa concentration hépatique (**Figure 71-C**).

Les AGPI n-3 et n-6 sont connus pour inhiber indirectement la transcription de SCD1 *via* la régulation de l'expression du facteur de transcription SREBP-1 (Ntambi 1999). En effet, une étude réalisée sur des cultures d'hépatocytes primaires a montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 par les AGPI à longue chaîne n-6 et n-3 était due à une diminution de son taux de transcription génique (Jacobs et al. 2013). Le mécanisme d'action suivant a été proposé : les AGPI inhibent la transcription du gène SREBP-1 ainsi que le clivage du précurseur SREBP-1 en SREBP-1 mature, nécessaire à sa translocation dans le noyau. SREBP-1 est un facteur de transcription nucléaire qui va se fixer à l'élément de réponse Sterol Regulatory Element (SRE) des gènes lipogéniques dont fait partie SCD1, activant ainsi leur transcription (Sampath and Ntambi 2005). Nos résultats semblent converger en faveur de cette hypothèse puisque nous avons montré une diminution de la quantité de transcrits et de la quantité de protéines de SCD1 lorsque le régime était directement supplémenté en DHA. Néanmoins, il ne faut pas écarter la possibilité qu'un second niveau de régulation ait pu contribuer à la diminution de l'expression de SCD1. Par exemple, une régulation post-transcriptionnelle de SCD1 par modification de la stabilité de ses ARNm n'est pas à exclure. En effet, une étude réalisée sur culture cellulaire d'adipocytes a montré que l'ajout d'ARA dans le milieu, était responsable d'une diminution de la demi-vie des ARNm de SCD1 et le DHA, peut être responsable d'effets similaires. (Sessler et al. 1996). Néanmoins, les animaux étant mis à jeun avant les sacrifices, l'activité moyenne de la $\Delta 9$ -désaturase restait faible par rapport à un état nourri, limitant l'interprétation des résultats de notre étude. L'augmentation de *Fads1* avec le régime MGL peut être associée à l'acide myristique présent dans le régime MGL en plus grande quantité que dans les régimes MGV. En effet, il a été montré que l'acide myristique augmentait l'activité des enzymes $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases mais que l'augmentation de l'activité enzymatique associée à l'addition d'acide myristique était plus importante pour la $\Delta 5$ -désaturase que pour la $\Delta 6$ -désaturase (Vincent Rioux, Pédrone, and Legrand 2011). Cela expliquerait aussi pourquoi aucune augmentation de l'activité $\Delta 6$ -désaturase n'a été mesurée avec le régime MGL dans l'article 3 en fonction des régimes, bien qu'elle ait été montrée *in vitro* pour des concentrations bien plus importantes que celles présentes dans nos régimes (Sophie JAN, Hervé GUILLOU, Sabine D'ANDREA, Stéphanie DAVAL, Monique BOURIEL, Vincent RIOUX 2004).

Pour finir, les TG plasmatiques tendaient à augmenter avec un régime MGL, alors que la supplémentation en DHA associée au mélange MGL montrait un effet hypotriglycéridémiant

du DHA (**Figure 71-D**). Alors que la diminution des TG plasmatiques en présence des AGPI-LC n-3 est bien décrite et associée entre autres à l'inhibition des gènes de la lipogenèse, l'augmentation de TG des rats soumis à un régime MGL est plus intrigante. En effet, la biosynthèse des TG dans le foie nécessite une biodisponibilité suffisante d'acide oléique et d'acide palmitoléique provenant directement de l'alimentation ou de la synthèse *de novo* (Paillard et al. 2008). De plus, l'acide oléique est le substrat préférentiel de l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) qui permet l'obtention de cholestérol estérifié (Jacobs et al. 2013). Dans nos régimes, les régimes MGV contiennent environ 20% d'acide oléique de plus que dans les régimes MGL et nous aurions pu nous attendre à une augmentation des TG avec le régime MGV associé à l'augmentation de la biodisponibilité de l'acide oléique dans ce régime. Néanmoins, aucune différence n'a été observée concernant les proportions d'acide oléique entre les régimes MGV et MGL, les C16:1 n-7 et C18:1n-7 de même que l'index de $\Delta 9$ -désaturation étant même plus important pour les rats MGL. Ainsi, l'augmentation de SCD1 dans le régime MGL pourrait entraîner une plus grande biodisponibilité des monoinsaturés et devrait augmenter la formation de TG rentrant dans la composition des VLDL (M. A. Leslie et al. 2015). En effet, dans un modèle *in vitro* d'hépatocytes de poulet, la sécrétion de VLDL est fortement augmentée par l'acide oléique endogène synthétisé par le $\Delta 9$ -désaturase à partir de l'acide stéarique, jusqu'à pouvoir provoquer une hypertriglycémie (P Legrand et al. 1997).

De plus les régimes MGL contenaient 20% d'acides gras saturés de plus que les régimes MGV et les taux de cholestérol total et de cholestérol non-HDL étaient augmentés pour les rats soumis à un régime MGL de l'article 2 (**Tableau 19 ou Tab 4 – Art 3**). Il a été montré que les acides gras saturés peuvent entraîner un dysfonctionnement de la captation des LDL, donc de l'activité du récepteur aux LDL, et par conséquent augmenter le cholestérol plasmatique non-HDL (Spady, Woollett, and Dietschy 1993). Les acides gras saturés (C12:0, C14:0, C16:0), à l'inverse de l'acide oléique, ont été montrés comme inhibant partiellement l'activité de l'ACAT, augmentant ainsi la quantité de cholestérol libre dans la cellule (Dietschy 1998). L'augmentation du cholestérol libre cellulaire inhiberait le clivage de SREBP-1 et réduirait ainsi la transcription du gène, diminuant ainsi l'activité globale du récepteur aux LDL (Daumerie, Woollett, and Dietschy 1992).

2 Vers l'optimisation des conditions nutritionnelles et physiologiques pour l'incorporation de lipides laitiers comme vecteur d'optimisation du statut tissulaire en AGPI n-3

2.1 Contexte de l'étude

Le niveau de preuve d'une augmentation du statut tissulaire en AGPI-LC n-3 associé à une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime est de plus en plus important. Néanmoins, comme toute expérimentation nutritionnelle, l'hétérogénéité des facteurs impliqués dans la modulation nutritionnelle des AGPI-LC n-3 ainsi que l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux font qu'il est difficile de statuer sur la provenance des effets associés à des régimes MGL ainsi que sur les meilleures conditions physiologiques et nutritionnelles dans lesquelles ces effets bénéfiques sont retrouvés. En effet les articles de la littérature diffèrent de part : (i) les régimes servant de contrôles négatifs ou positifs (MGV, MGL, \pm DHA, \pm ARA), (ii) les huiles utilisées pour la fabrication des régimes semi-synthétiques, (iii) les compositions en AGT des bases lipidiques (taux d'AGS, taux d'AGMI, ratio LA/ALA, quantité de LA et d'ALA), (iv) la part énergétique des lipides dans les régimes (4-10%), (v) les stades de développement (naissance, sevrage, adulte), (vi) les modèles nutritionnels utilisés (carence en ALA ou non), (vii) le sexe, (viii) l'espèce (souris, rat, Homme)

Ainsi une étude globale basée sur les résultats des études précédentes est nécessaire pour clarifier et établir le discours nutritionnel du potentiel effet bénéfique de l'incorporation des lipides laitiers en fonction du stade de développement, du sexe mais surtout de la quantité de précurseur ALA inclus dans le régime. En effet, la plupart des études étudiant le potentiel effet bénéfique d'une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime a montré une augmentation du statut cérébral en DHA au sein des acides gras totaux. Dans notre étude, nous avons montré uniquement une augmentation du DHA cérébral dans les acides gras des PL. Dans la plupart de ces études, le ratio LA/ALA est différent entre le régime MGV et MGL en faveur d'un ratio plus bas pour les régimes MGL. La diminution de ce ratio est le plus souvent associée à une augmentation de la proportion d'ALA inclus dans les régimes semi-synthétiques car la composition de ces régimes est le plus souvent basée sur la composition des formules commerciales.

A**Composition de la base lipidoprive (g/kg)**

Amidon de maïs	402,3
Sucrose	201,2
Caséine HCl	220
Cellulose	20
Minéraux 102	45
Vitamines 102	10
DL-méthionine	1,5

B**Composition des régimes en huiles (%)**

Régimes	MGL	MGV5	MGV10
MGLA	50		
Palme		62	62
Oléisol	19	5	7
Tournesol	8		11
Colza	23	23	15
Tournesol hydrogéné		10	5

C**Composition des régimes en acides gras**

En % des acides gras totaux	MGL	MGV5	MGV10
AG saturés	41,9	41,5	39,0
AG courts (4:0 à 10:0)	4,3	0,1	0,0
AG iso & anteiso	1,0	0,0	0,0
AG pairs (12:0 à 22:0)	35,6	41,3	38,9
14:0	7,1	1,0	0,7
16:0	20,3	32,3	31,9
18:0	5,5	7,3	5,5
AG impairs (11:0 à 17:0)	1,0	0,1	0,1
AGMI	41,7	43,8	42,9
16:1 n-7	1,0	0,5	0,5
18:1 n-7	1,4	1,3	1,0
18:1 n-9	36,2	41,5	41,4
Autres	2,5	0,2	0,1
AGPI	16,4	14,8	18,1
18:2 n-6 (LA)	13,0	12,3	16,5
18:3 n-3 (ALA)	2,6	2,5	1,5
Autres (18:2Δ9c,11t; ...)	0,8	0,0	0,1
Ratio LA/ALA	5,0	5,0	10,9

Tableau 21. Composition des régimes expérimentaux

Ainsi, le but de cette étude était principalement de vérifier si l'impact de la MGL sur l'amélioration du statut tissulaire en AGPI-LC n-3 et principalement en DHA cérébral était plus associé au mélange lipidique ou à la quantité de précurseurs LA et ALA présents dans les régimes en fonction du stade de développement et du sexe des animaux.

Cette étude est encore en cours d'analyse et de traitement à l'écriture de ce manuscrit. Ainsi, certains résultats sont présentés sans analyse statistique. À ce stade, l'étude est présentée sous forme d'une partie Matériel et Méthodes suivie d'une présentation des Résultats discutés et s'intéresse pour finir aux perspectives expérimentales.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Produits chimiques

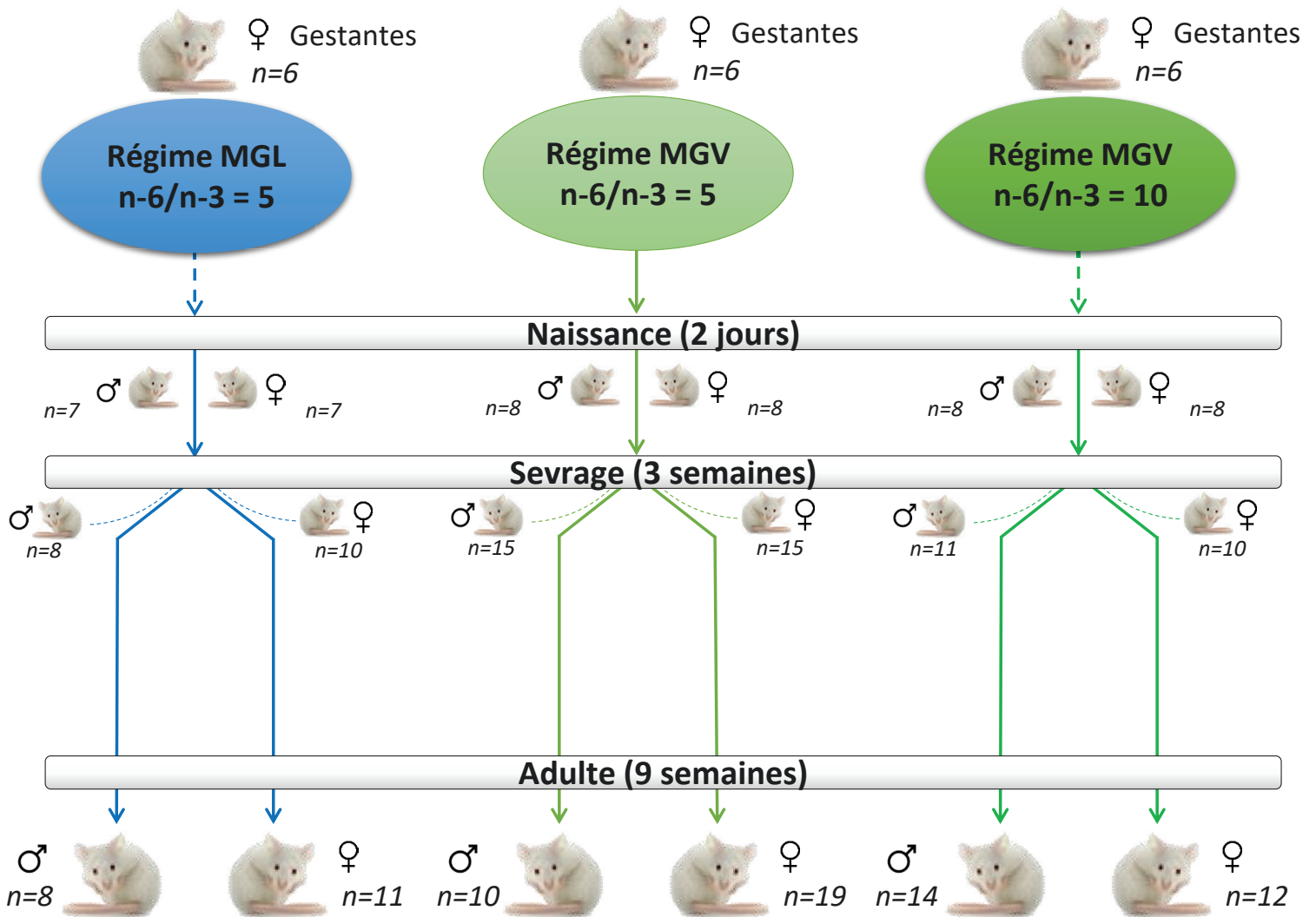
Les solvants et les produits chimiques utilisés au cours de l'étude ont été obtenus chez Thermo Scientific, Sigma, VWR et Fisher Scientific. La matière grasse laitière anhydre (MGLA), les huiles de tournesol oléique et de palme ont été fournies par Lactalis.

2.2.2 Régimes

Trois régimes différents (**Tableau 21**) ont été préparés à partir d'un mélange lipidique réalisé au laboratoire et d'une base sans lipide (lipidoprive) préparé à l'unité de préparation des aliments expérimentaux (UPAE) de l'INRA Jouy en Josas. Le mélange de la base lipidique avec la base lipidoprive, la transformation des mélanges sous forme de croquettes et le séchage des aliments ont été réalisés par l'UPAE. La composition de la base lipidoprive est présentée dans le **Tableau 21-A** et la composition du mélange d'huile est présenté dans le **Tableau 21-B** et la composition en acides gras du mélange d'huiles est présenté dans le **Tableau 21-C**. Tous les régimes sont isolipidiques et isocaloriques et contiennent 10% de lipides en masse (20% en énergie), et sont donc légèrement hyperlipidiques par rapport aux recommandations chez le rat (Lewis et al. 2006; NRC 1995).

Les mélanges lipides sont composés soit d'un mélange d'huile végétales (MGV) soit d'un mélange de 50% de matières grasses végétales et de 50% de matière grasse laitière (MGL) apportée sous la forme de matière grasse laitière anhydre (MGLA). Deux des régimes avaient

A Design expérimental



B Répartition des animaux

Sexe	Stade	MGL5	MGVS5	MGVS10	Sous-total
Males	Naissance	7	8	8	23
	Sevrage	8	15	11	34
	Adulte	8	10	14	32
	Sous-total	23	33	33	89
Femelles	Naissance	7	8	8	23
	Sevrage	10	15	10	35
	Adulte	11	19	12	42
	Sous-total	28	42	30	100
	Mères	6	6	6	18
	Total				207

C Ratons allaités de 15 jours



Figure 72. Design expérimental et répartition des animaux

un ratio LA/ALA de 5,0 et une même proportion massique d'ALA (MGV5 et MGL5) **Tableau 21-C**. Le troisième régime était composé du mélange d'huiles végétales mais avec un ratio LA/ALA de 10,9 et une proportion massique d'ALA de 1,5 (MGV10). En effet, dans les études précédentes, la plupart des formules commerciales étudiées avaient un ratio LA/ALA aux alentours de 5 ou de 10-12 pour les régimes MGV. Pour prévenir la possible peroxydation des AGPI, 0,12% massique de vitamine E a été ajouté à toutes les bases lipidiques puisque les croquettes ont été conservées à température ambiante mais à l'abri de la lumière pendant la durée de l'expérimentation. Les acides gras à chaînes courtes et moyennes apportés par la MGLA ont été compensés par de l'huile de palme et de l'huile de tournesol hydrogénée, augmentant la composition en acides palmitique et stéarique, respectivement. La composition en acides gras des huiles commerciales est présentée en **Annexe IV-B**. La composition en acides gras des huiles, des mélanges lipidiques puis des croquettes ont été réalisés par GCMS après extraction des lipides totaux par la méthode de Folch (Gossert et al. 2011) puis trans-méthylation des lipides totaux en esters méthyliques d'acides gras par incubation des lipides totaux dans du H₂SO₄ méthanolique et extraction au pentane comme présenté dans l'article 3.

2.2.3 Animaux

Dix-huit rattes femelles Sprague Dawley gestantes à J15 nullipares (Envigo, France) ont été hébergées en cage individuelle, pesées et réparties aléatoirement entre les 3 régimes : MGL5, MGV5 et MGV10 (**Figure 72-A**). Les animaux ont été hébergés en animalerie conventionnelle avec un cycle jour/nuit inversé de 12h/12h et ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture, le milieu des cages a été enrichi. Trois jours avant la mise bas, les milieux ont été enrichis avec du papier de gestation (Envigo) permettant aux rates de nicher. Le jour de leur naissance, les ratons ont été pesés par portée. A J2, les ratons ont été sexés visuellement grâce à leur distance ano-génitale pour permettre la répartition future des animaux au sein des différents groupes (**Figure 72-B**). Les litières ont été changées à J15 uniquement pour ne pas perturber la lactation des animaux (**Figure 72-C**). Au sevrage (J21), les ratons ont été pesés, identifiés par marquage à la queue et ont été séparés de leur mère puis ont été répartis par sexe et par régime à 4 animaux par cage (3 quand nécessaire) en faisant attention à ne pas mettre 2 rats issus d'une même fratrie ensemble pour ne pas influencer la mise en place de la dominance au sein d'une même cage. A partir du sevrage et jusqu'à l'âge adulte (J65), les rats ont été pesés 2 fois par semaine et les

litières ont été changées toutes les semaines. Tous les animaux nés ont été utilisés dans l'expérimentation.

À J2, certains rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et le sang a été prélevé par ponction intracardiaque avec une seringue (300µL) contenant une solution d'EDTA. Au sevrage et à l'âge adulte, les animaux ont été sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (140mg/kg de poids corporel) et le sang a été collecté par ponction intracardiaque par aspiration à l'aide de Monovettes® traitée à l'EDTA K₂ (Starsedt). Les animaux sont sacrifiés à l'état nourri. Pour chaque animal, un échantillon (environ 200mg) de la même partie du grand lobe du foie, du ventricule gauche du cœur, de la partie frontale de l'hémisphère gauche du cerveau et du contenu gastrique a été prélevé et conservé dans 4mL de diméthoxyméthane/méthanol 2/1 (v/v). Le tissu restant a été congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C en attente de futures analyses. Les organes entiers ont été prélevés chez les rats à J2. Pour les rats aux stades sevrage et adulte, les yeux ont été prélevés et conservés dans une solution de formol 4% à 4°C avant la dissection des rétines. Le sang total a été centrifugé à 2000g/20min/T° ambiante, 500µL de plasma et 500mg de GR ont été prélevés pour l'analyse des acides gras et conservés dans une solution d'hexane/isopropanol 2/1 (v/v). Le reste du plasma a été aliquoté et conservé à -80°C pour analyse ultérieure. Au sevrage des rats, les mères ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique (30mg/kg de pc). Le lait des mères a été prélevé par massage de la glande mammaire après injection intraveineuse d'une solution d'ocytocine (50UI, Sigma). Les rattees ont ensuite été sacrifiées par injection intracardiaque d'une dose létale de pentobarbital sodique (140mg/kg de poids corporel).

Toutes les expérimentations ont été réalisées en accord avec les « European Union Guidelines for Animal Care and Use » (2003/35/CEE). Les procédures expérimentales (N° de dossier APAFIS : 2016112213509789-V2) ont été approuvées par le comité d'éthique et de bien-être animal rennais et est en attente d'approbation du ministère de l'éducation, de la recherche et de l'innovation français.

2.2.4 Compositions tissulaires en acides gras et dosages

Les compositions tissulaires en acides gras des tissus ont été réalisés par GCMS comme décrit dans l'article 3. Succinctement, les lipides totaux des tissus ont été extraits par méthode de Delsal (Delsal 1944) et le plasma et les globules rouges (GR) au mélange l'hexane/isopropanol

2/1. La dérivation des lipides totaux en esters méthyliques d'acides gras s'effectue selon la méthode au trifluorure de bore (BF₃) (Morrison and Smith 1964), avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GCMS).

2.2.5 Analyses statistiques

L'analyse statistique ainsi que le traitement des données est en cours à l'écriture de ce manuscrit. Les résultats préliminaires sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM et tous les groupes ont été représentés indépendamment les uns des autres. Les différents effets d'intérêt sont les suivants :

- Effet base lipidique : MGL5 vs MGVS
- Effet ratio : MGVS vs MGVS10
- Effet formule : MGL5 vs MGVS10
- Effet temps : stade naissance vs sevrage vs adulte
- Effet sexe : femelles vs mâles

Pour comparer les différences entre les groupes, un modèle linéaire mixte avec 3 facteurs fixes (régime, sexe, stade) et X facteurs aléatoires est (ou sera) utilisé. Les effets aléatoires potentiels (mère, nombre de rats par fratrie, répartition mâles/femelles par fratrie...) sont testés indépendamment en incluant les facteurs fixes précédent comme facteurs aléatoires, puis sont ajoutés au modèle général si l'effet est significatif. Les comparaisons multiples entre les groupes sont effectuées par stade et par sexe à l'aide du test de Tukey-Kramer ajusté par méthode « *false discovery rate* » (fdr) quand l'ANOVA est significative. La normalité du modèle et la normalité des résidus sont vérifiées graphiquement et l'homoscédasticité est considérée respectée. La significativité des corrélations est obtenue avec le modèle de Pearson. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R v3.4.2 ainsi que les packages nlme v3.1.131 et vegan v2.4.4.

Par la suite, une analyse multivariée pour comparer les sexes par analyse de redondance (RDA) pourra être utilisée. De plus, la construction d'un modèle de prédiction du DHA cérébral en fonction des paramètres sanguins pourra être entrepris par méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS pour *partial least squares analysis*).

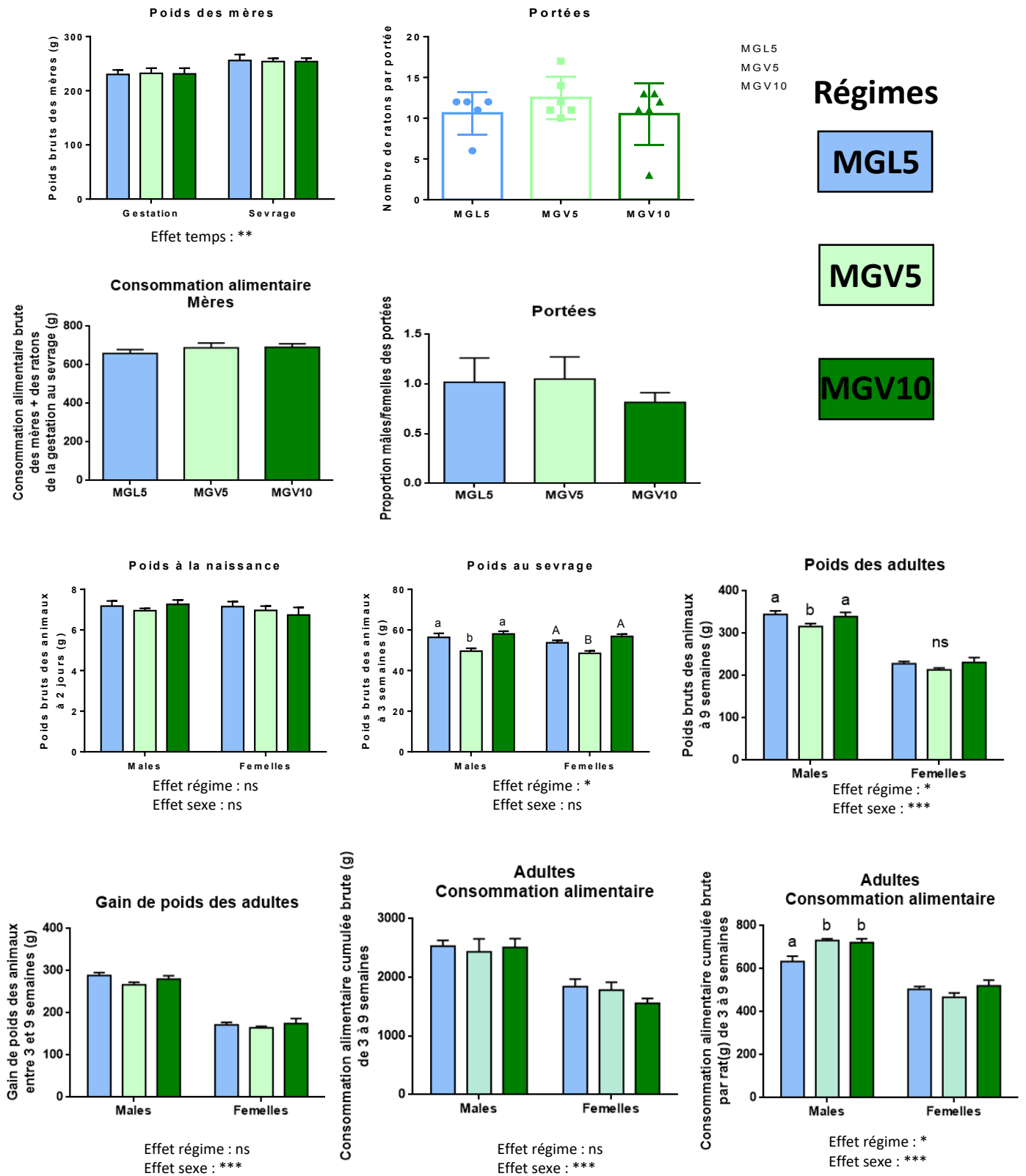


Figure 73. Résultats d'animalerie

2.3 *Résultats préliminaires et discussion*

2.3.1 Croissance et consommation alimentaire

Aucune différence n'a été retrouvée entre les différents régimes pour le nombre de ratons par portée, la répartition mâle/femelle au sein des portées et le poids à la naissance des ratons (**Figure 73**). De même les régimes n'ont eu aucune influence sur le poids et la consommation des mères avant et après la gestation jusqu'au sevrage des ratons et les mères ont bien repris du poids après la naissance des ratons.

Etrangement, au sevrage les ratons dont les mères sont soumises au régime MGV5 ont un poids corporel moins important que les autres groupes et cette différence se maintient pour les mâles jusqu'à l'âge adulte pour le groupe MGV5, alors que les rats mâles adultes des régimes MGV5 et MGV10 ont eu une consommation alimentaire plus importante que pour ceux du groupe MGL5. Néanmoins cette différence de poids n'est plus retrouvée à l'âge adulte en considérant le gain de poids de animaux à partir du sevrage. Ainsi, la prise en compte des mesures répétées de consommation et de gain de poids devrait tasser cette différence. En effet, les régimes sont isolipidiques, isocaloriques et le rat est un mammifère qui régule sa prise alimentaire en fonction de sa prise énergétique. De plus, aucune différence n'a été retrouvée entre les régimes pour le temps de gestation des mères, qui aurait pu influencer sur le poids corporel des ratons à la naissance qui n'a lui aussi pas différencié entre les groupes.

Le nombre total de rats est inférieur dans le groupe MGL5 car une mère et ses ratons ont dû être sacrifiés peu après leur naissance à cause d'une déshydratation de la mère allaitante pendant la mise bas et peut-être pendant le premier jour après la naissance. En effet, la tétine du biberon s'était bouchée avec de petits bouts de sciure pendant deux jours. Cela a malheureusement suffi à restreindre le lait de la mère ainsi que la croissance et l'hydratation des ratons, très fragile à ce stade. Le taux de survie des ratons de notre étude est donc de 97%.

2.3.2 Statut cérébral en acides gras

Le statut en DHA dans les AGT des lipides totaux du cerveau était plus élevé pour les animaux soumis aux régimes MGL5 et MGV5 comparé au groupe MGV10, et cela peu importe le sexe et le stade de développement des animaux (**Tableau 22**). Le statut en DPA a augmenté comme

% des AGT	MALES									ANOVA		
	Naissance			Sevrage			Adulte			Régime	Sexe	Temps
	L5	V5	V10	L5	V5	V10	L5	V5	V10			
C14:0	1,53±0,10	1,44±0,07	1,42±0,10	0,47±0,03	0,47±0,02	0,4±0,01	0,16±0,01	0,13±0,01	0,16±0,02	*		***
C15:0	0,13±0,02	0,10±0,01	0,09±0,02	0,13±0,00	0,11±0,00	0,11±0,02	0,15±0,01	0,11±0,00	0,11±0,00	.	***	***
C16:0	29,26±0,28	28,41±0,31	28,83±0,38	24,06±0,36	24,12±0,16	23,67±0,16	20,53±0,26	20,28±0,26	19,9±0,19	*		***
C18:0	16,91±0,53	Tr	15,95±0,25	20,07±0,07	20,07±0,08	20,25±0,09	21,13±0,12	21,33±0,07	21,32±0,13	.		***
C20:0	Tr	Tr	Tr	0,15±0,01	0,15±0,01	0,17±0,01	0,21±0,01	0,18±0,01	0,21±0,01	*		***
Saturés	47,83±0,69	46,14±0,24	46,29±0,36	44,88±0,32	44,93±0,13	44,61±0,15	42,17±0,23	42,04±0,27	41,71±0,25	.	**	***
C16:1n-9	2,02±0,06	2,06±0,03	2,03±0,06	0,55±0,02	0,53±0,01	0,45±0,04	0,15±0,01	0,18±0,01	0,15±0,01	***	***	***
C16:1n-7	1,47±0,03	1,50±0,02	1,47±0,03	0,56±0,01	0,53±0,01	0,53±0,02	0,36±0,02	0,39±0,02	0,37±0,01	***		***
C18:1n-9	11,88±0,25	13,26±0,09	12,81±0,11	13,48±0,34	13,74±0,19	13,91±0,20	17,06±0,19	17,42±0,31	17,81±0,37	***	.	***
C18:1n-7	3,32±0,55	2,99±0,08	3,25±0,24	2,95±0,06	2,93±0,03	2,88±0,05	3,71±0,07	3,71±0,05	3,55±0,07	.		***
C20:1n-9	0,17±0,01	0,21±0,01	0,19±0,01	0,38±0,02	0,38±0,01	0,40±0,02	0,91±0,04	0,92±0,04	0,96±0,04	*	*	***
C20:1n-7	Tr	Tr	Tr	0,16±0,02	0,17±0,02	0,23±0,05	0,66±0,03	0,38±0,01	0,45±0,02	*		***
AGMI	18,85±0,51	20,02±0,09	19,75±0,22	18,08±0,41	18,28±0,2	18,36±0,23	22,59±0,29	23,00±0,39	23,30±0,36	*		***
C18:2n-6	0,87±0,05	1,26±0,09	1,23±0,08	1,11±0,06	1,07±0,04	1,07±0,05	0,78±0,01	0,68±0,06	0,88±0,11	.		***
C20:2n-6	Tr	Tr	Tr	0,18±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01	.	*	***
C20:3n-6	0,41±0,02 ^{ab}	0,44±0,02 ^a	0,39±0,03 ^b	0,54±0,02 ^{ab}	0,59±0,02 ^a	0,52±0,02 ^b	0,44±0,01 ^{ab}	0,46±0,02 ^a	0,44±0,01 ^b	**	***	***
C20:4n-6	13,37±0,19	13,47±0,08	13,78±0,09	14,48±0,17	14,45±0,09	14,69±0,12	12,32±0,12 ^a	12,44±0,10 ^b	12,72±0,08 ^c	**	***	***
C22:4n-6	3,17±0,07 ^a	3,24±0,06 ^b	3,33±0,05 ^c	3,59±0,07 ^b	3,40±0,05 ^c	3,66±0,03 ^a	3,49±0,06	3,41±0,07	3,72±0,04	***	*	***
C22:5n-6	3,47±0,20 ^{ab}	3,42±0,11 ^b	4,31±0,08 ^a	1,37±0,08 ^b	1,27±0,03 ^b	2,02±0,06 ^a	0,51±0,03 ^a	0,50±0,04 ^a	0,81±0,03 ^b	***	***	***
C24:4n-6?	0,35±0,01	0,33±0,01	0,31±0,03	0,38±0,01	0,37±0,01	0,41±0,00	0,26±0,02	0,24±0,01	0,26±0,01	**	*	***
C24:5n-6?	0,63±0,02	0,62±0,02	0,68±0,01	0,17±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	Tr	Tr	Tr	***	*	***
AGPI n-6	22,27±0,21^b	22,79±0,25^b	24,03±0,17^a	21,81±0,16^b	21,48±0,09^b	22,71±0,14^a	18,03±0,19^a	17,9±0,14^a	19,01±0,08^b	***	***	***
C22:5n-3	0,35±0,02 ^a	0,35±0,01 ^a	0,31±0,06 ^b	0,26±0,01 ^a	0,28±0,01 ^a	0,23±0,01 ^b	0,20±0,01	0,20±0,01	0,16±0,01	***	***	***
C22:6n-3	10,29±0,26 ^{ab}	10,44±0,10 ^a	9,28±0,23 ^b	14,71±0,16	14,69±0,07	13,77±0,07 ^b	16,76±0,14 ^b	16,66±0,16 ^b	15,58±0,18 ^a	***		***
AGPI n-3	10,65±0,27^a	10,79±0,09^a	9,59±0,23^b	14,97±0,16	14,97±0,07^a	14±0,08^b	16,96±0,14^b	16,86±0,17^b	15,74±0,18^a	***		***

% des AGT	FEMELLES									ANOVA		
	Naissance			Sevrage			Adulte			Régime	Sexe	Temps
	L5	V5	V10	L5	V5	V10	L5	V5	V10			
C14:0	1,66±0,25	1,51±0,12	1,42±0,08	0,48±0,03	0,46±0,03	0,45±0,04	0,17±0,02	0,22±0,05	0,16±0,01	*		***
C15:0	0,14±0,03	0,10±0,02	Tr	0,12±0,01	0,11±0,00	0,11±0,01	0,96±0,23	1,23±0,09	1,21±0,14	.	***	***
C16:0	29,15±0,28	29,15±0,31	28,82±0,36	23,70±0,25	24,40±0,18	23,95±0,13	20,42±0,16	20,84±0,01	20,78±0,14	*		***
C18:0	16,36±0,14	16,24±0,36	16,44±0,23	20,09±0,06	19,95±0,09	20,26±0,10	21,18±0,14	20,94±0,15	20,98±0,16	.		***
C20:0	Tr	Tr	Tr	0,15±0,01	0,15±0,01	0,15±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01	0,2±0,01	*		***
Saturés	47,3±0,45	47±0,55	46,75±0,55	44,54±0,22	45,08±0,18	44,92±0,16	42,92±0,31	43,41±0,23	43,34±0,22	.	**	***
C16:1n-9	1,95±0,05	2,12±0,03	2,03±0,07	0,52±0,02	0,54±0,02	0,49±0,01	0,19±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01	***	***	***
C16:1n-7	1,54±0,06	1,54±0,04	1,49±0,06	0,54±0,01	0,54±0,02	0,50±0,02	0,41±0,02	0,42±0,15	0,42±0,01	***		***
C18:1n-9	12,72±0,36	13,03±0,23	12,9±0,29	13,57±0,22	13,64±0,17	13,64±0,14	17,09±0,16	17,59±0,35	16,98±0,24	***	.	***
C18:1n-7	2,90±0,10	2,93±0,14	2,87±0,07	2,99±0,02	2,96±0,04	3,01±0,08	3,68±0,04	3,62±0,05	3,68±0,05	.		***
C20:1n-9	0,20±0,01	0,20±0,02	0,22±0,01	0,37±0,02	0,40±0,01	0,37±0,01	0,90±0,03	0,89±0,04	0,42±0,04	*	*	***
C20:1n-7	Tr	Tr	Tr	0,15±0,01	0,19±0,02	0,14±0,01	0,41±0,02	0,37±0,01	0,11±0,02	*		***
AGMI	19,31±0,51	19,82±0,27	19,5±0,22	18,13±0,26	18,27±0,21	18,15±0,14	22,69±0,20^b	23,07±0,40^b	22,59±0,31^a	*		***
C18:2n-6	0,97±0,06	1,19±0,08	1,07±0,10	1,06±0,04	1,06±0,04	1,09±0,05	0,65±0,03	0,81±0,14	0,69±0,05	.		***
C20:2n-6	Tr	Tr	Tr	0,17±0,01	0,17±0,01	0,16±0,01	0,12±0,01	0,09±0,01	0,11±0,01	.	*	***
C20:3n-6	0,36±0,01 ^{ab}	0,41±0,03 ^a	0,38±0,03 ^b	0,54±0,02 ^{ab}	0,56±0,02 ^b	0,49±0,02 ^a	0,38±0,01 ^{ab}	0,39±0,02 ^a	0,42±0,01 ^b	**	***	***
C20:4n-6	13,33±0,39	13,31±0,24	13,92±0,17	14,67±0,07	14,36±0,10	14,74±0,11	12,45±0,12	11,94±0,14	12,3±0,12	**	***	***
C22:4n-6	3,25±0,09 ^b	3,18±0,08 ^a	3,30±0,05 ^c	3,55±0,03 ^b	3,39±0,03 ^a	3,65±0,04 ^c	3,49±0,05 ^a	3,24±0,05 ^b	3,56±0,06 ^c	***	*	***
C22:5n-6	3,41±0,18 ^b	3,33±0,12 ^b	4,30±0,10 ^a	1,39±0,03 ^a	1,28±0,02 ^a	2,08±0,07 ^b	0,50±0,01 ^a	0,49±0,02 ^a	0,87±0,03 ^b	***	***	***
C24:4n-6?	0,33±0,02	0,34±0,01	0,34±0,04	0,39±0,01	0,36±0,01	0,42±0,01	0,24±0,01	0,22±0,01	0,25±0,01	**	*	***
C24:5n-6?	0,64±0,03	0,62±0,01	0,68±0,02	0,17±0,01	0,16±0,01	0,18±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,11±0,05	***	*	***
AGPI n-6	22,42±0,53^a	22,38±0,38^a	24,00±0,27^b	21,94±0,09^a	21,34±0,12^a	22,8±0,17^b	17,87±0,17^a	17,23±0,16^a	18,3±0,12^b	***	***	***
C22:5n-3	0,35±0,01 ^b	0,34±0,02 ^b	0,30±0,01 ^a	0,27±0,01 ^b	0,28±0,01 ^b	0,23±0,01 ^a	0,17±0,01 ^b	0,17±0,01 ^b	0,15±0,02 ^a	***	***	***
C22:6n-3	10,36±0,43 ^b	10,13±0,15 ^b	9,15±0,26 ^a	14,83±0,14 ^b	14,68±0,10 ^b	13,57±0,12 ^a	16,14±0,24 ^b	15,87±0,23 ^b	15,39±0,25 ^a	***		***
AGPI n-3	10,7±0,44^a	10,46±0,15^a	9,45±0,26^b	15,10±0,14^b	14,96±0,10^b	13,81±0,12^a	16,31±0,24^b	16,04±0,22^b	15,54±0,25^a	***		***

Tableau 22. Composition en acides gras totaux du cerveau des rats nourris avec les trois régimes

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ±SEM. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les régimes pour un même stade et un même sexe (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p< 0,001 ; · 0,1<p<0,05). L'ANOVA est réalisée en considérant tous les rats, les deux sexes confondus. Tr : Trace.

pour le DHA mais l'augmentation était moins importante. Les statuts en AGPI-LC n-3 étaient très stables entre les mâles et les femelles. Le statut en DHA a augmenté en fonction du stade de développement, alors que la proportion de DPA a diminué à mesure que les animaux se développaient. La proportion de DHA reste néanmoins 100 fois supérieure à celle du DPA chez l'adulte.

Ainsi, il semblerait donc que ce soit le ratio LA/ALA et donc la quantité de précurseur ALA intégré dans le régime qui impacterait positivement le plus le statut en DHA par rapport au changement de mélange lipidique (MGV5 vs MGL5). Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment par Diné & collaborateurs chez la souris en comparant des régimes dont les compositions de la part lipidique mimaient celles de formules infantiles présentes sur le marché (Diné et al. 2016). En effet dans cette étude, des souris nourries avec des régimes MGL contenant 2,2% d'ALA et avec un ratio LA/ALA de 4,8 de la naissance jusqu'au stade adulte (J90) avaient un statut cérébral en DHA plus élevé que des régimes MGV contenant 1,3% d'ALA et avec un ratio LA/ALA de 11,8. Néanmoins, dans l'article 3, nous avons montré qu'avec une même quantité d'ALA (2,3%) et un même ratio LA/ALA=5 l'incorporation de lipides laitiers dans le régime augmentait le statut cérébral en DHA mais dans la fraction des phospholipides cérébraux uniquement. Ainsi nous ne pouvons pas conclure sur les seuls résultats issus des lipides totaux que le vecteur lipidique n'impacte pas positivement le statut cérébral en DHA. Ainsi, les classes de lipides sont en cours de séparation au laboratoire à l'écriture de ce manuscrit.

Les mécanismes impliqués dans l'effet de la MGL sur l'augmentation du statut tissulaire en AGPI-LC n-3 ont été discuté dans l'article 1. Certaines études montrent que le DHA cérébral viendrait préférentiellement du DHA synthétisé à partir de l'ALA (H M Su et al. 1999; Hui Min Su et al. 1999). Dans notre étude, il semblerait que la quantité d'ALA apportée ait plus d'effet sur le statut cérébral en DHA que la quantité d'ALA préservé de la β -oxydation mitochondriale par les AGCC des lipides laitiers, et également plus d'effet que l'augmentation des activités des enzymes désaturases associée à la présence d'acide myristique dans les régimes à base de MGL (Vincent Rioux, Pédrone, and Legrand 2011).

2.3.3 Vers la confirmation d'un modèle prédictif du DHA applicable à d'autres espèces

Une récente étude a publié un modèle de prédiction du DHA cérébral de rats mâles au sevrage (J20) à partir de la composition en acides gras des globules rouges dans un modèle de « *pups*

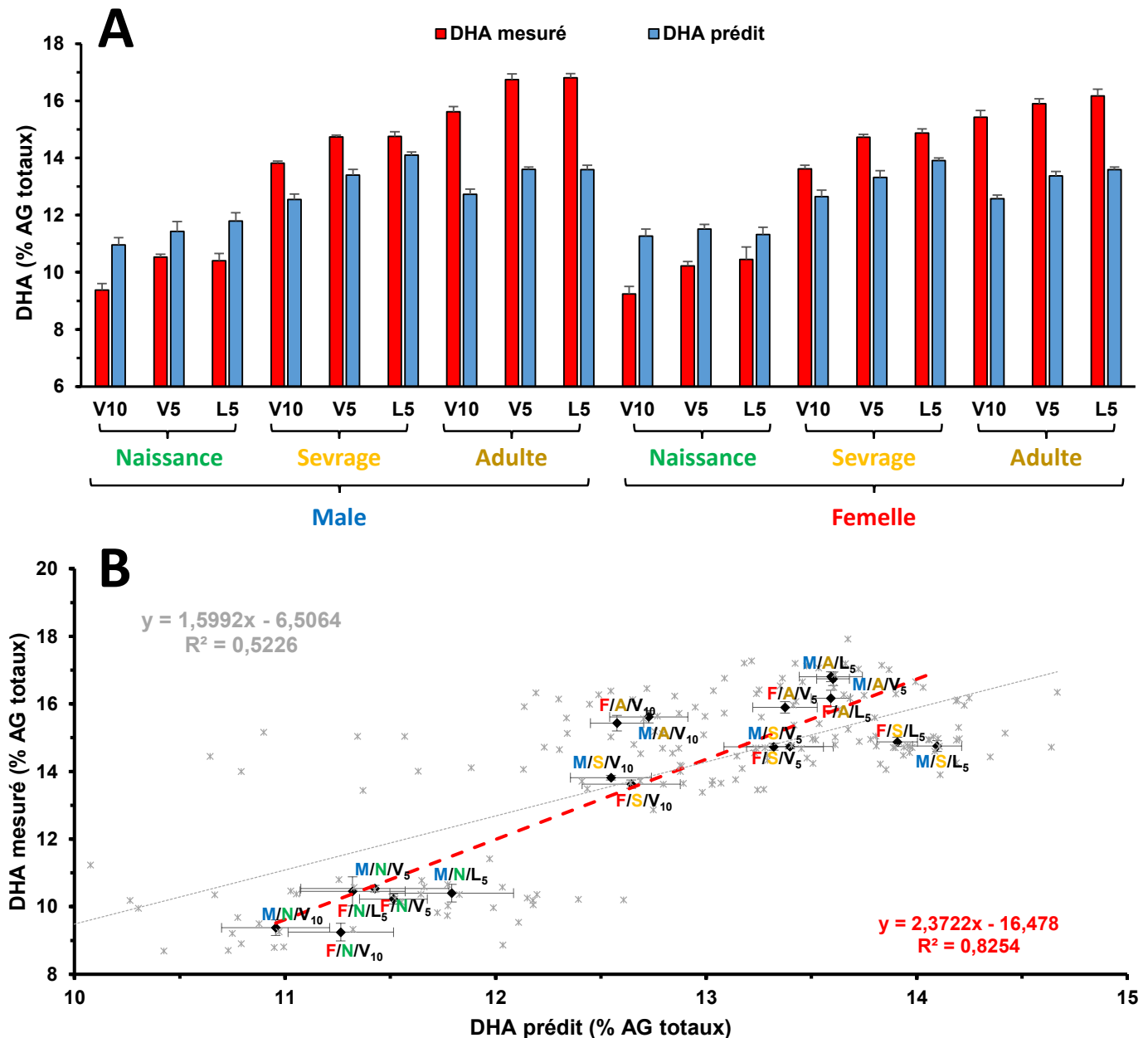


Figure 74. Comparaison de nos données avec le modèle prédictif du DHA dans le cerveau

(A) Comparaison des valeurs de DHA cérébrales mesurées dans notre étude ou prédites à partir de la composition en AGT des globules rouges selon le modèle de Aidoud & al., 2018. (B) Corrélation entre les moyennes par régime/stade/sexe (rouge) ou par individus (gris) des valeurs prédites et mesurées de DHA cérébral.

in the cup » selon la formule : % de DHA cérébral prédit = $-(0,0914951 * \%GR\ C16:0) - (0,12164 * \%GR\ C18:1n-9) + (0,627259 * GR\ \% C18:1n-7) + (0,880098 * GR\ \% C20:5n-3) + (0,461654 * GR\ \%C22:5n-3) + (0,272201 * GR\ C22:6n-3) + 13,2634$ (Aidoud et al. 2018). Ce modèle de prédiction fait suite à une précédente étude qui a montré que la proportion de DPA des globules rouges était le meilleur prédicteur du DHA cérébral (Du et al. 2012).

Nous avons voulu vérifier si ce modèle prédictif était applicable à nos données, comprenant les deux sexes et trois stades de développement dont le sevrage (J21) (**Figure 74**). Les mâles comme les femelles ainsi que les différents régimes réagissent similairement au modèle prédictif (**Figure 74-A**). Concernant les stades de développement, le modèle semble réagir le mieux pour les rats au sevrage, ce qui semble cohérent vu que le modèle provient de rats à J21. Néanmoins, le modèle est linéaire et a une constante à l'origine élevée de 13,2634.

On observe que le DHA prédit est supérieur au DHA mesuré chez les ratons à la naissance qui ont un statut cérébral en DHA mesuré moins élevé que les rats au sevrage dans notre étude, le sevrage étant le stade de développement sur lequel le modèle prédictif est basé. A l'inverse, le DHA prédit est inférieur au DHA mesuré chez les rats au stade adulte qui ont un statut cérébral en DHA mesuré plus élevé que les rats au sevrage dans notre étude. Pour autant, la corrélation entre le DHA mesuré et le DHA prédit à partir des profils de GR est très bonne ($R^2=0,8264$) si on considère les moyennes des groupes par stade et par sexe (**Figure 74-B**). Néanmoins, la corrélation du modèle était moins importante quand les individus ont été considérés individuellement ($R^2=0,5226$). Ainsi, le modèle nécessite sûrement d'être approfondi, tout du moins en fonction du stade de développement auquel il est associé.

Bien que le lien métabolique entre les proportions de DPA des GR et de DHA cérébral, l'usage de ces modèles, bien qu'encore précoce, est fortement intéressante en vue d'être appliqué aux études chez l'Homme. En effet pour des raisons éthiques évidentes, il est impossible de faire une biopsie de cerveau de nouveau-nés ou de nourrissons et l'application de ce type de modèle pourrait être intéressant pour estimer l'impact de certains régimes alimentaires de la mère ou du nourrisson sur le statut cérébral en DHA. Par exemple, une étude chez l'Homme a montré que quand des nourrissons étaient nourris avec des formules infantiles à base de MGL ou de MGVS similaires aux compositions lipidiques de nos régimes pendant 4 mois, le statut des GR en DHA et surtout en DPA augmentaient pour les nourrissons nourris avec la formule infantile à base de MGL (Gianni et al. 2018).

2.4 *Perspectives*

L'analyse de ce travail continue à l'écriture de ce manuscrit par l'analyse en AGT des différents tissus prélevés. Le lait des mères et le contenu gastrique des rats donnera une indication sur le régime des petits au sevrage, période pendant laquelle l'alimentation des rats est mixte et se fait à la fois sous forme de croquettes et par voie lactée. Le dosage du cholestérol total, libre et estérifié ainsi que des TG dans le plasma et du cholestérol dans le cerveau sont prévus.

3 **Conclusion générale et perspectives de la partie 3**

Nous avons montré dans la partie 3 de ce manuscrit qu'une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime permettait d'augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3 chez le rat. Plus précisément, le DHA était augmenté dans les phospholipides du cerveau et dans les rétines avec un régime MGL. Cette augmentation est intéressante tant pour assurer le rôle du DHA dans le bon développement du cerveau (Sun et al. 2016) que pour son potentiel effet protecteur à long terme contre les maladies neurodégénératives (Salem, Vandal, and Calon 2015), mais aussi pour les effets avérés du DHA rétinien sur l'amélioration et le maintien de l'acuité visuelle (Qawasmi, Landeros-Weisenberger, and Bloch 2013; John Paul SanGiovanni and Chew 2005). Nous avons aussi montré dans l'article 1 que la MGL est un vecteur potentiel pour augmenter le statut en DPA, principalement dans le cœur et les GR, ce qui pose forcément la question de savoir si cette augmentation du DPA associée à l'incorporation de MGL peut entraîner les effets bénéfiques associés à cet acide gras (Yazdi 2014; Kaur, Guo, and Sinclair 2016), voire à l'augmentation des métabolites oxygénés issus du DPA, qui sont en cours de dosages.

Alors que l'accumulation du DHA est maximale dans ces tissus pendant les 5 premières années de la vie, ces études prennent leur place dans un contexte de nutrition infantile, et plus précisément dans un contexte de composition des formules infantiles commerciales (Bernadette Delplanque et al. 2015). Ainsi, les résultats issus de l'article 3 augmentent le niveau de preuve pour les industriels qu'une incorporation partielle de lipides laitiers dans leurs formules pourrait être bénéfique pour le nourrisson, tant pour le statut en AGPI-LC n-3 que pour la diversité des autres acides gras et espèces lipidiques apportées, en comparaison aux mélanges d'huiles végétales qui représentent actuellement la majorité des formules du marché occidental. En effet,

ce sujet s'insère dans l'actualité car en 2020 le DHA devra être supplémenté dans toutes les formules infantiles. Néanmoins, seul un intervalle de quantité de DHA à supplémenter et un intervalle de quantités de la part lipidique totale à inclure dans les formules est donnée dans les lignes directrices européennes (Serrano-Cinca, Fuertes-Callén, and Mar-Molinero 2005). Ainsi, nos résultats sous-entendent que l'incorporation de la plus faible quantité de DHA et de la plus faible quantité de lipides dans les formules infantiles pourrait être une solution pour optimiser le statut cérébral en DHA tout en tenant compte des autres paramètres économiques et écologiques si les formules contiennent des lipides laitiers. En effet, les sources de DHA étant limitées et coûteuses, elles impacteront sûrement directement les coûts de production et par conséquent de vente de ces formules (Salem and Eggersdorfer 2015). Néanmoins, outre le coût du DHA, l'addition de MGL reste néanmoins plus coûteuse que les autres huiles et principalement les huiles végétales. Par exemple, le coût en matière première est d'environ 2750 €/tonnes pour la MGL anhydre, 1300€ pour la poudre de lait écrémée et 500€ pour l'huile de palme (communication personnelle Nutricare). Ainsi l'incorporation d'huiles végétales reste encore le meilleur moyen pour les entreprises de faire maximiser les profits.

Nos derniers résultats semblent montrer que l'effet potentiel de protection du précurseur ALA par les AGCM de la MGL est de moindre importance que l'augmentation des quantités d'ALA directement dans le régime. Néanmoins, cette hypothèse doit être vérifiée et la mesure du DHA présent dans les PL de la dernière étude nous fournira un début de réponse. Si l'on regarde plus précisément, peu d'études s'intéressent à l'impact de la MGL sur le statut en AGPI-LC n-3. Ainsi, les mécanismes impliqués dans l'augmentation du DHA cérébral avec des régimes contenant de la MGL ne sont pas clairement identifiés. La MGL pourrait en effet entraîner une incorporation préférentielle du DHA dans les lysophosphatidylcholines, qui ont été montrées comme étant incorporées plus facilement au sein du tissu cérébral (Lagarde et al. 2001; Sugasini et al. 2017). Cette hypothèse est intéressante, car une étude récente a montré par analyse de lipidomique du cerveau que les proportions cérébrales de lysophosphatidylcholines étaient augmentées dans le cerveau avec un régime contenant de la MGL (Aidoud et al. 2018). Cependant cette même étude n'a pour autant pas montré d'augmentation du DHA cérébral associé au vecteur lipidique MGL. Ainsi, il reste encore beaucoup à découvrir.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les deux problématiques abordées dans cette thèse participent à améliorer la compréhension du métabolisme des AGPI n-3, tout d'abord en s'intéressant à un AGPI-LC n-3 peu étudié : le DPA, et ensuite en s'axant sur l'impact d'un vecteur lipidique complexe qu'est la matière grasse laitière.

Le premier objectif des recherches menées au cours de ce doctorat a été d'étudier l'impact d'une supplémentation nutritionnelle en DPA sur le métabolisme des acides gras et le métabolisme lipidique chez le rat sain. Pour cela, une méthode originale de purification du DPA à haute pureté, en grande quantité et accessible en laboratoire de recherche a tout d'abord été mise en place. Ce résultat participe à faciliter la recherche future des effets *in vivo* du DPA dont la disponibilité commerciale est faible. Une première étude de supplémentation en DPA chez le rat a montré pour la première que cet acide gras était incorporé dans de multiples tissus et impactait principalement les compositions tissulaires de certains tissus spécifiques comme le foie, le cœur, le poumon, la rate et le rein. Ces résultats pourront servir à orienter l'effort de recherche sur les effets physiologiques du DPA dans ces tissus. Ainsi nous avons montré que le DPA pouvait être l'AGPI-LC n-3 le plus puissant pour améliorer la triglycéridémie et la cholestérolémie des animaux. Cela pose forcément la question de l'impact du DPA à plus grande échelle sur la prévention des maladies cardiovasculaires chez l'Homme. Nous avons aussi montré que le DPA pourrait être une source d'EPA, et dans une moindre mesure de DHA et que son effet bénéfique sur l'augmentation du statut tissulaire en AGPI-LC n-3 peut être complémentaire d'une induction du métabolisme des AGPI n-3 par les lipides laitiers. Ces informations participeront certainement à une prise en compte plus importante du DPA comme acides gras faisant pleinement partie des AGPI-LC n-3, tant dans les études nutritionnelles et épidémiologiques humaines que dans l'installation des futures recommandations nutritionnelles.

Le deuxième objectif de recherche de ce doctorat portait sur la capacité d'une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime, à augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3. Nous avons montré que ce vecteur augmente le statut en DHA cérébral et rétinien et en DPA dans certains autres tissus sous certaines conditions nutritionnelles et physiologiques. Ces résultats s'insèrent dans un contexte de nutrition infantile, période pendant laquelle l'incorporation des AGPI-LC n-3 est maximale dans les tissus nerveux. Ainsi, ces résultats apportent des données intéressantes tant pour les entreprises que pour les professionnels de santé en renforçant l'argumentaire pour produire et recommander à la consommation des formules infantiles contenant des lipides laitiers.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.N., Nyantika, Tuomainen T.-P., Kauhanen J., Voutilainen S., Asenath N Nyantika, Tomi-Pekka Tuomainen, Jussi Kauhanen, Sari Voutilainen, and Jyrki K Virtanen. 2016. "Serum Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Risk of Orthostatic Hypotension." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 39 (7): 543–47. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/hr.2016.19>.
- Abeywardena, M. Y., L. T. Jablonskis, and R. J. Head. 2001. "Dietary N-3 and n-6 Polyunsaturated Oils and Airway Contractility." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 64 (4–5): 281–87. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0272>.
- Abeywardena, Mahinda Y., Michael Adams, Julie Dallimore, and Soressa M. Kiteessa. 2016. "Rise in DPA Following SDA-Rich Dietary Echium Oil Less Effective in Affording Anti-Arrhythmic Actions Compared to High DHA Levels Achieved with Fish Oil in Sprague-Dawley Rats." *Nutrients* 8 (1): 14. <https://doi.org/10.3390/nu8010014>.
- AbuMweis, S., S. Jew, R. Tayyem, and L. Agraib. 2018. "Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Containing Supplements Modulate Risk Factors for Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Randomised Placebo-Control Human Clinical Trials." *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 31 (1): 67–84. <https://doi.org/10.1111/jhn.12493>.
- Acar, Niyazi. 2007. "The Implication of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Retinal Physiology." *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 14 (3–4): 194–97. <https://doi.org/10.1684/ocl.2007.0121>.
- Achard, Fabienne, Christine Bénistant, and Michel Lagarde. 1995. "Interconversions and Distinct Metabolic Fate of Eicosapentaenoic, Docosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Bovine Aortic Endothelial Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1255 (3): 260–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00238-T](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00238-T).
- ADAN, Yosef, Kenichi SHIBATA, Masao SATO, Ikuo IKEDA, and Katsumi IMAIZUMI. 1999. "Effects of Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid on Lipid Metabolism, Eicosanoid Production, Platelet Aggregation and Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rats." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63 (1): 111–19. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.111>.
- AFFSA. 2011. "Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras." *Rapport d'expertise collective 2011, n°2006-SA-03359 ANC AG*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2006sa0359Ra.pdf>.
- AFSSA. 2009. "Étude Individuelle Nationale Des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007" 2 (Inca 2): 1–225. <https://doi.org/www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf>.
- Agbaga, M.-P., R. S. Brush, M. N. A. Mandal, K. Henry, M. H. Elliott, and R. E. Anderson. 2008. "Role of Stargardt-3 Macular Dystrophy Protein (ELOVL4) in the Biosynthesis of Very Long Chain Fatty Acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (35): 12843–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802607105>.
- Agostoni, Carlo, Christian Braegger, Tamás Decsi, Sanja Kolacek, Walter Mihatsch, Luis A. Moreno, John Puntis, et al. 2011. "Supplementation of N-3 LCPUFA to the Diet of Children Older than 2 Years: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 53 (1): 2–10. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318216f009>.
- Aidoud, Nacima, Bernadette Delplanque, Charlotte Baudry, Cyrielle Garcia, Anais Moyon, Laure Balasse, Benjamin Guillet, et al. 2018. "A Combination of Lipidomics, MS Imaging, and PET Scan Imaging Reveals Differences in Cerebral Activity in Rat Pups According to the Lipid Quality of Infant Formulas." *The FASEB Journal*, no. March: fj.201800034R. <https://doi.org/10.1096/fj.201800034R>.
- Ailhaud, Gérard, Florence Massiera, Pierre Weill, Philippe Legrand, Jean Marc Alessandri, and Philippe Guesnet. 2006. "Temporal Changes in Dietary Fats: Role of n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Excessive Adipose Tissue Development and Relationship to Obesity." *Progress in Lipid Research*

45 (3): 203–36. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.003>.

- Akanbi, Taiwo O., Andrew J. Sinclair, and Colin J. Barrow. 2014. “Pancreatic Lipase Selectively Hydrolyses DPA over EPA and DHA Due to Location of Double Bonds in the Fatty Acid Rather than Regioselectivity.” *Food Chemistry* 160 (October): 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.092>.
- Aki, Tsunehiro, Yayoi Shimada, Katsuya Inagaki, Hirofumi Higashimoto, Seiji Kawamoto, Seiko Shigeta, Kazuhisa Ono, and Osamu Suzuki. 1999. “Molecular Cloning and Functional Characterization of Rat Δ -6 Fatty Acid Desaturase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255 (3): 575–79. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0235>.
- AKIBA, Satoshi, Tatsunori MURATA, Kazuyuki KITATANI, and Takashi SATO. 2000. “Involvement of Lipoxygenase Pathway in Docosapentaenoic Acid-Induced Inhibition of Platelet Aggregation.” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23 (11): 1293–97. <https://doi.org/10.1248/bpb.23.1293>.
- Albani, Viviana, Carlos Celis-Morales, Cyril F.M. Marsaux, Hannah Forster, Clare B. O’Donovan, Clara Woolhead, Anna L. Macready, et al. 2016. “Exploring the Association of Dairy Product Intake with the Fatty Acids C15:0 and C17:0 Measured from Dried Blood Spots in a Multipopulation Cohort: Findings from the Food4Me Study.” *Molecular Nutrition and Food Research* 60 (4): 834–45. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500483>.
- Albert, Benjamin B., David Cameron-Smith, Paul L. Hofman, and Wayne S. Cutfield. 2013. “Oxidation of Marine Omega-3 Supplements and Human Health.” *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/464921>.
- Alessandri, Jean-Marc, Philippe Guesnet, Sylvie Vancassel, Pierre Astorg, Isabelle Denis, Bénédicte Langelier, Sabah Aïd, Carine Poumès-Ballihaut, Gaëlle Champeil-Potokar, and Monique Laviaille. 2004. “Polyunsaturated Fatty Acids in the Central Nervous System: Evolution of Concepts and Nutritional Implications throughout Life.” *Reproduction Nutrition Development* 44 (6): 509–38. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004063>.
- Alessandri, Jean Marc, Audrey Extier, Pierre Astorg, Monique Laviaille, Noémie Simon, and Philippe Guesnet. 2009. “Métabolisme Des Acides Gras Oméga-3 : Différences Entre Hommes et Femmes.” *Nutrition Clinique et Métabolisme* 23 (2): 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2009.03.003>.
- Alexander, Dominik D., Paige E. Miller, Mary E. Van Elswyk, Connye N. Kuratko, and Lauren C. Bylsma. 2017. “A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Prospective Cohort Studies of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk.” *Mayo Clinic Proceedings* 92 (1): 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.10.018>.
- Allen, John A., Robyn A. Halverson-Tamboli, and Mark M. Rasenick. 2007. “Lipid Raft Microdomains and Neurotransmitter Signalling.” *Nature Reviews Neuroscience* 8 (2): 128–40. <https://doi.org/10.1038/nrn2059>.
- Alvarez, R. A., G. D. Aguirre, G. M. Acland, and R. E. Anderson. 1994. “Docosapentaenoic Acid Is Converted to Docosahexaenoic Acid in the Retinas of Normal and Prcd-Affected Miniature Poodle Dogs.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 35 (2): 402–8.
- Ametaj, Burim N., Gerd Bobe, Yun Lu, Jerry W. Young, and Donald C. Beitz. 2003. “Effect of Sample Preparation, Length of Time, and Sample Size on Quantification of Total Lipids from Bovine Liver.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (8): 2105–10. <https://doi.org/10.1021/jf0259011>.
- Andrea, Sabine D, Herve Guillou, Sophie Jan, Daniel Catheline, Jean-noe Thibault, Monique Bouriell, Vincent Rioux, and Philippe Legrand. 2002. “Fatty Acids in Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis” 55: 49–55.

- Arab, Lenore, and Jabar Akbar. 2002. "Biomarkers and the Measurement of Fatty Acids." *Public Health Nutrition* 5 (6a): 865–71. <https://doi.org/10.1079/PHN2002391>.
- Arterburn, Linda M., Eileen Bailey Hall, and Harry Oken. 2006. "Distribution, Interconversion, and Dose Response of n-3 Fatty Acids in Humans." *American Journal of Clinical Nutrition* 83 (6): S1467–1476S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1467s>.
- Aursnes, Marius, Jørn E. Tungen, Anders Vik, Romain Colas, Chien Yee C Cheng, Jesmond Dalli, Charles N. Serhan, and Trond V. Hansen. 2014. "Total Synthesis of the Lipid Mediator PD1n-3 DPA: Configurational Assignments and Anti-Inflammatory and pro-Resolving Actions." *Journal of Natural Products* 77 (4): 910–16. <https://doi.org/10.1021/np4009865>.
- Aursnes, Marius, Jørn E Tungen, Anders Vik, Romain Colas, Chien-ye C Cheng, Jesmond Dalli, Charles N Serhan, and Trond V Hansen. 2013. "Total Synthesis of the Lipid Mediator PD1," 4–10. <https://doi.org/10.1021/np4009865>.
- Azim, Nur Husna, Atiqah Subki, and Zetty Norhana Balia Yusof. 2018. "Abiotic Stresses Induce Total Phenolic, Total Flavonoid and Antioxidant Properties in Malaysian Indigenous Microalgae and Cyanobacterium." *Malaysian Journal of Microbiology* 14 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Bacon, Leann F., Charlotte Hamley-Bennett, Michael J. Danson, and David J. Leak. 2017. "Development of an Efficient Technique for Gene Deletion and Allelic Exchange in *Geobacillus* Spp." *Microbial Cell Factories* 16 (1): e45. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0670-4>.
- Balas, Laurence, and Thierry Durand. 2016. "Dihydroxylated E,E,Z-Docosatrienes. An Overview of Their Synthesis and Biological Significance." *Progress in Lipid Research* 61 (January): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.002>.
- Balas, Laurence, Michel Guichardant, Thierry Durand, and Michel Lagarde. 2014. "Confusion between Protectin D1 (PD1) and Its Isomer Protectin DX (PDX). An Overview on the Dihydroxy-Docosatrienes Described to Date." *Biochimie* 99 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.006>.
- Bang, H. O., J. Dyerberg, and H. M. Sinclair. 1980. "The Composition of the Eskimo Food in North Western Greenland." *American Journal of Clinical Nutrition* 33 (12): 2657–61. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.12.2657>.
- Bang, Hans Olaf, and Jørn Dyerberg. 1980. "Lipid Metabolism and Ischemic Heart Disease in Greenland Eskimos." In *Advances in Nutritional Research*, 1–22. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4448-4_1.
- Barber, Elizabeth, Andrew J. Sinclair, and David Cameron-Smith. 2013. "Comparative Actions of Omega-3 Fatty Acids on in-Vitro Lipid Droplet Formation." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89 (5): 359–66. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.07.006>.
- Bassett, Julie K., Allison M. Hodge, Dallas R. English, Robert J. MacInnis, and Graham G. Giles. 2016. "Plasma Phospholipids Fatty Acids, Dietary Fatty Acids, and Breast Cancer Risk." *Cancer Causes & Control* 27 (6): 759–73. <https://doi.org/10.1007/s10552-016-0753-2>.
- Bazan, Haydee E.P., M. Monica Careaga, Howard Sprecher, and Nicolas G. Bazan. 1982. "Chain Elongation and Desaturation of Eicosapentaenoate to Docosahexaenoate and Phospholipid Labeling in the Rat Retina in Vivo." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 712 (1): 123–28. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(82\)90093-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(82)90093-5).
- Beauchamp, Erwan, Diana Goenaga, Jérôme Le Bloc'h, Daniel Catheline, Philippe Legrand, and Vincent Rioux. 2007. "Myristic Acid Increases the Activity of Dihydroceramide $\Delta 4$ -Desaturase 1 through Its N-Terminal Myristoylation." *Biochimie* 89 (12): 1553–61. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.001>.

- Bensinger, Steven J., and Peter Tontonoz. 2008. "Integration of Metabolism and Inflammation by Lipid-Activated Nuclear Receptors." *Nature* 454 (7203): 470–77. <https://doi.org/10.1038/nature07202>.
- Berg, Robert A. van den, Huub C J Hoefsloot, Johan A. Westerhuis, Age K. Smilde, and Mariët J. van der Werf. 2006. "Centering, Scaling, and Transformations: Improving the Biological Information Content of Metabolomics Data." *BMC Genomics* 7: 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>.
- Berthou, L, R Saladin, P Yaqoob, D Branellec, P Calder, J C Fruchart, P Denèfle, J Auwerx, and B Staels. 1995. "Regulation of Rat Liver Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II and Acyl-Coenzyme A Oxidase Gene Expression by Fibrates and Dietary Fatty Acids." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 232 (1): 179–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556148>.
- Besten, Gijs den, Karen van Eunen, Albert K. Groen, Koen Venema, Dirk-Jan Reijngoud, and Barbara M. Bakker. 2013. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism." *Journal of Lipid Research* 54 (9): 2325–40. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>.
- Bézard, J, J P Blond, a Bernard, and P Clouet. 1994. "The Metabolism and Availability of Essential Fatty Acids in Animal and Human Tissues." *Reproduction, Nutrition, Development* 34 (6): 539–68. <https://doi.org/10.1051/rnd:19940603>.
- Bibus, Doug, and Bill Lands. 2015. "Balancing Proportions of Competing Omega-3 and Omega-6 Highly Unsaturated Fatty Acids (HUFA) in Tissue Lipids." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 99 (August): 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.04.005>.
- Bingham, Sheila A., Robert Luben, Ailsa Welch, Nicholas Wareham, Kay Tee Khaw, and Nicholas Day. 2003. "Are Imprecise Methods Obscuring a Relation between Fat and Breast Cancer?" *Lancet* 362 (9379): 212–14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13913-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13913-X).
- Blanchard, H., F. Pédrone, N. Boulier-Monthéan, D. Catheline, V. Rioux, and P. Legrand. 2013. "Comparative Effects of Well-Balanced Diets Enriched in α -Linolenic or Linoleic Acids on LC-PUFA Metabolism in Rat Tissues." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 88 (5): 383–89. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.006>.
- Blasbalg, Tanya L., Joseph R. Hibbeln, Christopher E. Ramsden, Sharon F. Majchrzak, and Robert R. Rawlings. 2011. "Changes in Consumption of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in the United States during the 20th Century." *American Journal of Clinical Nutrition* 93 (5): 950–62. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006643>.
- Blond, J P, and P Lemarchal. 1984. "A Study of the Effect of Alpha-Linolenic Acid on the Desaturation of Dihomo-Gamma-Linolenic Acid Using Rat Liver Homogenates." *Reproduction, Nutrition, Development* 24 (1): 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6324307>.
- Boberg, M, L B Croon, I B Gustafsson, and B Vessby. 1985. "Platelet Fatty Acid Composition in Relation to Fatty Acid Composition in Plasma and to Serum Lipoprotein Lipids in Healthy Subjects with Special Reference to the Linoleic Acid Pathway." *Clinical Science (London, England : 1979)* 68 (5): 581–87. <https://doi.org/10.1042/CS0680581>.
- Boudrault, Cynthia, Richard P. Bazinet, and David W.L. Ma. 2009. "Experimental Models and Mechanisms Underlying the Protective Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Alzheimer's Disease." *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.016>.
- Boudreau, M. D., P. S. Chanmugam, S. B. Hart, S. H. Lee, and D. H. Hwang. 1991. "Lack of Dose Response by Dietary N-3 Fatty Acids at a Constant Ratio of n-3 to n-6 Fatty Acids in Suppressing Eicosanoid Biosynthesis from Arachidonic Acid." *American Journal of Clinical Nutrition* 54 (1): 111–17. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.1.111>.
- Bowen, D M, C B Smith, and A N Davison. 1973. "Molecular Changes in Senile Dementia." *Brain : A*

- Journal of Neurology* 96 (4): 849–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4589949>.
- Brenna, J. Thomas. 2002. “Efficiency of Conversion of Alpha-Linolenic Acid to Long Chain n-3 Fatty Acids in Man.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5 (2): 127–32. <https://doi.org/10.1097/00075197-200203000-00002>.
- Brenna, J. Thomas, and Susan E. Carlson. 2014. “Docosahexaenoic Acid and Human Brain Development: Evidence That A Dietary Supply Is Needed for Optimal Development.” *Journal of Human Evolution, The Role of Freshwater and Marine Resources in the Evolution of the Human Diet, Brain and Behavior*, 77: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.02.017>.
- Brenna, J. Thomas, and Guan Yeu Diau. 2007. “The Influence of Dietary Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid on Central Nervous System Polyunsaturated Fatty Acid Composition.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Proceedings of the 8th Fatty Acid and Cell Signaling (FACS Workshop held in Quebec City on June 26-28, 2007) Polyunsaturates, Inflammation and Brain Function, 77 (5–6): 247–50. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.016>.
- Brenna, J. Thomas, Norman Salem, Andrew J. Sinclair, and Stephen C. Cunnane. 2009. “ α -Linolenic Acid Supplementation and Conversion to n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Humans.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 80 (2–3): 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.01.004>.
- Brenner, R R. 1981. “Nutritional and Hormonal Factors Influencing Desaturation of Essential Fatty Acids.” *Progress in Lipid Research* 19: 155–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7342101>.
- Brenner, Rodolfo R. 1971. “The Desaturation Step in the Animal Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids.” *Lipids* 6 (8): 567–75. <https://doi.org/10.1007/BF02531137>.
- Brien, John S O, and E Lois Sampson. 1965. “Lipid Composition of the Normal Human Brain :” 6 (9).
- Brossard, Nicole, Martine Croset, Christiane Pachiaudi, Jean Paul Riou, Jean Louis Tayot, and Michel Lagarde. 1996. “Retroconversion and Metabolism of [13C]22:6n-3 in Humans and Rats after Intake of a Single Dose of [13C]22:6n-3-Triacylglycerols.” *American Journal of Clinical Nutrition* 64 (4): 577–86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/64.4.577>.
- Browning, Lucy M., Celia G. Walker, Adrian P. Mander, Annette L. West, Jackie Madden, Joanna M. Gambell, Stephen Young, Laura Wang, Susan A. Jebb, and Philip C. Calder. 2012. “Incorporation of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids into Lipid Pools When given as Supplements Providing Doses Equivalent to Typical Intakes of Oily Fish1-4.” *American Journal of Clinical Nutrition* 96 (4): 748–58. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.041343>.
- Burdge, Graham C., and Philip C. Calder. 2005a. “ α -Linolenic Acid Metabolism in Adult Humans: The Effects of Gender and Age on Conversion to Longer-Chain Polyunsaturated Fatty Acids.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 107 (6): 426–39. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200501145>.
- . 2005b. “Conversion of α -Linolenic Acid to Longer-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Human Adults.” *Reproduction Nutrition Development* 45 (5): 581–97. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005047>.
- Burdge, Graham C., Yvonne E. Finnegan, Anne M. Minihane, Christine M. Williams, and Stephen A. Wootton. 2003. “Effect of Altered Dietary N-3 Fatty Acid Intake upon Plasma Lipid Fatty Acid Composition, Conversion of [C] α -Linolenic Acid to Longer-Chain Fatty Acids and Partitioning towards β -Oxidation in Older Men.” *British Journal of Nutrition* 90 (02): 311. <https://doi.org/10.1079/BJN2003901>.
- Burdge, Graham C., Amanda E. Jones, and Stephen A. Wootton. 2002. “Eicosapentaenoic and Docosapentaenoic Acids Are the Principal Products of α -Linolenic Acid Metabolism in Young Men.” *British Journal of Nutrition* 88 (04): 355. <https://doi.org/10.1079/BJN2002662>.

- Burdge, Graham C., and Karen A. Lillycrop. 2014. "Fatty Acids and Epigenetics." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17 (2): 156–61. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000023>.
- Burdge, Graham C., and Stephen A. Wootton. 2002. "Conversion of α -Linolenic Acid to Eicosapentaenoic, Docosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Young Women." *British Journal of Nutrition* 88 (04): 411. <https://doi.org/10.1079/BJN2002689>.
- Burr George O, and Burr Mildred M. 1929. "A New Deficiency Disease Produced by the Rigid Exclusion of Fat from the Diet." *Journal of Biological Chemistry* 82 (2): 345–67. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1973.tb06008.x>.
- Byelashov, Oleksandr A., Andrew J. Sinclair, and Gunveen Kaur. 2015. "Dietary Sources, Current Intakes, and Nutritional Role of Omega-3 Docosapentaenoic Acid." *Lipid Technology* 27 (4): 79–82. <https://doi.org/10.1002/lite.201500013>.
- Calder, PC. 2006. "N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Diseases." *Am. J. Clin. Nutr.* 83(suppl) (6): 1505S–1519S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>.
- Calder, Philip C. 2013. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Processes: Nutrition or Pharmacology?" *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (3): 645–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>.
- . 2016. "Docosahexaenoic Acid." *Annals of Nutrition and Metabolism* 69 (1): 8–21. <https://doi.org/10.1159/000448262>.
- Calon, Frédéric, and Greg Cole. 2007. "Neuroprotective Action of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids against Neurodegenerative Diseases: Evidence from Animal Studies." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77 (5–6): 287–93. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.019>.
- Calvo, María José, María Sofía Martínez, Wheeler Torres, Mervin Chávez-Castillo, Eliana Luzardo, Nelson Villasmil, Juan Salazar, Manuel Velasco, and Valmore Bermúdez. 2017. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Molecular View into Structure and Function." *Vessel Plus*, July. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2017.14>.
- Cardoso, Carlos, Cláudia Afonso, and Narcisa M. Bandarra. 2016. "Dietary DHA and Health: Cognitive Function Ageing." *Nutrition Research Reviews* 29 (2): 281–94. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000184>.
- Careaga, M. M., and H. Sprecher. 1984. "Synthesis of Two Hydroxy Fatty Acids from 7,10,13,16,19-Docosapentaenoic Acid by Human Platelets." *Journal of Biological Chemistry* 259 (23): 14413–17. <http://www.jbc.org/content/259/23/14413>.
- Carrière, F., R. Laugier, J. A. Barrowman, I. Douchet, N. Priymenko, and R. Verger. 1993. "Gastric and Pancreatic Lipase Levels during a Test Meal in Dogs." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 28 (5): 443–54. <https://doi.org/10.3109/00365529309098247>.
- Casserly, Ivan, and Eric Topol. 2004. "Convergence of Atherosclerosis and Alzheimer's Disease: Inflammation, Cholesterol, and Misfolded Proteins." *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15900-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15900-X).
- Cattaneo, M., C. Cerletti, P. Harrison, C. P.M. Hayward, D. Kenny, D. Nugent, P. Nurden, et al. 2013. "Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11 (6): 1183–89. <https://doi.org/10.1111/jth.12231>.
- Chakravarthy, Manu V., Zhijun Pan, Yimin Zhu, Karen Tordjman, Jochen G. Schneider, Trey Coleman, John Turk, and Clay F. Semenkovich. 2005. "'New' Hepatic Fat Activates PPAR α to Maintain Glucose, Lipid, and Cholesterol Homeostasis." *Cell Metabolism* 1 (5): 309–22.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.04.002>.

- Chatelain, F, C Kohl, V Esser, J Denis McGarry, Jean Girard, and J P Pegorier. 1996. "Cyclic AMP and Fatty Acids Increase Carnitine Palmitoyltransferase I Gene Transcription in Cultured Fetal Rat Hepatocytes." *European Journal of Biochemistry* 235 (3): 789–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654430> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1996.00789.x/pdf>.
- Chechi, Kanta, Gene R. Herzberg, and Sukhinder K. Cheema. 2010. "Maternal Dietary Fat Intake during Gestation and Lactation Alters Tissue Fatty Acid Composition in the Adult Offspring of C57Bl/6 Mice." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 83 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.06.001>.
- Chen, Chuck T., Alex P. Kitson, Kathryn E. Hopperton, Anthony F. Domenichiello, Marc Olivier Trépanier, Lauren E. Lin, Leonardo Ermini, Martin Post, Frank Thies, and Richard P. Bazinet. 2015. "Plasma Non-Esterified Docosahexaenoic Acid Is the Major Pool Supplying the Brain." *Scientific Reports* 5 (1): 15791. <https://doi.org/10.1038/srep15791>.
- Chen, Jingnan, Yue Jiang, Yintong Liang, Xiaoyu Tian, Cheng Peng, Ka Ying Ma, Jian Liu, Yu Huang, and Zhen Yu Chen. 2012. "DPA N-3, DPA n-6 and DHA Improve Lipoprotein Profiles and Aortic Function in Hamsters Fed a High Cholesterol Diet." *Atherosclerosis* 221 (2): 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.005>.
- Chevreul, M. E. 1823. "Recherche Chimique Sur Les Corps Gras d'origine Animale." *Paris: Chez Levrault*, 526.
- Childs, Caroline E., Meritxell Romeu-Nadal, Graham C. Burdge, and Philip C. Calder. 2008. "Gender Differences in the N-3 Fatty Acid Content of Tissues." *Proceedings of the Nutrition Society* 67 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1017/S0029665108005983>.
- Cho, Hyekyung P., Manabu Nakamura, and Steven D. Clarke. 1999a. "Cloning, Expression, and Fatty Acid Regulation of the Human Δ -5 Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 274 (52): 37335–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37335>.
- Cho, Hyekyung P., Manabu T. Nakamura, and Steven D. Clarke. 1999b. "Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian Δ -6 Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 274 (1): 471–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.471>.
- . 1999c. "Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian Δ -6 Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 274 (1): 471–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.471>.
- Choque, Benjamin, Daniel Catheline, Bernadette Delplanque, Philippe Guesnet, and Philippe Legrand. 2015. "Dietary Linoleic Acid Requirements in the Presence of α -Linolenic Acid Are Lower than the Historical 2 % of Energy Intake Value, Study in Rats." *British Journal of Nutrition* 113 (7): 1056–68. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000094>.
- Christensen, E, B Woldseth, T A Hagve, B T Poll-The, R J Wanders, H Sprecher, O Stokke, and B O Christophersen. 1993. "Peroxisomal Beta-Oxidation of Polyunsaturated Long Chain Fatty Acids in Human Fibroblasts. The Polyunsaturated and the Saturated Long Chain Fatty Acids Are Retroconverted by the Same Acyl-CoA Oxidase." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 215: 61–74.
- Christiansen, E N, J S Lund, T Rortveit, and A C Rustan. 1991. "Effect of Dietary N-3 and n-6 Fatty Acids on Fatty Acid Desaturation in Rat Liver." *Biochim Biophys Acta* 1082 (1): 57–62. [https://doi.org/0005-2760\(91\)90299-W](https://doi.org/0005-2760(91)90299-W) [pii].
- Cinti, Dominick L., Lynda Cook, Mahmud N. Nagi, and Sanoj K. Suneja. 1992. "The Fatty Acid Chain Elongation System of Mammalian Endoplasmic Reticulum." *Progress in Lipid Research* 31 (1): 1–51. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(92\)90014-A](https://doi.org/10.1016/0163-7827(92)90014-A).
- Clarke, S D, and D B Jump. 1994. "Dietary Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene

Transcription.” *Annu.Rev.Nutr.* 14 (1): 83–98.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nu.14.070194.000503>.

- Clouet, P, I Niot, and J Bézard. 1989. “Pathway of Alpha-Linolenic Acid through the Mitochondrial Outer Membrane in the Rat Liver and Influence on the Rate of Oxidation. Comparison with Linoleic and Oleic Acids.” *The Biochemical Journal* 263 (3): 867–73.
<https://doi.org/10.1042/bj2630867>.
- Combe, Nicole, and Carole Boué-Vaysse. 2004. “Face Aux Besoins et à La Réalité Des Consommations, Quelles Sont Les Spécificités Des Différentes Sources d’acides Gras Oméga 3 Disponibles?” *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 11 (2): 103–5.
- Congress, Biennial Issfal. 2014. “The 11th Biennial ISSFAL Congress 2014 Research Update on DPA : An Essential Omega-3 Fatty Acid for Health.”
- Conquer, Julie A., and Bruce J. Holub. 1997. “Dietary Docosahexaenoic Acid as a Source of Eicosapentaenoic Acid in Vegetarians and Omnivores.” *Lipids* 32 (3): 341–45.
<https://doi.org/10.1007/s11745-997-0043-y>.
- Conroy, D. M., C. D. Stubbs, J. Belin, C. L. Pryor, and A. D. Smith. 1986. “The Effects of Dietary (n - 3) Fatty Acid Supplementation on Lipid Dynamics and Composition in Rat Lymphocytes and Liver Microsomes.” *BBA - Biomembranes* 861 (C): 457–62. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90454-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90454-2).
- Conseil Supérieur de la Santé. 2016. “Recommandations Nutritionnelles Pour La Belgique (CSS 9285),” 199.
- Contreras, Violeta, Milagros J. Toro, Augusto R. Eliás-Boneta, and Angeliz Encarnación-Burgos. 2017. “Effectiveness of Silver Diamine Fluoride in Caries Prevention and Arrest: A Systematic Literature Review.” *General Dentistry* 65 (3): 22–29.
<https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0716.Isoniazid>.
- Cook, H W, D M Byers, F B Palmer, M W Spence, H Rakoff, S M Duval, and E A Emken. 1991. “Alternate Pathways in the Desaturation and Chain Elongation of Linolenic Acid, 18:3(n-3), in Cultured Glioma Cells.” *Journal of Lipid Research* 32 (8): 1265–73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770309>.
- Coskun, Ünal, and Kai Simons. 2011. “Cell Membranes: The Lipid Perspective.” *Structure* 19 (11): 1543–48. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.010>.
- Cottin, S. C., T. A. Sanders, and W. L. Hall. 2011. “The Differential Effects of EPA and DHA on Cardiovascular Risk Factors.” *Proceedings of the Nutrition Society* 70 (2): 215–31.
<https://doi.org/10.1017/S0029665111000061>.
- Courage, Mary L., Ursula R. Mccloy, Gene R. Herzberg, Wayne L. Andrews, Brian S. Simmons, Allison C. Mcdonald, Claude N. Mercer, and James K. Friel. 1998. “Visual Acuity Development and Fatty Acid Composition of Erythrocytes in Full-Term Infants Fed Breast Milk, Commercial Formula, or Evaporated Milk.” *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 19 (1): 9–17.
<https://doi.org/10.1097/00004703-199802000-00002>.
- Crawford, Michael A. 2006. “Docosahexaenoic Acid in Neural Signaling Systems.” *Nutrition and Health* 18 (3): 263–76. <https://doi.org/10.1177/026010600601800309>.
- CRPP. 2008. “Agregation Plaquettaire - Standardisation Méthodologique.”
- Cunnane, Stephen C. 2003. “Problems with Essential Fatty Acids: Time for a New Paradigm?” *Progress in Lipid Research* 42 (6): 544–68. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00038-9).
- Curtis, J. M., and B. A. Black. 2013. “Analysis of Omega-3 Fatty Acids in Foods and Supplements.” In *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*, 226–54. Woodhead Publishing.

<https://doi.org/10.1533/9780857098863.2.226>.

- D'Ascoli, T. A., J. Mursu, S. Voutilainen, J. Kauhanen, T. P. Tuomainen, and J. K. Virtanen. 2016. "Association between Serum Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cognitive Performance in Elderly Men and Women: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study." *European Journal of Clinical Nutrition* 70 (8): 970–75. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.59>.
- Dabadie, Henry, Evelyne Peuchant, Mireille Bernard, Pascale Leruyet, and François Mendy. 2005. "Moderate Intake of Myristic Acid in Sn-2 Position Has Beneficial Lipidic Effects and Enhances DHA of Cholesteryl Esters in an Interventional Study." *Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (6): 375–82. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.010>.
- Dai, Xiao-wei, Yu-ming Chen, Fang-fang Zeng, Li-li Sun, Cao-gang Chen, and Yi-xiang Su. 2016. "Association between N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Erythrocytes and Metabolic Syndrome in Chinese Men and Women." *European Journal of Nutrition* 55 (3): 981–89. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0912-3>.
- Dalli, Jesmond, Nan Chiang, and Charles N. Serhan. 2015. "Elucidation of Novel 13-Series Resolvins That Increase with Atorvastatin and Clear Infections." *Nature Medicine* 21 (9): 1071–75. <https://doi.org/10.1038/nm.3911>.
- Dalli, Jesmond, Romain A. Colas, and Charles N. Serhan. 2013. "Novel N-3 Immunoresolvents: Structures and Actions." *Scientific Reports* 3 (1): 1940. <https://doi.org/10.1038/srep01940>.
- Dalli, Jesmond, Julia M. Sanger, Ana R. Rodriguez, Nan Chiang, Bernd W. Spur, and Charles N. Serhan. 2016. "Identification and Actions of a Novel Third Maresin Conjugate in Tissue Regeneration: MCTR3." Edited by John Wallace. *PLoS ONE* 11 (2): e0149319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149319>.
- Dangi, Bindi, Marcus Obeng, Julie M. Nauroth, Mah Teymourlouei, Micah Needham, Krishna Raman, and Linda M. Arterburn. 2009. "Biogenic Synthesis, Purification, and Chemical Characterization of Anti-Inflammatory Resolvins Derived from Docosapentaenoic Acid (DPAn-6)." *Journal of Biological Chemistry* 284 (22): 14744–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809014200>.
- Das, Undurti N. 2005. "A Defect in the Activity of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases May Be a Factor Predisposing to the Development of Insulin Resistance Syndrome." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 72 (5): 343–50. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.01.002>.
- Daumerie, C M, L a Woollett, and J M Dietschy. 1992. "Fatty Acids Regulate Hepatic Low Density Lipoprotein Receptor Activity through Redistribution of Intracellular Cholesterol Pools." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10797–801. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10797>.
- Davidson, Michael H., Judith Johnson, Michael W. Rooney, Michael L. Kyle, and Douglas F. Kling. 2012. "A Novel Omega-3 Free Fatty Acid Formulation Has Dramatically Improved Bioavailability during a Low-Fat Diet Compared with Omega-3-Acid Ethyl Esters: The ECLIPSE (Epanova® compared to Lovaza® in a Pharmacokinetic Single-Dose Evaluation) Study." *Journal of Clinical Lipidology* 6 (6): 573–84. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.01.002>.
- Davis-Bruno, Karen, and Melissa S. Tassinari. 2011. "Essential Fatty Acid Supplementation of DHA and ARA and Effects on Neurodevelopment across Animal Species: A Review of the Literature." *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* 92 (3): 240–50. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20311>.
- Davis, Brenda C, and Penny M Kris-Etherton. 2003. "Achieving Optimal Essential Fatty Acid Status in Vegetarians: Current Knowledge and Practical Implications." *The American Journal of Clinical Nutrition* 78 (3 Suppl): 640S–646S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.640S>.
- Deckelbaum, Richard J, Tilla S Worgall, and Toru Seo. 2006. "N-3 Fatty Acids and Gene Expression."

- The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (6 Suppl): 1520S–1525S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001065.1874S>.
- DeLany, James P., Marlene M. Windhauser, Catherine M. Champagne, and George A. Bray. 2000. “Differential Oxidation of Individual Dietary Fatty Acids in Humans.” *American Journal of Clinical Nutrition* 72 (4): 905–11. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.4.905>.
- Delplanque, B., Q. Du, G. Agnani, P. Le Ruyet, and J. C. Martin. 2013. “A Dairy Fat Matrix Providing Alpha-Linolenic Acid (ALA) Is Better than a Vegetable Fat Mixture to Increase Brain DHA Accretion in Young Rats.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, The Tenth Fatty Acids and Cell Signalling Meeting (FACS-10)*, 88 (1): 115–20. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.07.004>.
- Delplanque, Bernadette. 2007. “Lipides et Cerveau.” *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 14 (3–4): 146–47. <https://doi.org/10.1051/ocl.2007.9999>.
- Delplanque, Bernadette, Qin Du, Pascale Leruyet, Genevieve Agnani, Nicole Pages, Daniel Gripois, Hassina Ould-Hamouda, Pierre Carayon, and Jean Charles Martin. 2011. “Brain Docosahexaenoic Acid (DHA) Levels of Young Rats Are Related to Alpha-Linolenic Acid (ALA) Levels and Fat Matrix of the Diet: Impact of Dairy Fat.” *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 18 (6): 293–96. <https://doi.org/10.1684/ocl.2011.0420>.
- Delplanque, Bernadette, Robert Gibson, Berthold Koletzko, Alexandre Lapillonne, and Birgitta Strandvik. 2015. “Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 61 (1): 8–17. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000818>.
- Delsal, J L. 1944. “New Method of Extraction of Serum Lipids by Methylal. Application to Micro-Estimation of Total Cholesterol, Phospho-Aminolipins and Proteins.” *Bulletin de La Societe de Chimie Biologique* 26: 99–105.
- DeMar, James C., Kaizong Ma, Jane M. Bell, and Stanley I. Rapoport. 2004. “Half-Lives of Docosahexaenoic Acid in Rat Brain Phospholipids Are Prolonged by 15 Weeks of Nutritional Deprivation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids.” *Journal of Neurochemistry* 91 (5): 1125–37. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02789.x>.
- Dentin, Renaud, Fadila Benhamed, Jean Paul Pégrier, Fabienne Foufelle, Benoit Viollet, Sophie Vaultont, Jean Girard, and Catherine Postic. 2005. “Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Glycolytic and Lipogenic Genes through the Inhibition of ChREBP Nuclear Protein Translocation.” *Journal of Clinical Investigation* 115 (10): 2843–54. <https://doi.org/10.1172/JCI25256>.
- Dietschy, John M. 1998. “Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein.” *The Journal of Nutrition* 128 (2): 444S–448S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.444S>.
- Dinel, A. L., C. Rey, C. Bonhomme, P. Le Ruyet, C. Joffre, and S. Layé. 2016. “Dairy Fat Blend Improves Brain DHA and Neuroplasticity and Regulates Corticosterone in Mice.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 109: 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.03.013>.
- Ding, Hui, Yanhua Zhang, Shimin Xu, and Wei Wang. 2008. Process for preparing and separating methyl docosapentaenoate and methyl docosahexenoate. Patent-CN101265185B, issued 2008.
- Domijan, Ana Marija, Jovica Ralić, Sandra Radić Brkanac, Lada Rumora, and Tihana Žanić-Grubišić. 2015. “Quantification of Malondialdehyde by HPLC-FL - Application to Various Biological Samples.” *Biomedical Chromatography* 29 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1002/bmc.3361>.
- Dong, Xiaojing, Peng Tan, Zuonan Cai, Hanlin Xu, Jingqi Li, Wei Ren, Houguo Xu, et al. 2017. “Regulation of FADS2 Transcription by SREBP-1 and PPAR- α Influences LC-PUFA Biosynthesis in Fish.” *Scientific Reports* 7 (January): 40024. <https://doi.org/10.1038/srep40024>.

- Drouin, Gaetan, Daniel Catheline, Etienne Guillocheau, Pierre Gueret, Charlotte Baudry, Pascale le Ruyet, Vincent Rioux, and Philippe Legrand. 2018. "Comparative Effects of Dietary N-3 Docosapentaenoic Acid (DPA), DHA and EPA on Plasma Lipid Parameters, Oxidative Status and Fatty Acid Tissue Composition." *The Journal of Nutritional Biochemistry* in press.
- Drouin, Gaetan, Daniel Catheline, Annaelle Sinquin, Charlotte Baudry, Pascale Le Ruyet, Vincent Rioux, and Philippe Legrand. 2018. "Incorporation of Dairy Lipids in the Diet Increased Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Status in Post-Weaning Rats." *Frontiers in Nutrition*, in press. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2018.00042>.
- Drouin, Gaetan, Etienne Guillocheau, Daniel Catheline, Charlotte Baudry, Pascale Le Ruyet, Vincent Rioux, and Philippe Legrand. 2018. "The Impact of N-3 Docosapentaenoic Acid (DPA) Supplementation on Fatty Acid Composition in Rat Differs Depending upon Tissues and Is Influenced by the Presence of Dairy Lipids in the Diet." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, July, *acs.jafc.8b03069*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03069>.
- Du, Qin, Jean Charles Martin, Genevieve Agnani, Nicole Pages, Pascale Leruyet, Pierre Carayon, and Bernadette Delplanque. 2012. "Dairy Fat Blends High in α -Linolenic Acid Are Superior to n-3 Fatty-Acid-Enriched Palm Oil Blends for Increasing DHA Levels in the Brains of Young Rats." *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (12): 1573–82. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.10.011>.
- Dupuy, Aude, Pauline Le Faouder, Claire Vigor, Camille Oger, Jean Marie Galano, Cédric Dray, Jetty Chung Yung Lee, et al. 2016. "Simultaneous Quantitative Profiling of 20 Isoprostanooids from Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids by LC-MS/MS in Various Biological Samples." *Analytica Chimica Acta* 921: 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.024>.
- Duvall, Melody G., and Bruce D. Levy. 2016. "DHA- and EPA-Derived Resolvins, Protectins, and Maresins in Airway Inflammation." *European Journal of Pharmacology* 785: 144–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.001>.
- Dyall, Simon C. 2015. "Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and the Brain: A Review of the Independent and Shared Effects of EPA, DPA and DHA." *Frontiers in Aging Neuroscience* 7 (APR). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>.
- Edmond, J., R. A. Korsak, J. W. Morrow, G. Torok-Both, and D. H. Catlin. 1991. "Dietary Cholesterol and the Origin of Cholesterol in the Brain of Developing Rats." *Journal of Nutrition* 121 (9): 1323–30. <https://doi.org/10.1093/jn/121.9.1323>.
- Edmond, J, T A Higa, R A Korsak, E A Bergner, and W N Lee. 1998. "Fatty Acid Transport and Utilization for the Developing Brain." *J Neurochem* 70 (3): 1227–34. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70031227.x>.
- Elagizi, Andrew, Carl J. Lavie, Keri Marshall, James J. DiNicolantonio, James H. O’Keefe, and Richard V. Milani. 2018. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review." *Progress in Cardiovascular Diseases* 61 (1): 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.03.006>.
- Emken, Edward A., Richard O. Adlof, and R. Michael Gulley. 1994. "Dietary Linoleic Acid Influences Desaturation and Acylation of Deuterium-Labeled Linoleic and Linolenic Acids in Young Adult Males." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1213 (3): 277–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00054-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00054-9).
- Endo, Jin, and Makoto Arita. 2016. "Cardioprotective Mechanism of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids." *Journal of Cardiology* 67 (1): 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.08.002>.
- Enti, S C I, F I C Opi, and N I On. 2012. "Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of Eicosapentaenoic Acid (EPA), Docosahexaenoic Acid (DHA) and Docosapentaenoic Acid (DPA)." *EFSA Journal* 10 (7): 1–48. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2815>.

- Eriksson, Emma, Felix Royo, Karin Lyberg, Hans Erik Carlsson, and Jann Hau. 2004. "Effect of Metabolic Cage Housing on Immunoglobulin A and Corticosterone Excretion in Faeces and Urine of Young Male Rats." *Experimental Physiology* 89 (4): 427–33. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.027656>.
- European Food Safety Authority. 2010. "Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Fats, Including Saturated Fatty Acids, Polyunsaturated Fatty Acids, Monounsaturated Fatty Acids, Trans Fatty Acids, and Cholesterol." *EFSA Journal* 8 (3): 1461. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>.
- Evans, Herbert M, Samuel Lepkovsky, and Elizabeth A Murphy. 1934. "Vital Need of the Body for Certain Unsaturated Fatty Acids v. Reproduction and Lactation upon Diets Containing Saturated Fatty Acids as Their Sole Source of Energy." *J. Biol. Chem.* 106: 441–44. <http://www.jbc.org/content/106/2/441.full.pdf>.
- Extier, Audrey, Bénédicte Langelier, Marie Hélène Perruchot, Philippe Guesnet, Paul P. Van Veldhoven, Monique Lavialle, and Jean Marc Alessandri. 2010. "Gender Affects Liver Desaturase Expression in a Rat Model of N-3 Fatty Acid Repletion." *Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (3): 180–87. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.10.008>.
- Ezanno, Hélène, Erwan Beauchamp, Daniel Catheline, Philippe Legrand, and Vincent Rioux. 2015. "Beneficial Impact of a Mix of Dairy Fat with Rapeseed Oil on N-6 and n-3 PUFA Metabolism in the Rat: A Small Enrichment in Dietary Alpha-Linolenic Acid Greatly Increases Its Conversion to DHA in the Liver." *European Journal of Lipid Science and Technology* 117 (3): 281–90. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400304>.
- Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, and Shankar Subramaniam. 2011. "Lipid Classification, Structures and Tools." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, Lipidomics and Imaging Mass Spectrometry*, 1811 (11): 637–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.06.009>.
- FAO. 2013. *The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012. Choice Reviews Online*. Vol. 50. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.50-5350>.
- Faouder, Pauline Le, Vincent Baillif, Ian Spreadbury, Jean Paul Motta, Perrine Rousset, Gerald Chêne, Charlotte Guigné, et al. 2013. "LC-MS/MS Method for Rapid and Concomitant Quantification of pro-Inflammatory and pro-Resolving Polyunsaturated Fatty Acid Metabolites." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 932 (August): 123–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.06.014>.
- Farooqui, Akhlaq. 2009. *Beneficial Effects of Fish Oil on Human Brain*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0543-7>.
- Ferdinandusse, S, S Denis, P A Mooijer, Z Zhang, J K Reddy, A A Spector, and R J Wanders. 2001. "Identification of the Peroxisomal Beta-Oxidation Enzymes Involved in the Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid." *Journal of Lipid Research* 42 (12): 1987–95. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300512-JLR200>.
- Fleith, M., and M. T. Clandinin. 2005. "Dietary PUFA for Preterm and Term Infants: Review of Clinical Studies." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (3): 205–29. <https://doi.org/10.1080/10408690590956378>.
- Flock, Michael R., William S. Harris, and Penny M. Kris-Etherton. 2013. "Long-Chain Omega-3 Fatty Acids: Time to Establish a Dietary Reference Intake." *Nutrition Reviews* 71 (10): 692–707. <https://doi.org/10.1111/nure.12071>.
- FORETZ, Marc, Fabienne FOUFELLE, and Pascal FERRE. 1999. "Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Fatty Acid Synthase and Spot-14-Protein Gene Expression in Cultured Rat Hepatocytes by a Peroxidative Mechanism." *Biochem. J* 341 (July): 371–376.

<http://www.biochemj.org/bj/341/bj3410371.htm%0Ahttp://www.biochemj.org/bj/341/0371/3410371.pdf>.

- Forin, Samuel. 2012. Polyunsaturated fatty acid monoglycerides, derivatives, and uses thereof - Patent - PubChem. Patent-US8119690, issued 2012.
- Freemantle, Erika, Milène Vandal, Jennifer Tremblay-Mercier, Sébastien Tremblay, Jean Christophe Blachère, Michel E. Bégin, J. Thomas Brenna, Anthony Windust, and Stephen C. Cunnane. 2006. "Omega-3 Fatty Acids, Energy Substrates, and Brain Function during Aging." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75 (3): 213–20. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.011>.
- Freund Levi, Y., I. Vedin, T. Cederholm, H. Basun, G. Faxén Irving, M. Eriksdotter, E. Hjorth, et al. 2014. "Transfer of Omega-3 Fatty Acids across the Blood-Brain Barrier after Dietary Supplementation with a Docosahexaenoic Acid-Rich Omega-3 Fatty Acid Preparation in Patients with Alzheimer's Disease: The OmegAD Study." *Journal of Internal Medicine* 275 (4): 428–36. <https://doi.org/10.1111/joim.12166>.
- Galli, Claudio, and Patrizia Risé. 2006. "Origin of Fatty Acids in the Body: Endogenous Synthesis versus Dietary Intakes." *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (6): 521–25. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600056>.
- Garaiova, Iveta, Irina A. Guschina, Sue F. Plummer, James Tang, Duolao Wang, and Nigel T. Plummer. 2007. "A Randomised Cross-over Trial in Healthy Adults Indicating Improved Absorption of Omega-3 Fatty Acids by Pre-Emulsification." *Nutrition Journal* 6 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-6-4>.
- García-Calatayud, Salvador, Carlos Redondo, Eva Martín, José Ignacio Ruiz, Miguel García-Fuentes, and Pablo Sanjurjo. 2005. "Brain Docosahexaenoic Acid Status and Learning in Young Rats Submitted to Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency and Supplementation Limited to Lactation." *Pediatric Research* 57 (5 I): 719–23. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000156506.03057.AD>.
- Garcia, Martha C., Glenn Ward, Yee-Chung Ma, Norman Salem, and Hee-Yong Kim. 2002. "Effect of Docosahexaenoic Acid on the Synthesis of Phosphatidylserine in Rat Brain Microsomes and C6 Glioma Cells." *Journal of Neurochemistry* 70 (1): 24–30. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010024.x>.
- Gezondheidsraad. 2006. "Guidelines for Healthy Diet 2006," 110. https://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/200621E_0.pdf.
- Ghasemi Fard, Samaneh, Kaisa M. Linderborg, Giovanni M. Turchini, and Andrew J. Sinclair. 2014. "Comparison of the Bioavailability of Docosapentaenoic Acid (DPA, 22:5N-3) and Eicosapentaenoic Acid (EPA, 20:5n-3) in the Rat." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 90 (1): 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.10.001>.
- Ghasemifard, Samaneh, Karen Hermon, Giovanni M. Turchini, and Andrew J. Sinclair. 2015. "Metabolic Fate (Absorption, β -Oxidation and Deposition) of Long-Chain n-3 Fatty Acids Is Affected by Sex and by the Oil Source (Krill Oil or Fish Oil) in the Rat." *British Journal of Nutrition* 114 (5): 684–92. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002457>.
- Gianni, Maria Lorella, Paola Roggero, Charlotte Baudry, Catherine Fressange-Mazda, Claudio Galli, Carlo Agostoni, Pascale Le Ruyet, and Fabio Mosca. 2018. "An Infant Formula Containing Dairy Lipids Increased Red Blood Cell Membrane Omega 3 Fatty Acids in 4 Month-Old Healthy Newborns: A Randomized Controlled Trial." *BMC Pediatrics* 18 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1047-5>.
- Gibson, R. A., M. A. Neumann, E. L. Lien, K. A. Boyd, and W. C. Tu. 2013. "Docosahexaenoic Acid Synthesis from Alpha-Linolenic Acid Is Inhibited by Diets High in Polyunsaturated Fatty Acids."

Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 88 (1): 139–46.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.04.003>.

- Gibson, Robert A., Bev Muhlhausler, and Maria Makrides. 2011. “Conversion of Linoleic Acid and Alpha-Linolenic Acid to Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFAs), with a Focus on Pregnancy, Lactation and the First 2 Years of Life.” *Maternal and Child Nutrition* 7 (SUPPL. 2): 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x>.
- Giltay, Erik J, Louis JG Gooren, Arno WFT Toorians, Martijn B Katan, and Peter L Zock. 2004. “Docosahexaenoic Acid Concentrations Are Higher in Women than in Men Because of Estrogenic Effects.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 80 (5): 1167–74. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1167>.
- Girard, J, D Perdereau, F Foufelle, C Prip-Buus, and P Ferré. 1994. “Regulation of Lipogenic Enzyme Gene Expression by Nutrients and Hormones.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (1): 36–42. <https://doi.org/10.5650/jos1956.37.820>.
- Gobbetti, Thomas, Jesmond Dalli, Romain A. Colas, Donata Federici Canova, Marius Aursnes, Delphine Bonnet, Laurent Alric, et al. 2017. “Protectin D1_{n-3} DPA and Resolvin D5_{n-3} DPA Are Effectors of Intestinal Protection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (15): 3963–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617290114>.
- Gobbo, Liana C. Del, Fumiaki Imamura, Stella Aslibekyan, Matti Marklund, Jyrki K. Virtanen, Maria Wennberg, Mohammad Y. Yakoob, et al. 2016. “ ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies.” *JAMA Internal Medicine* 176 (8): 1155–66. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.2925>.
- González-Bengtsson, Amanda, Abolfazl Asadi, Hui Gao, Karin Dahlman-Wright, and Anders Jacobsson. 2016. “Estrogen Enhances the Expression of the Polyunsaturated Fatty Acid Elongase Elov12 via ER α in Breast Cancer Cells.” *PLoS ONE* 11 (10): e0164241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164241>.
- Goozee, Kathryn, Pratishtha Chatterjee, Ian James, Kaikai Shen, Hamid R. Sohrabi, Prita R. Asih, Preeti Dave, et al. 2017. “Alterations in Erythrocyte Fatty Acid Composition in Preclinical Alzheimer’s Disease.” *Scientific Reports* 7 (1): 676. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00751-2>.
- Gossert, Alvar D., Alexandra Hinniger, Sascha Gutmann, Wolfgang Jahnke, André Strauss, and César Fernández. 2011. “A Simple Protocol for Amino Acid Type Selective Isotope Labeling in Insect Cells with Improved Yields and High Reproducibility.” *Journal of Biomolecular NMR* 51 (4): 449–56. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>.
- Gotoh, Naohiro, Koji Nagao, Satoru Onoda, Bungo Shirouchi, Renta Furuya, Toshiharu Nagai, Hoyo Mizobe, et al. 2009. “Effects of Three Different Highly Purified N-3 Series Highly Unsaturated Fatty Acids on Lipid Metabolism in C57BL/KsJ-Dbl Db Mice.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (22): 11047–54. <https://doi.org/10.1021/jf9026553>.
- Goyens, Petra L.L., Mary E. Spilker, Peter L. Zock, Martijn B. Katan, and Ronald P. Mensink. 2006. “Conversion of α -Linolenic Acid in Humans Is Influenced by the Absolute Amounts of α -Linolenic Acid and Linoleic Acid in the Diet and Not by Their Ratio.” *American Journal of Clinical Nutrition* 84 (1): 44–53. <https://doi.org/84/1/44> [pii].
- Gregory, Melissa K., Leslie G. Cleland, and Michael J. James. 2013. “Molecular Basis for Differential Elongation of Omega-3 Docosapentaenoic Acid by the Rat Elov15 and Elov12.” *Journal of Lipid Research* 54 (10): 2851–57. <https://doi.org/10.1194/jlr.M041368>.
- Gregory, Melissa K., Robert A. Gibson, Rebecca J. Cook-Johnson, Leslie G. Cleland, and Michael J. James. 2011. “Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis.” *PLoS ONE* 6 (12): e29662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029662>.

- Grevengoed, Trisha J., Eric L. Klett, and Rosalind A. Coleman. 2014. "Acyl-CoA Metabolism and Partitioning." *Annual Review of Nutrition* 34 (1): 1–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105541>.
- Griffin, Michael J., and Hei Sook Sul. 2004. "Insulin Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Transcription: Roles of USF and SREBP-1c." *IUBMB Life* 56 (10): 595–600. <https://doi.org/10.1080/15216540400022474>.
- Grønn, Morten, Erik Christensen, Tor Arne Hagve, and Bjørn O. Christophersen. 1990. "The Zellweger Syndrome: Deficient Conversion of Docosahexaenoic Acid (22:6(n-3)) to Eicosapentaenoic Acid (20:5(n-3)) and Normal Δ 4-Desaturase Activity in Cultured Skin Fibroblasts." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1044 (2): 249–54. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90310-T](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90310-T).
- . 1991. "Peroxisomal Retroconversion of Docosahexaenoic Acid (22:6(n-3)) to Eicosapentaenoic Acid (20:5(n-3)) Studied in Isolated Rat Liver Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1081 (1): 85–91. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90254-F](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90254-F).
- . 1992. "Effects of Dietary Purified Eicosapentaenoic Acid (20:5(n - 3)) and Docosahexaenoic Acid (22:6(n - 3)) on Fatty Acid Desaturation and Oxidation in Isolated Rat Liver Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1125 (1): 35–43. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90152-L](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90152-L).
- Guesnet, Philippe, and Jean Marc Alessandri. 2011. "Docosahexaenoic Acid (DHA) and the Developing Central Nervous System (CNS) - Implications for Dietary Recommendations." *Biochimie* 93 (1): 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.005>.
- Guesnet, Philippe, Jean Marc Alessandri, Pierre Astorg, Fabien Pifferi, and Monique Laviaille. 2005. "Les Rôles Physiologiques Majeurs Exercés Par Les Acides Gras Polyinsaturés (AGPI)." *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 12 (5–6): 333–43. <https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0333>.
- Guillou, Hervé, Vincent Rioux, Daniel Catheline, Jean-Noël Thibault, Monique Bouriel, Sophie Jan, Sabine D'Andrea, and Philippe Legrand. 2003. "Conversion of Hexadecanoic Acid to Hexadecenoic Acid by Rat Δ 6-Desaturase." *Journal of Lipid Research* 44 (3): 450–54. <https://doi.org/10.1194/jlr.C200019-JLR200>.
- Guillou, Hervé, Damir Zadravec, Pascal G.P. Martin, and Anders Jacobsson. 2010. "The Key Roles of Elongases and Desaturases in Mammalian Fatty Acid Metabolism: Insights from Transgenic Mice." *Progress in Lipid Research* 49 (2): 186–99. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>.
- Guo, Bing, Mulan Jiang, Xia Wan, Yangmin Gong, Zhuo Liang, and Chuanjiong Hu. 2013. "Identification and Heterologous Expression of a Δ 4-Fatty Acid Desaturase Gene from *Isochrysis Sphaerica*." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (10): 1413–21. <https://doi.org/10.4014/jmb.1301.01065>.
- Guo, Xiao-fei, Xin Li, Meiqi Shi, and Duo Li. 2017. "N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis." *Nutrients* 9 (7): 703. <https://doi.org/10.3390/nu9070703>.
- Guo, Xiao fei, Andrew J. Sinclair, Gunveen Kaur, and Duo Li. 2017. "Differential Effects of EPA, DPA and DHA on Cardio-Metabolic Risk Factors in High-Fat Diet Fed Mice." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, no. May. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.09.011>.
- Hall, Kathryn L., Shahriar Shahrokhi, and Marc G. Jeschke. 2012. "Enteral Nutrition Support in Burn Care: A Review of Current Recommendations as Instituted in the Ross Tilley Burn Centre." *Nutrients* 4 (11): 1554–65. <https://doi.org/10.1155/2012/539426>.
- Hamilton, James A., and Kellen Brunaldi. 2007. "A Model for Fatty Acid Transport into the Brain." *Journal of Molecular Neuroscience* 33 (1): 12–17. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0050-3>.

- Hansen, Trond Vidar, Jesmond Dalli, and Charles N. Serhan. 2017. "The Novel Lipid Mediator PD1n-3 DPA: An Overview of the Structural Elucidation, Synthesis, Biosynthesis and Bioactions." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.06.003>.
- Harizi, Hedi, J. B. Corcuff, and Norbert Gualde. 2008. "Arachidonic-Acid-Derived Eicosanoids: Roles in Biology and Immunopathology." *Trends in Molecular Medicine* 14 (10): 461–69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.08.005>.
- Harnack, Kerstin, Gaby Andersen, and Veronika Somoza. 2009. "Quantitation of Alpha-Linolenic Acid Elongation to Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid as Affected by the Ratio of N6/N3 Fatty Acids." *Nutrition and Metabolism* 6 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-8>.
- Harris, William S. 2012. "Stearidonic Acid as a 'pro-Eicosapentaenoic Acid.'" *Current Opinion in Lipidology* 23 (1): 30–34. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32834f0f0c>.
- . 2018. "The Omega-6:Omega-3 Ratio: A Critical Appraisal and Possible Successor." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 132 (March): 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.003>.
- Harris, William S., Liana Del Gobbo, and Nathan L. Tintle. 2017. "The Omega-3 Index and Relative Risk for Coronary Heart Disease Mortality: Estimation from 10 Cohort Studies." *Atherosclerosis* 262: 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.007>.
- Harris, William S., and Clemens Von Schacky. 2004. "The Omega-3 Index: A New Risk Factor for Death from Coronary Heart Disease?" *Preventive Medicine* 39 (1): 212–20. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.02.030>.
- Harwood, John, Frank Gunstone, and Albert Dijkstra. 2007. *The Lipid Handbook with CD-ROM, Third Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781420009675>.
- He, W., Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, D. Liao, J. Le, M. Nelson, E. Ong, J. M. Olefsky, and R. M. Evans. 2003. "Adipose-Specific Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Knockout Causes Insulin Resistance in Fat and Liver but Not in Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 15712–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536828100>.
- Hedley, A. J., and S. M. McGhee. 2004. "Design and Implementation of Health Information Systems. T Lippeveld, R Sauerborn, C Bodart (Eds). Geneva: World Health Organization, 2000, Pp. 270, US\$ 63.00 ISBN: 92-4-156199-8." *International Journal of Epidemiology* 33 (5): 1158–1158. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh292>.
- Heijning, Bert J.M. Van de, Annemarie Oosting, Diane Kegler, and Eline M. Van der Beek. 2017. "An Increased Dietary Supply of Medium-Chain Fatty Acids during Early Weaning in Rodents Prevents Excessive Fat Accumulation in Adulthood." *Nutrients* 9 (6): 631. <https://doi.org/10.3390/nu9060631>.
- Henderson, R. J., I. C. Burkow, M. Buzzi, and A. Bayer. 1998. "Effects of Docosahexaenoic (22:6n-3), Tetracosapentaenoic (24:5n-3) and Tetracosahexaenoic (24:6n-3) Acids on the Desaturation and Elongation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Trout Liver Microsomes." *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1392 (2–3): 309–19. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00045-9).
- Hersh, Elliot V., Edward T. Lally, and Paul A. Moore. 2005. "Update on Cyclooxygenase Inhibitors: Has a Third COX Isoform Entered the Fray?" *Current Medical Research and Opinion* 21 (8): 1217–26. <https://doi.org/10.1185/030079905X56367>.
- Hervé, Maxime R., Florence Nicolè, and Kim-Anh Lê Cao. 2018. "Multivariate Analysis of Multiple Datasets: A Practical Guide for Chemical Ecology." *Journal of Chemical Ecology* 44 (3): 215–34. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6>.

- Hiltunen, J. Kalervo, Teppo Karki, Ilmo E. Hassinen, and Harald Osmundsen. 1986. "B-Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Rat Liver Peroxisomes." *The Journal of Biological Chemistry* 261 (35): 16484–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2877988> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2877988.
- Hino, Asuka, Hisashi Adachi, Koji Toyomasu, Noriko Yoshida, Mika Enomoto, Akiko Hiratsuka, Yuji Hirai, Akira Satoh, and Tsutomu Imaizumi. 2004. "Very Long Chain N-3 Fatty Acids Intake and Carotid Atherosclerosis: An Epidemiological Study Evaluated by Ultrasonography." *Atherosclerosis* 176 (1): 145–49. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.020>.
- Hodson, Leanne, C. Murray Skeaff, and Barbara A. Fielding. 2008. "Fatty Acid Composition of Adipose Tissue and Blood in Humans and Its Use as a Biomarker of Dietary Intake." *Progress in Lipid Research* 47 (5): 348–80. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.03.003>.
- Hoile, Samuel P., Nicola A. Irvine, Christopher J. Kelsall, Charlene Sibbons, Aurélie Feunteun, Alex Collister, Christopher Torrens, et al. 2013. "Maternal Fat Intake in Rats Alters 20:4n-6 and 22:6n-3 Status and the Epigenetic Regulation of Fads2 in Offspring Liver." *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (7): 1213–20. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.09.005>.
- Hojsak, Iva, Jiri Bronsky, Cristina Campoy, Magnus Domellöf, Nicholas Embleton, Nataša Fidler Mis, Jessie Hulst, et al. 2018. "Young Child Formula: A Position Paper by the ESPGHAN Committee on Nutrition." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 66 (1): 177–85. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001821>.
- Holman, Ralph T. 1971. "Biological Activities of and Requirements for Polyunsaturated Acids." *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 9 (C): 607–82. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(71\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0079-6832(71)90038-3).
- Holman, T, and F Hatch. 1981. "Case Report A Case of Human Linolenic Involving Neurological." *Significance*, no. April: 617–23.
- Holub, Bruce J., Patricia Swidinsky, and Eek Park. 2011. "Oral Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) Is Differentially Incorporated into Phospholipid Pools and Differentially Metabolized to Eicosapentaenoic Acid in Tissues from Young Rats." *Lipids* 46 (5): 399–407. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3535-3>.
- Hooijmans, Carlijn R., and Amanda J. Kiliaan. 2008. "Fatty Acids, Lipid Metabolism and Alzheimer Pathology." *European Journal of Pharmacology* 585 (1): 176–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.081>.
- Horrobin, D F. 1993. "Fatty Acid Metabolism in Health and Disease: The Role of Delta-6-Desaturase." *The American Journal of Clinical Nutrition* 57 (5 Suppl): 736S–737S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386433>.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2002. "SREBPs: Transcriptional Mediators of Lipid Homeostasis." In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 67:491–98. <https://doi.org/10.1101/sqb.2002.67.491>.
- Horton, Jay D., Joseph L. Goldstein, and Michael S. Brown. 2002. "SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver." *J Clin Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI15593>.
- Howe, Peter, Barbara Meyer, Sally Record, and Katrine Baghurst. 2006. "Dietary Intake of Long-Chain ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids: Contribution of Meat Sources." *Nutrition* 22 (1): 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.05.009>.
- Howell, George, Xiong Deng, Chandrahassa Yellaturu, Edwards A. Park, Henry G. Wilcox, Rajendra Raghoebar, and Marshall B. Elam. 2009. "N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Insulin-Induced SREBP-1c Transcription via Reduced Trans-Activating Capacity of LXR α ." *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (12): 1190–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.08.008>.
- Huang, Jiung-Pang, Mei-Ling Cheng, Cheng-Yu Hung, Chao-Hung Wang, Po-Shiuan Hsieh, Ming-Shi Shiao, Jan-Kan Chen, Dai-Er Li, and Li-Man Hung. 2016. “Docosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Are Positively Associated with Insulin Sensitivity in Rats Fed High-Fat and High-Fructose Diets.” *Journal of Diabetes* 9 (September 2016): 936–46. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12505>.
- Huang, Wei, Elias Zwimpfer, Maxime R. Hervé, Zoe Bont, and Matthias Erb. 2018. “Neighbourhood Effects Determine Plant–herbivore Interactions Below-Ground.” *Journal of Ecology* 106 (1): 347–56. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12805>.
- Ian Givens, D., and Rachael A. Gibbs. 2008. “Current Intakes of EPA and DHA in European Populations and the Potential of Animal-Derived Foods to Increase Them.” *Proceedings of the Nutrition Society* 67 (3): 273–80. <https://doi.org/10.1017/S0029665108007167>.
- Igarashi, Miki, Lisa Chang, Kaizong Ma, and Stanley I. Rapoport. 2013. “Kinetics of Eicosapentaenoic Acid in Brain, Heart and Liver of Conscious Rats Fed a High n-3 PUFA Containing Diet.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89 (6): 403–12. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.09.004>.
- Igarashi, Miki, James C. DeMar, Kaizong Ma, Lisa Chang, Jane M. Bell, and Stanley I. Rapoport. 2007. “Docosahexaenoic Acid Synthesis from α -Linolenic Acid by Rat Brain Is Unaffected by Dietary n-3 PUFA Deprivation.” *Journal of Lipid Research* 48 (5): 1150–58. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600549-JLR200>.
- Igarashi, Miki, Kaizong Ma, Lisa Chang, Jane M Bell, and Stanley I Rapoport. 2008. “Rat Heart Cannot Synthesize Docosahexaenoic Acid from Circulating Alpha-Linolenic Acid Because It Lacks Elongase-2.” *Journal of Lipid Research* 49 (8): 1735–45. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800093-JLR200>.
- Ikemoto, a, M Ohishi, Y Sato, N Hata, Y Misawa, Y Fujii, and H Okuyama. 2001. “Reversibility of N-3 Fatty Acid Deficiency-Induced Alterations of Learning Behavior in the Rat: Level of n-6 Fatty Acids as Another Critical Factor.” *Journal of Lipid Research* 42 (10): 1655–63.
- Innes, Jacqueline K., and Philip C. Calder. 2018. “The Differential Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Cardiometabolic Risk Factors: A Systematic Review.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020532>.
- Innis, Sheila M. 2000. “Essential Fatty Acids in Infant Nutrition: Lessons and Limitations from Animal Studies in Relation to Studies on Infant Fatty Acid Requirements.” *American Journal of Clinical Nutrition* 71 (1 SUPPL.): 238S–244S. <http://ajcn.nutrition.org/content/71/1/238S>.
- . 2009. “Omega-3 Fatty Acids and Neural Development to 2 Years of Age: Do We Know Enough for Dietary Recommendations?” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48 (SUPPL. 1): S16–24. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31819773cf>.
- Innis, Sheila M., and Roger A. Dyer. 2002. “Brain Astrocyte Synthesis of Docosahexaenoic Acid from N-3 Fatty Acids Is Limited at the Elongation of Docosapentaenoic Acid.” *Journal of Lipid Research* 43 (9): 1529–36. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200120-JLR200>.
- Innis, Sheila M., and Jennifer J. Hamilton. 1992. “Effects of Developmental Changes and Early Nutrition on Cholesterol Metabolism in Infancy: A Review.” *Journal of the American College of Nutrition* 11 (June): 63S–68S. <https://doi.org/10.1080/07315724.1992.10737987>.
- Innis, SM. 2007. “Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development.” *The Journal of Nutrition* 137 (13): 855–59. <https://doi.org/10.1093/ajcn/137/4/855> [pii].
- Jacobs, A. A.A., J. Dijkstra, J. S. Liesman, M. J. Vandehaar, A. L. Lock, A. M. Van Vuuren, W. H.

- Hendriks, and J. Van Baal. 2013. "Effects of Short-and Long-Chain Fatty Acids on the Expression of Stearoyl-CoA Desaturase and Other Lipogenic Genes in Bovine Mammary Epithelial Cells." *Animal* 7 (9): 1508–16. <https://doi.org/10.1017/S175173111300061X>.
- Jakobsson, Andreas, Rolf Westerberg, and Anders Jacobsson. 2006. "Fatty Acid Elongases in Mammals: Their Regulation and Roles in Metabolism." *Progress in Lipid Research* 45 (3): 237–49. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>.
- Janvier. 2013. "Research Models." *Fiche Research Models*, 2013.
- Jaureguiberry, María S., M. Alejandra Tricerri, Susana A. Sanchez, Gabriela S. Finarelli, Mauro A. Montanaro, Eduardo D. Prieto, and Omar J. Rimoldi. 2014. "Role of Plasma Membrane Lipid Composition on Cellular Homeostasis: Learning from Cell Line Models Expressing Fatty Acid Desaturases." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 46 (4): 273–82. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt155>.
- Jeffcoat, R., and A. T. James. 1978. "The Control of Stearoyl-CoA Desaturase by Dietary Linoleic Acid." *FEBS Letters* 85 (1): 114–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)81260-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)81260-5).
- Jeffcoat, R, P R Brawn, R Safford, and A T James. 1977. "Properties of Rat Liver Microsomal Stearoyl-Coenzyme A Desaturase." *The Biochemical Journal* 161 (2): 431–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1164521>.
- Jenkins, Benjamin, James A. West, and Albert Koulman. 2015. "A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease." *Molecules* 20 (2): 2425–44. <https://doi.org/10.3390/molecules20022425>.
- Jenkins, David J a, John L Sievenpiper, Daniel Pauly, Ussif Rashid Sumaila, Cyril W C Kendall, and Farley M Mowat. 2009. "Are Dietary Recommendations for the Use of Fish Oils Sustainable?" *CMAJ Canadian Medical Association Journal* 180 (6): 633–37. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081274>.
- Jia, Xiaoming, Mohammadreza Pakseresht, Nour Wattar, Jamie Wildgrube, Stephanie Sontag, Murphy Andrews, Fatheema Begum Subhan, Linda McCargar, and Catherine J. Field. 2015. "Women Who Take N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplements during Pregnancy and Lactation Meet the Recommended Intake." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 40 (5): 474–81. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0313>.
- Jin, Youri, Tae Hee Kim, and Yongsoon Park. 2016. "Association between Erythrocyte Levels of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Depression in Postmenopausal Women Using or Not Using Hormone Therapy." *Menopause* 23 (9): 1012–18. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000667>.
- Johansson, Lars, Kari Solvoll, Gunn Elin Aa Bjørneboe, and Christian A. Drevon. 1998. "Under- and Overreporting of Energy Intake Related to Weight Status and Lifestyle in a Nationwide Sample." *American Journal of Clinical Nutrition* 68 (2): 266–74. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.2.266>.
- Johnson, Guy H., and Kevin Fritsche. 2012. "Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112 (7): 1029–41, 1041.e1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.03.029>.
- Jones, Brynn H, Margaret A Maher, J Banz, J A Y Whelan, Pamela J Smith, Naima Moustaid, A Maher, B Zemel, Jay Whelan, and J Smith. 1996. "Adipose Tissue Stearoyl-CoA Desaturase mRNA Is Increased by Obesity and Decreased by Polyunsaturated Fatty Acids." *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 271 (1): 44–49. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.1.E44>.
- Jones, Peter J.H. 1994. "Dietary Linoleic, α -Linolenic and Oleic Acids Are Oxidized at Similar Rates

- in Rats Fed a Diet Containing These Acids in Equal Proportions.” *Lipids* 29 (7): 491–95. <https://doi.org/10.1007/BF02578246>.
- Jump, Donald B. 2008. “N-3 Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription.” *Current Opinion in Lipidology* 19 (3): 242–47. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ffaf6a>.
- . 2009. “Mammalian Fatty Acid Elongases.” *Methods in Molecular Biology* 579: 375–89. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-322-0_19.
- . 2011. “Fatty Acid Regulation of Hepatic Lipid Metabolism.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14 (2): 115–20. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328342991c>.
- Jump, Donald B., Daniela Botolin, Yun Wang, Jinghua Xu, Olivier Demeure, and Barbara Christian. 2008. “Docosahexaenoic Acid (DHA) and Hepatic Gene Transcription.” *Chemistry and Physics of Lipids*, Special Issue: Docosahexanoic Acid: Molecular Aspects of an Extraordinary Fatty Acid, 153 (1): 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.007>.
- Jump, Donald B., Sasmita Tripathy, and Christopher M. Depner. 2013. “Fatty Acid–Regulated Transcription Factors in the Liver.” *Annual Review of Nutrition* 33 (1): 249–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161139>.
- Jump, Donald B., Daniela Botolin, Yun Wang, Jinghua Xu, Barbara Christian, and Olivier Demeure. 2005. “Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription.” *The Journal of Nutrition* 135 (11): 2503–6. <https://doi.org/10.1080/10408360490278341>.
- Jun, Bokkyoo, Pranab K. Mukherjee, Aram Asatryan, Marie Audrey Kautzmann, Jessica Heap, William C. Gordon, Surjyadipta Bhattacharjee, Rong Yang, Nicos A. Petasis, and Nicolas G. Bazan. 2017. “Elovanoids Are Novel Cell-Specific Lipid Mediators Necessary for Neuroprotective Signaling for Photoreceptor Cell Integrity.” *Scientific Reports* 7 (1): 5279. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05433-7>.
- Kalivodová, Alžběta, Karel Hron, Peter Filzmoser, Lukáš Najdekr, Hana Janečková, and Tomáš Adam. 2015. “PLS-DA for Compositional Data with Application to Metabolomics.” *Journal of Chemometrics* 29 (1): 21–28. <https://doi.org/10.1002/cem.2657>.
- Kanayasu-Toyoda, Toshie, Ikuo Morita, and Sei Itsu Murota. 1996. “Docosapentaenoic Acid (22:5, n-3), an Elongation Metabolite of Eicosapentaenoic Acid (20:5, n-3), Is a Potent Stimulator of Endothelial Cell Migration on Pretreatment in Vitro.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54 (5): 319–25. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(96\)90045-9](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(96)90045-9).
- Katan, M B, J P Deslypere, A P van Birgelen, M Penders, and M Zegwaard. 1997. “Kinetics of the Incorporation of Dietary Fatty Acids into Serum Cholesteryl Esters, Erythrocyte Membranes, and Adipose Tissue: An 18-Month Controlled Study.” *Journal of Lipid Research* 38 (10): 2012–22. <http://www.jlr.org/content/38/10/2012.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374124>.
- Kaur, Gunveen, Denovan P. Begg, Daniel Barr, Manohar Garg, David Cameron-Smith, and Andrew J. Sinclair. 2010. “Short-Term Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) Supplementation Increases Tissue Docosapentaenoic Acid, DHA and EPA Concentrations in Rats.” *British Journal of Nutrition* 103 (1): 32–37. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991334>.
- Kaur, Gunveen, David Cameron-Smith, Manohar Garg, and Andrew J. Sinclair. 2011. “Docosapentaenoic Acid (22:5n-3): A Review of Its Biological Effects.” *Progress in Lipid Research* 50 (1): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.004>.
- Kaur, Gunveen, Xiao Fei Guo, and Andrew J. Sinclair. 2016. “Short Update on Docosapentaenoic Acid: A Bioactive Long-Chain n-3 Fatty Acid.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000252>.
- Kaur, Gunveen, Juan C. Molero, Harrison S. Weisinger, and Andrew J. Sinclair. 2013. “Orally

- Administered [14C]DPA and [14C]DHA Are Metabolised Differently to [14C]EPA in Rats.” *British Journal of Nutrition* 109 (3): 441–48. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001419>.
- Kaur, Gunveen, Andrew J. Sinclair, David Cameron-Smith, Daniel P. Barr, Juan C. Molero-Navajas, and Nicky Konstantopoulos. 2011. “Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) down-Regulates the Expression of Genes Involved in Fat Synthesis in Liver Cells.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85 (3–4): 155–61. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.06.002>.
- Kawabata, Terue, Kazumi Shimoda, Sayaka Horiguchi, Marina Domon, Chie Hagiwara, Miho Takiyama, and Yasuo Kagawa. 2013. “Influences of Stearidonic Acid-Enriched Soybean Oil on the Blood and Organ Biochemical Parameters in Rats.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 88 (2): 179–84. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.11.004>.
- Kelly, Laura, Belinda Grehan, Andrea Della Chiesa, Shane M. O’Mara, Eric Downer, George Sahyoun, Karen A. Massey, Anna Nicolaou, and Marina A. Lynch. 2011. “The Polyunsaturated Fatty Acids, EPA and DPA Exert a Protective Effect in the Hippocampus of the Aged Rat.” *Neurobiology of Aging* 32 (12): 2318.e1-2318.e15. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.001>.
- Ketsa, O. V., and M. M. Marchenko. 2014. “[The effect of diet ratio of polyunsaturated fatty acids of omega-3 and omega-6 families on activity of aminotransferases and gamma-glutamyltransferase in rat blood serum].” *Voprosy Pitaniia* 83 (1): 27–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059053>.
- Khaddaj-Mallat, Rayan, Roddy Hiram, Chantal Sirois, Marco Sirois, Edmond Rizcallah, Sofia Marouan, Caroline Morin, and Éric Rousseau. 2016. “MAG-DPA Curbs Inflammatory Biomarkers and Pharmacological Reactivity in Cytokine-Triggered Hyperresponsive Airway Models.” *Pharmacology Research and Perspectives* 4 (6): e00263. <https://doi.org/10.1002/prp2.263>.
- Khaddaj-Mallat, Rayan, Caroline Morin, and Éric Rousseau. 2016. “Novel N-3 PUFA Monoacylglycerides of Pharmacological and Medicinal Interest: Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Effects.” *European Journal of Pharmacology* 792 (December): 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.038>.
- Kihara, Akio. 2012. “Very Long-Chain Fatty Acids: Elongation, Physiology and Related Disorders.” *Journal of Biochemistry* 152 (5): 387–95. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>.
- Kim, Hee-Yong, James Bigelow, and Jillonne H. Kevala. 2004. “Substrate Preference in Phosphatidylserine Biosynthesis for Docosahexaenoic Acid Containing Species.” *Biochemistry* 43 (4): 1030–36. <https://doi.org/10.1021/bi035197x>.
- Kim, Jongsoo, and James Friel. 2012. “Lipids and Human Milk.” *Lipid Technology* 24 (5): 103–5. <https://doi.org/10.1002/lite.201200190>.
- Kishida, Etsu, Michiko Tajiri, and Yasuo Masuzawa. 2006. “Docosahexaenoic Acid Enrichment Can Reduce L929 Cell Necrosis Induced by Tumor Necrosis Factor.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (4): 454–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.03.023>.
- Kitazawa, Hidefumi, Yasuhisa Miyamoto, Ken Shimamura, Akira Nagumo, and Shigeru Tokita. 2009. “Development of a High-Density Assay for Long-Chain Fatty Acyl-CoA Elongases.” *Lipids* 44 (8): 765–73. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3320-8>.
- Kitson, Alex P., Tracy L. Smith, Kristin A. Marks, and Ken D. Stark. 2012. “Tissue-Specific Sex Differences in Docosahexaenoic Acid and Δ 6-Desaturase in Rats Fed a Standard Chow Diet.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 37 (6): 1200–1211. <https://doi.org/10.1139/h2012-103>.
- Kokoli, A.N., S.N. Lavrentiadou, I.A. Zervos, M.P. Tsantarliotou, M.P. Georgiadis, E.A. Nikolaidis, N. Botsoglou, C.M. Boscous, and I.A. Taitzoglou. 2017. “Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Induce Plasminogen Activator Activity and DNA Damage in Rabbit Spermatozoa.”

Andrologia 49 (10): e12776. <https://doi.org/10.1111/and.12776>.

- Koletzko, B., M. Mroczek, and H. J. Bremer. 1988. "Fatty Acid Composition of Mature Human Milk in Germany." *American Journal of Clinical Nutrition* 47 (6): 954–59. <https://doi.org/10.1093/ajcn/47.6.954>.
- Koletzko, Berthold, Susan Baker, Geoff Cleghorn, Ulysses Fagundes Neto, Sarath Gopalan, Olle Hernell, Quak Seng Hock, et al. 2005. "Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41 (5): 584–99. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000187817.38836.42>.
- Kuda, Ondrej. 2017. "Bioactive Metabolites of Docosahexaenoic Acid." *Biochimie* 136: 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.002>.
- Kuhnt, K., C. Fuhrmann, M. Kohler, M. Kiehntopf, and G. Jahreis. 2014. "Dietary Echium Oil Increases Long-Chain n-3 PUFAs, Including Docosapentaenoic Acid, in Blood Fractions and Alters Biochemical Markers for Cardiovascular Disease Independently of Age, Sex, and Metabolic Syndrome." *Journal of Nutrition* 144 (4): 447–60. <https://doi.org/10.3945/jn.113.180802>.
- Kuhnt, Katrin, Stefanie Weiß, Michael Kiehntopf, and Gerhard Jahreis. 2016. "Consumption of Echium Oil Increases EPA and DPA in Blood Fractions More Efficiently Compared to Linseed Oil in Humans." *Lipids in Health and Disease* 15 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0199-2>.
- Kulkarni, Asmita, Kamini Dangat, Anvita Kale, Pratiksha Sable, Preeti Chavan-Gautam, and Sadhana Joshi. 2011. "Effects of Altered Maternal Folic Acid, Vitamin B12 and Docosahexaenoic Acid on Placental Global DNA Methylation Patterns in Wistar Rats." *PLoS ONE* 6 (3): e17706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017706>.
- Kumadaki, Shin, Takashi Matsuzaka, Toyonori Kato, Naoya Yahagi, Takashi Yamamoto, Sumiyo Okada, Kazuto Kobayashi, et al. 2008. "Mouse Elovl-6 Promoter Is an SREBP Target." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (2): 261–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.075>.
- Kuratko, Conny N., Erin Cernkovich Barrett, Edward B. Nelson, and Norman Salem. 2013. "The Relationship of Docosahexaenoic Acid (DHA) with Learning and Behavior in Healthy Children: A Review." *Nutrients* 5 (7): 2777–2810. <https://doi.org/10.3390/nu5072777>.
- Kwantes, Jonathan M., and Oliver Grundmann. 2015. "A Brief Review of Krill Oil History, Research, and the Commercial Market." *Journal of Dietary Supplements* 12 (1): 23–35. <https://doi.org/10.3109/19390211.2014.902000>.
- Labonté, M., Dewailly, M. Lucas, P. Couture, and B. Lamarche. 2014. "Association of Red Blood Cell N-3 Polyunsaturated Fatty Acids with Plasma Inflammatory Biomarkers among the Quebec Cree Population." *European Journal of Clinical Nutrition* 68 (9): 1042–47. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.125>.
- Lacombe, R. J. Scott, Raphaël Chouinard-Watkins, and Richard P. Bazinet. 2018. "Brain Docosahexaenoic Acid Uptake and Metabolism." *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.12.004>.
- Lagarde, Michel, Nathalie Bernoud, Nicole Brossard, Dominique Lemaitre-Delaunay, Frank Thiès, Martine Croset, and Jean Lecerf. 2001. "Lysophosphatidylcholine as a Preferred Carrier Form of Docosahexaenoic Acid to the Brain." *Journal of Molecular Neuroscience* 16 (2–3): 201–4. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:201>.
- Laino, Carlos Horacio, Pilar Garcia, María Fernanda Podestá, Christian Höcht, Nora Slobodianik, and Analía Reinés. 2014. "Fluoxetine Potentiation of Omega-3 Fatty Acid Antidepressant Effect: Evaluating Pharmacokinetic and Brain Fatty Acid-Related Aspects in Rodents." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103 (10): 3316–25. <https://doi.org/10.1002/jps.24123>.

- Lamprey, M S, and B L Walker. 1976. "A Possible Essential Role for Dietary Linolenic Acid in the Development of the Young Rat." *Journal of Nutrition* 106 (1): 86–93.
- Lands, William E.M., Bozena Libelt, Anna Morris, Nancy C. Kramer, T. Elaine Prewitt, Phyllis Bowen, Dale Schmeisser, Michael H. Davidson, and Julie H. Burns. 1992. "Maintenance of Lower Proportions of (n - 6) Eicosanoid Precursors in Phospholipids of Human Plasma in Response to Added Dietary (n - 3) Fatty Acids." *BBA - Molecular Basis of Disease* 1180 (2): 147–62. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90063-S).
- las Heras-Gómez, Ignacio De, Sonia Medina, Teresa Casas-Pina, Lidia Marín-Soler, Anna Tomás, Pedro Martínez-Hernández, Camille Oger, et al. 2017. "Potential Applications of Lipid Peroxidation Products – F4-Neuroprostanes, F3-Neuroprostanes-6 DPA, F2-Dihomo-Isoprostanes and F2-Isoprostanes - in the Evaluation of the Allograft Function in Renal Transplantation." *Free Radical Biology and Medicine* 104 (January): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.019>.
- Lauritzen, L., H. S. Hansen, M. H. Jorgensen, and K. F. Michaelsen. 2001. "The Essentiality of Long Chain N-3 Fatty Acids in Relation to Development and Function of the Brain and Retina." *Progress in Lipid Research* 40 (1–2): 1–94. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00017-5).
- Lee, Je Min, Hyungjae Lee, Seok Beom Kang, and Woo Jung Park. 2016. "Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances." *Nutrients* 8 (1): 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>.
- Lee, John H., James H. O’Keefe, Carl J. Lavie, and William S. Harris. 2009. "Omega-3 Fatty Acids: Cardiovascular Benefits, Sources and Sustainability." *Nature Reviews Cardiology* 6 (12): 753–58. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.188>.
- Lefkowitz, William, Sun Young Lim, Yuhong Lin, and Norman Salem. 2005. "Where Does the Developing Brain Obtain Its Docosahexaenoic Acid? Relative Contributions of Dietary α -Linolenic Acid, Docosahexaenoic Acid, and Body Stores in the Developing Rat." *Pediatric Research* 57 (1): 157–65. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000147572.57627.AE>.
- Legrand, P, D Catheline, M C Fichot, and P Lemarchal. 1997. "Inhibiting Delta9-Desaturase Activity Impairs Triacylglycerol Secretion in Cultured Chicken Hepatocytes." *The Journal of Nutrition* 127 (2): 249–56. <https://doi.org/10.1093/jn/127.2.249>.
- Legrand, Philippe. 2004. "Comment Augmenter l’apport Nutritionnel En Acides Gras n-3?" *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 11 (1): 50–54. <https://doi.org/10.1051/ocl.2004.0050>.
- Legrand, Philippe, Erwan Beauchamp, Daniel Catheline, Frédérique Pédrone, and Vincent Rioux. 2010. "Short Chain Saturated Fatty Acids Decrease Circulating Cholesterol and Increase Tissue Pufa Content in the Rat." *Lipids* 45 (11): 975–86. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3481-5>.
- Legrand, Philippe, Daniel Catheline, Vincent Rioux, and Georges Durand. 2002. "Lauric Acid Is Desaturated to 12:1n-3 by Hepatocytes and Rat Liver Homogenates." *Lipids* 37 (6): 569–72. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0934-y>.
- Legrand, Philippe, Anne Morise, and Esther Kalonji. 2011. "Update of French Nutritional Recommendations for Fatty Acids." *World Review of Nutrition and Dietetics* 102: 137–43. <https://doi.org/10.1159/000327800>.
- Legrand, Philippe, B. Schmitt, J. Mourot, D. Catheline, G. Chesneau, M. Mireaux, N. Kerhoas, and P. Weill. 2010. "The Consumption of Food Products from Linseed-Fed Animals Maintains Erythrocyte Omega-3 Fatty Acids in Obese Humans." *Lipids* 45 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3376-5>.
- Leng, G C, D F Horrobin, F G Fowkes, F B Smith, G D Lowe, P T Donnan, and K Ells. 1994. "Plasma Essential Fatty Acids, Cigarette Smoking, and Dietary Antioxidants in Peripheral Arterial Disease. A Population-Based Case-Control Study." *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of*

- Leng, Shuguang, Maria A. Picchi, Yohannes Tesfaigzi, Guodong Wu, W. James Gauderman, Fadi Xu, Frank D. Gilliland, and Steven A. Belinsky. 2017. “Dietary Nutrients Associated with Preservation of Lung Function in Hispanic and Non-Hispanic White Smokers from New Mexico.” *International Journal of COPD* 12: 3171–81. <https://doi.org/10.2147/COPD.S142237>.
- Leonard, A E, B Kelder, E G Bobik, L T Chuang, J M Parker-Barnes, J M Thurmond, P E Kroeger, J J Kopchick, Y S Huang, and P Mukerji. 2000. “CDNA Cloning and Characterization of Human Delta5-Desaturase Involved in the Biosynthesis of Arachidonic Acid.” *The Biochemical Journal* 347 Pt 3 (Pt 3): 719–24. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leonard, Amanda E., Bruce Kelder, Emil G. Bobik, Lu Te Chuang, Christopher J. Lewis, John J. Kopchick, Pradip Mukerji, and Yung Sheng Huang. 2002. “Identification and Expression of Mammalian Long-Chain PUFA Elongation Enzymes.” *Lipids* 37 (8): 733–40. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0955-6>.
- Leonard, Amanda E., Suzette L. Pereira, Howard Sprecher, and Yung Sheng Huang. 2004. “Elongation of Long-Chain Fatty Acids.” *Progress in Lipid Research* 43 (1): 36–54. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00040-7).
- Leslie, Christina C. 2004. “Regulation of the Specific Release of Arachidonic Acid by Cytosolic Phospholipase A2.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70 (4): 373–76. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.12.012>.
- Leslie, Michael A., Daniel J.A. Cohen, Danyelle M. Liddle, Lindsay E. Robinson, and David W.L. Ma. 2015. “A Review of the Effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Blood Triacylglycerol Levels in Normolipidemic and Borderline Hyperlipidemic Individuals.” *Lipids in Health and Disease* 14 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0049-7>.
- Lewis, Sherry M., Duane E. Ullrey, Dennis E. Barnard, and Joseph J. Knapka. 2006. “Nutrition.” In *The Laboratory Rat*, 219–301. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50012-1>.
- Leyton, J., P.J. Drury, and M.A. Crawford. 1987. “Differential Oxidation of Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Vivo in the Rat.” *The British Journal of Nutrition* 57 (3): 383–93. <https://doi.org/10.1079/BJN19870046>.
- Li, Juan, Huaixia Yin, Douglas M. Bibus, and Oleksandr A. Byelashov. 2016. “The Role of Omega-3 Docosapentaenoic Acid in Pregnancy and Early Development.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 118 (11): 1692–1701. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600076>.
- Li, Y., O. Monroig, L. Zhang, S. Wang, X. Zheng, J. R. Dick, C. You, and D. R. Tocher. 2010. “Vertebrate Fatty Acyl Desaturase with 4 Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39): 16840–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008429107>.
- Lin, W., F. W. Wu, L. Yue, Q. G. Du, L. Tian, and Z. X. Wang. 2014. “Combination of Urea Complexation and Molecular Distillation to Purify Dha and Epa from Sardine Oil Ethyl Esters.” *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists’ Society* 91 (4): 687–95. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2402-1>.
- Lin, Yu Hong, and Norman Salem. 2007. “Whole Body Distribution of Deuterated Linoleic and α -Linolenic Acids and Their Metabolites in the Rat.” *Journal of Lipid Research* 48 (12): 2709–24. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700369-JLR200>.
- Linderborg, Kaisa M., Gunveen Kaur, Eliza Miller, Peter J. Meikle, Amy E. Larsen, Jacquelyn M. Weir, Anu Nuora, et al. 2013. “Postprandial Metabolism of Docosapentaenoic Acid (DPA, 22:5n-3) and Eicosapentaenoic Acid (EPA, 20:5n-3) in Humans.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential*

- Fatty Acids* 88 (4): 313–19. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.01.010>.
- Loconto, Paul. 2006. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86th Edition Edited by David R. Lide (National Institute of Standards and Technology). CRC Press (an Imprint of Taylor and Francis Group): Boca Raton, FL. 2005. 2544 Pp. \$125.96. ISBN 0-8493-0486-5*. Edited by Taylor and Francis Group. *Journal of the American Chemical Society*. CRC Press. Vol. 128. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ja059868l>.
- Lohner, Szimonetta, Katalin Fekete, Tamás Marosvölgyi, and Tamás Decsi. 2013. “Gender Differences in the Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status: Systematic Review of 51 Publications.” *Annals of Nutrition and Metabolism* 62 (2): 98–112. <https://doi.org/10.1159/000345599>.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- Lukiw, Walter J., Jian Guo Cui, Victor L. Marcheselli, Merete Bodker, Anja Botkjaer, Katherine Gotlinger, Charles N. Serhan, and Nicolas G. Bazan. 2005. “A Role for Docosahexaenoic Acid-Derived Neuroprotectin D1 in Neural Cell Survival and Alzheimer Disease.” *Journal of Clinical Investigation* 115 (10): 2774–83. <https://doi.org/10.1172/JCI25420>.
- Lukiw, Wj, and Ng Bazan. 2008. “Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain.” *The Journal of Nutrition* 138 (12): 2510–14. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016.2510>.
- Maehre, Hanne, Ida-Johanne Jensen, Edel Elvevoll, and Karl-Erik Eilertsen. 2015. “ ω -3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 22636–61. <https://doi.org/10.3390/ijms160922636>.
- Magallanes, Leisa M, Lorena V Tarditto, Nelson R Grosso, María C Pramparo, and María F Gayol. 2018. “Highly Concentrated Omega-3 Fatty Acid Ethyl Esters by Urea Complexation and Molecular Distillation.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, August. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9258>.
- Mains, P. E., I. A. Sulston, and W. B. Wood. 1990. “Dominant Maternal-Effect Mutations Causing Embryonic Lethality in *Caenorhabditis Elegans*.” *Genetics* 125 (2): 351–69. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>.
- Majou, Didier. 2018. “Evolution of the Human Brain: The Key Roles of DHA (Omega-3 Fatty Acid) and Δ 6-Desaturase Gene.” *Ocl*. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017059>.
- Maki, Kevin C., George Bobotas, Mary R. Dicklin, Margie Huebner, and William F. Keane. 2017. “Effects of MAT9001 Containing Eicosapentaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, Compared to Eicosapentaenoic Acid Ethyl Esters, on Triglycerides, Lipoprotein Cholesterol, and Related Variables.” *Journal of Clinical Lipidology* 11 (1): 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.10.010>.
- Mann, John Douglas, Keturah R. Faurot, Beth MacIntosh, Olafur S. Palsson, Chirayath M. Suchindran, Susan Ann Gaylord, Chanee Lynch, et al. 2018. “A Sixteen-Week Three-Armed, Randomized, Controlled Trial Investigating Clinical and Biochemical Effects of Targeted Alterations in Dietary Linoleic Acid and n-3 EPA+DHA in Adults with Episodic Migraine: Study Protocol.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 128 (January): 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.11.002>.
- Mann, N., L. Johnson, G. Warrick, and a. Sinclair. 1995. “Arachidonic Acid Content of the Australian Diet Is Lower than Previously Estimated.” *The Journal of Nutrition* 125 (November 1994): 2528–35. <https://doi.org/10.1093/jn/125.10.2528>.
- Mansbach, C. M., and F. Gorelick. 2007. “Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. II. Dietary Lipid Absorption, Complex Lipid Synthesis, and the Intracellular Packaging and Secretion of Chylomicrons.” *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (4):

G645–50. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00299.2007>.

- Markworth, James F., Gunveen Kaur, Eliza G. Miller, Amy E. Larsen, Andrew J. Sinclair, Krishna Rao Maddipati, and David Cameron-Smith. 2016. “Divergent Shifts in Lipid Mediator Profile Following Supplementation with N-3 Docosapentaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid.” *FASEB Journal* 30 (11): 3714–25. <https://doi.org/10.1096/fj.201600360R>.
- Marquardt, Andreas, Heidi Stöhr, Karen White, and Bernhard H.F. Weber. 2000. “CDNA Cloning, Genomic Structure, and Chromosomal Localization of Three Members of the Human Fatty Acid Desaturase Family.” *Genomics* 66 (2): 175–83. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6196>.
- Martin, Camilia, Pei-Ra Ling, and George Blackburn. 2016. “Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula.” *Nutrients* 8 (5): 279. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>.
- Martinez, M. 1995. “Polyunsaturated Fatty Acids in the Developing Human Brain, Erythrocytes and Plasma in Peroxisomal Disease: Therapeutic Implications.” *Journal of Inherited Metabolic Disease* 18 (1 Supplement): 61–75. <https://doi.org/10.1007/BF00711429>.
- . 2001. “Restoring the DHA Levels in the Brains of Zellweger Patients.” *Journal of Molecular Neuroscience* 16 (2–3): 309–16. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:309>.
- Masquio, Deborah Cristina Landi, Aline de Piano-Ganen, Lila Missae Oyama, Raquel Munhoz da Silveira Campos, Aline Boveto Santamarina, Gabriel Inácio de Moraes Honorato de Souza, Aline Dal Olio Gomes, et al. 2016. “The Role of Free Fatty Acids in the Inflammatory and Cardiometabolic Profile in Adolescents with Metabolic Syndrome Engaged in Interdisciplinary Therapy.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 33 (July): 136–44. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.017>.
- Mater, Michelle K., Annette P. Thelen, David A. Pan, and Donald B. Jump. 1999. “Sterol Response Element-Binding Protein 1c (SREBP1c) Is Involved in the Polyunsaturated Fatty Acid Suppression of Hepatic S14 Gene Transcription.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (46): 32725–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32725>.
- Matsuoka, Y. J., N. Sawada, M. Mimura, R. Shikimoto, S. Nozaki, K. Hamazaki, Y. Uchitomi, and S. Tsugane. 2017. “Dietary Fish, n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption, and Depression Risk in Japan: A Population-Based Prospective Cohort Study.” *Translational Psychiatry* 7 (9): e1242. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.206>.
- Matsuzaka, Takashi, Hitoshi Shimano, Naoya Yahagi, Michiyo Amemiya-Kudo, Tomohiro Yoshikawa, Alyssa H Hasty, Yoshiaki Tamura, et al. 2002. “Dual Regulation of Mouse Δ 5- and Δ 6-Desaturase Gene Expression by SREBP-1 and PPAR α .” *Journal of Lipid Research* 43 (1): 107–14. <http://www.jlr.org/content/43/1/107.abstract>.
- McNamara, Robert K., Jessica Able, Ronald Jandacek, Therese Rider, and Patrick Tso. 2009. “Gender Differences in Rat Erythrocyte and Brain Docosahexaenoic Acid Composition: Role of Ovarian Hormones and Dietary Omega-3 Fatty Acid Composition.” *Psychoneuroendocrinology* 34 (4): 532–39. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.013>.
- Mennitti, Laís V., Juliana L. Oliveira, Carina A. Morais, Débora Estadella, Lila M. Oyama, Claudia M. Oller do Nascimento, and Luciana P. Pisani. 2015. “Type of Fatty Acids in Maternal Diets during Pregnancy and/or Lactation and Metabolic Consequences of the Offspring.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (2): 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.001>.
- Merle, Bénédicte M.J., Benjamin Buaud, Jean François Korobelnik, Alain Bron, Marie Noëlle Delyfer, Marie Bénédicte Rougier, Hélène Savel, Carole Vaysse, Catherine Creuzot-Garcher, and Cécile Delcourt. 2017. “Plasma Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Macular Pigment in Subjects with Family History of Age-Related Macular Degeneration: The Limpia Study.” *Acta Ophthalmologica* 95 (8): e763–69. <https://doi.org/10.1111/aos.13408>.
- Metherel, A. H., J. J. Aristizabal Henao, and K. D. Stark. 2013. “EPA and DHA Levels in Whole Blood

Decrease More Rapidly When Stored at -20 C as Compared with Room Temperature, 4 and -75 C.” *Lipids* 48 (11): 1079–91. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3827-x>.

- Metherel, Adam H., Raphaël Chouinard-Watkins, Marc Olivier Trépanier, R. J. Scott Lacombe, and Richard P. Bazinet. 2017. “Retroconversion Is a Minor Contributor to Increases in Eicosapentaenoic Acid Following Docosahexaenoic Acid Feeding as Determined by Compound Specific Isotope Analysis in Rat Liver.” *Nutrition and Metabolism* 14 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0230-2>.
- Metherel, Adam H., R. J. Scott Lacombe, Raphaël Chouinard-Watkins, Kathryn E. Hopperton, and Richard P. Bazinet. 2017. “Complete Assessment of Whole-Body n-3 and n-6 PUFA Synthesis-Secretion Kinetics and DHA Turnover in a Rodent Model.” *Journal of Lipid Research*, jlr.M081380. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081380>.
- Micha, Renata, Shahab Khatibzadeh, Peilin Shi, Saman Fahimi, Stephen Lim, Kathryn G. Andrews, Rebecca E. Engell, John Powles, Majid Ezzati, and Dariush Mozaffarian. 2014. “Global, Regional, and National Consumption Levels of Dietary Fats and Oils in 1990 and 2010: A Systematic Analysis Including 266 Country-Specific Nutrition Surveys.” *BMJ (Online)* 348 (April): 1–20. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2272>.
- Michaelson, L V, J A Napier, M Lewis, G Griffiths, C M Lazarus, and A K Stobart. 1998. “Functional Identification of a Fatty Acid Delta5 Desaturase Gene from *Caenorhabditis Elegans*.” *FEBS Letters* 439 (3): 215–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845325>.
- Miller, Eliza, Gunveen Kaur, Amy Larsen, Su Peng Loh, Kaisa Linderborg, Harrison S. Weisinger, Giovanni M. Turchini, David Cameron-Smith, and Andrew J. Sinclair. 2013. “A Short-Term n-3 DPA Supplementation Study in Humans.” *European Journal of Nutrition* 52 (3): 895–904. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0396-3>.
- Miller, Michael, Neil J. Stone, Christie Ballantyne, Vera Bittner, Michael H. Criqui, Henry N. Ginsberg, Anne Carol Goldberg, et al. 2011. “Triglycerides and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association.” *Circulation* 123 (20): 2292–2333. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182160726>.
- Mitchell, Drake C., Shui Lin Niu, and Burton J. Litman. 2012. “Quantifying the Differential Effects of DHA and DPA on the Early Events in Visual Signal Transduction.” *Chemistry and Physics of Lipids, Liposomes, lipid biophysics, and sphingolipid research: from basic to translation research.*, 165 (4): 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008>.
- Mitchell, Ryan W., and Grant M. Hatch. 2011. “Fatty Acid Transport into the Brain: Of Fatty Acid Fables and Lipid Tails.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85 (5): 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.007>.
- Miura, Kyoko, Maria Celia B. Hughes, Jacobus P. J. Ungerer, and Adelaide C. Green. 2016. “Plasma Eicosapentaenoic Acid Is Negatively Associated with All-Cause Mortality among Men and Women in a Population-Based Prospective Study.” *Nutrition Research* 36 (11): 1202–9. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.09.006>.
- Molloy, Carly, Lex W. Doyle, Maria Makrides, and Peter J. Anderson. 2012. “Docosahexaenoic Acid and Visual Functioning in Preterm Infants: A Review.” *Neuropsychology Review* 22 (4): 425–37. <https://doi.org/10.1007/s11065-012-9216-z>.
- Moon, R. J., N. C. Harvey, S. M. Robinson, G. Ntani, J. H. Davies, H. M. Inskip, K. M. Godfrey, et al. 2013. “Maternal Plasma Polyunsaturated Fatty Acid Status in Late Pregnancy Is Associated with Offspring Body Composition in Childhood.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (1): 299–307. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2482>.
- Moon, Young Ah, and Jay D. Horton. 2003. “Identification of Two Mammalian Reductases Involved in the Two-Carbon Fatty Acyl Elongation Cascade.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7335–

43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211684200>.
- Moriguchi, Toru, Sun-Young Lim, Rebecca Greiner, William Lefkowitz, James Loewke, Junji Hoshiba, and Norman Salem. 2004. "Effects of an N-3-Deficient Diet on Brain, Retina, and Liver Fatty Acyl Composition in Artificially Reared Rats." *Journal of Lipid Research* 45 (8): 1437–45. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400087-JLR200>.
- Morin, C., R. Hiram, E. Rousseau, P. U. Blier, and S. Fortin. 2014. "Docosapentaenoic Acid Monoacylglyceride Reduces Inflammation and Vascular Remodeling in Experimental Pulmonary Hypertension." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 307 (4): H574–86. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00814.2013>.
- Morin, Caroline, Pierre U. Blier, and Samuel Fortin. 2015. "Eicosapentaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Monoglycerides Are More Potent than Docosahexaenoic Acid Monoglyceride to Resolve Inflammation in a Rheumatoid Arthritis Model." *Arthritis Research and Therapy* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0653-y>.
- Morin, Caroline, Éric Rousseau, and Samuel Fortin. 2013. "Anti-Proliferative Effects of a New Docosapentaenoic Acid Monoacylglyceride in Colorectal Carcinoma Cells." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89 (4): 203–13. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.07.004>.
- Morise, Anne, Nicole Combe, Carole Boué, Philippe Legrand, Daniel Catheline, Bernadette Delplanque, Evelyne Fénart, Pierre Weille, and Dominique Hermier. 2004. "Dose Effect of α -Linolenic Acid on PUFA Conversion, Bioavailability, and Storage in the Hamster." *Lipids* 39 (4): 325–34. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1236-0>.
- Morrison, W R, and L M Smith. 1964. "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals From Lipids With Boron Fluoride--Methanol." *Journal of Lipid Research* 5 (1 3): 600–608.
- Mu, Hongyan, Jun Jin, Dan Xie, Xiaoqiang Zou, Xiaosan Wang, Xingguo Wang, and Qingzhe Jin. 2016. "Combined Urea Complexation and Argentated Silica Gel Column Chromatography for Concentration and Separation of PUFAs from Tuna Oil: Based on Improved DPA Level." *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 93 (8): 1157–67. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2842-5>.
- Muto, Y, N Shinohara, S Banphotkasem, N Iito, and N Hosoya. 1975. "Effect of Exogenous Polyunsaturated Fatty Acids on Lipogenic Enzyme Activity in Rat Liver under Fixed Carbohydrate Consumption." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 21 (1): 39–47. <https://doi.org/10.3177/jnsv.21.39>.
- Nagao, Koji, Kazusa Nakamitsu, Hiroki Ishida, Kazuaki Yoshinaga, Toshiharu Nagai, Hoyo Mizobe, Koichi Kojima, Teruyoshi Yanagita, Fumiaki Beppu, and Naohiro Gotoh. 2014. "Comparison of the Lipid-Lowering Effects of Four Different n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in HepG2 Cells." *Journal of Oleo Science* 63 (10): 979–85. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14118>.
- Nakamura, M. T., and T. Y. Nara. 2003. "Essential Fatty Acid Synthesis and Its Regulation in Mammals." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68 (2): 145–50. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00264-8).
- Nakamura, Manabu, Yewon Cheon, Yue Li, and Takayuki Nara. 2004. "Mechanisms of Regulation of Gene Expression by Fatty Acids." *Lipids* 39 (11): 1077–83. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1333-0>.
- Nakamura, Manabu T., Barbara E. Yudell, and Juan J. Loor. 2014. "Regulation of Energy Metabolism by Long-Chain Fatty Acids." *Progress in Lipid Research* 53 (1): 124–44. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>.
- Nhmrc. 2005. *Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes. Nutrition*.

- Niculescu, Mihai D., Daniel S. Lupu, and Corneliu N. Craciunescu. 2013. "Perinatal Manipulation of ??-Linolenic Acid Intake Induces Epigenetic Changes in Maternal and Offspring Livers." *FASEB Journal* 27 (1): 350–58. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210724>.
- Norris, Jill M., Miranda Kroehl, Tasha E. Fingerlin, Brittini N. Frederiksen, Jennifer Seifert, Randall Wong, Michael Clare-Salzler, and Marian Rewers. 2014. "Erythrocyte Membrane Docosapentaenoic Acid Levels Are Associated with Islet Autoimmunity: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young." *Diabetologia* 57 (2): 295–304. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3106-7>.
- Novak, E. M., B. O. Keller, and S. M. Innis. 2012. "Metabolic Development in the Liver and the Implications of the N-3 Fatty Acid Supply." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (2): G250–59. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00189.2011>.
- NRC. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.17226/4758>.
- Ntambi, James M. 1999. "Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase by Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol." *Journal of Lipid Research* 40 (9): 1549–58. <http://www.jlr.org/content/40/9/1549.long%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484602>.
- Oboh, Angela, Naoki Kabeya, Greta Carmona-Antoñanzas, L. Filipe C. Castro, James R. Dick, Douglas R. Tocher, and Oscar Monroig. 2017. "Two Alternative Pathways for Docosahexaenoic Acid (DHA, 22:6n-3) Biosynthesis Are Widespread among Teleost Fish." *Scientific Reports* 7 (1): 3889. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04288-2>.
- Oda, Eiji, Katsuharu Hatada, Jun Kimura, Yoshifusa Aizawa, Punniyakoti Veeraveedu Thanikachalam, and Kenichi Watanabe. 2005. "Relationships between Serum Unsaturated Fatty Acids and Coronary Risk Factors: Negative Relations between Nervonic Acid and Obesity-Related Risk Factors." *International Heart Journal* 46 (6): 975–85. <https://doi.org/JST.JSTAGE/ihj/46.975> [pii].
- Oh, Chan Seok, David A. Toke, Suzanne Mandala, and Charles E. Martin. 1997. "ELO2 and ELO3, Homologues of the Saccharomyces Cerevisiae ELO1 Gene, Function in Fatty Acid Elongation and Are Required for Sphingolipid Formation." *Journal of Biological Chemistry* 272 (28): 17376–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17376>.
- Okuno, Masataka, Kenta Kajiwarra, Shoko Imai, Tetsuo Kobayashi, Nobuko Honma, Toshio Maki, Kazuhito Suruga, et al. 1997. "Perilla Oil Prevents the Excessive Growth of Visceral Adipose Tissue in Rats by Down-Regulating Adipocyte Differentiation." *Journal of Nutrition* 126 (10): 1752–57. <https://doi.org/10.1093/jn/127.9.1752>.
- Organization, World Health. 1995. "The World Health Organization's Infant Feeding Recommendation." *Weekly Epidemiological Record* 70: 119–20. http://www.who.int/nutrition/topics/infantfeeding_recommendation/en/.
- Osei, P., S. K. Suneja, J. C. Laguna, M. N. Nagi, L. Cook, M. Renuka Prasad, and D. L. Cinti. 1989. "Topography of Rat Hepatic Microsomal Enzymatic Components of the Fatty Acid Chain Elongation System." *Journal of Biological Chemistry* 264 (12): 6844–49. <http://www.jbc.org/content/264/12/6844.full.pdf>.
- Osmundsen, H, and K Bjørnstad. 1985. "Inhibitory Effects of Some Long-Chain Unsaturated Fatty Acids on Mitochondrial Beta-Oxidation. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on Mitochondrial Beta-Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids." *The Biochemical Journal* 230 (2): 329–37. <http://www.biochemj.org/bj/230/0329/2300329.pdf>.
- Paganelli, Franck, Jean Michel Maixent, Marie Josée Duran, Robert Parhizgar, Gérard Pieroni, and Souad Sennoune. 2001. "Altered Erythrocyte N-3 Fatty Acids in Mediterranean Patients with Coronary Artery Disease." *International Journal of Cardiology* 78 (1): 27–32.

[https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(00\)00442-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(00)00442-3).

- Paillard, François, Daniel Catheline, Franck Le Duff, Monique Bouriel, Yves Deugnier, Michel Pouchard, Jean Claude Daubert, and Philippe Legrand. 2008. "Plasma Palmitoleic Acid, a Product of Stearoyl-CoA Desaturase Activity, Is an Independent Marker of Triglyceridemia and Abdominal Adiposity." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18 (6): 436–40. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.02.017>.
- Pan, Yijun, Hanan Khalil, and Joseph A Nicolazzo. 2015. "The Impact of Docosahexaenoic Acid on Alzheimer's Disease: Is There a Role of the Blood-Brain Barrier?" *Current Clinical Pharmacology* 10 (10): 222–41. <https://doi.org/10.2174/157488471003150820151532>.
- Park, Hui Gyu, Matthew G. Engel, Kyle Vogt-Lowell, Peter Lawrence, Kumar S. Kothapalli, and J. Thomas Brenna. 2018. "The Role of Fatty Acid Desaturase (FADS) Genes in Oleic Acid Metabolism: FADS1 $\Delta 7$ Desaturates 11-20:1 to 7,11-20:2." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 128 (November 2017): 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.11.004>.
- Park, Hui Gyu, Woo Jung Park, Kumar S.D. Kothapalli, and J. Thomas Brenna. 2015. "The Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2) Gene Product Catalyzes $\Delta 4$ Desaturation to Yield n-3 Docosahexaenoic Acid and n-6 Docosapentaenoic Acid in Human Cells." *FASEB Journal*. September 2015. <https://doi.org/10.1096/fj.15-271783>.
- Park, Woo Jung, Kumar S. D. Kothapalli, Peter Lawrence, Cynthia Tyburczy, and J. Thomas Brenna. 2009. "An Alternate Pathway to Long-Chain Polyunsaturates: The FADS2 Gene Product $\Delta 8$ -Desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3." *Journal of Lipid Research* 50 (6): 1195–1202. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800630-JLR200>.
- Park, Woo Jung, Kumar S. D. Kothapalli, Holly T. Reardon, Peter Lawrence, Shu-Bing Qian, and J. Thomas Brenna. 2012. "A Novel FADS1 Isoform Potentiates FADS2 -Mediated Production of Eicosanoid Precursor Fatty Acids." *Journal of Lipid Research* 53 (8): 1502–12. <https://doi.org/10.1194/jlr.M025312>.
- Park, Woo Jung, Kumar S D Kothapalli, Peter Lawrence, and J. Thomas Brenna. 2011. "FADS2 Function Loss at the Cancer Hotspot 11q13 Locus Diverts Lipid Signaling Precursor Synthesis to Unusual Eicosanoid Fatty Acids." Edited by Daniel Tomé. *PLoS ONE* 6 (11): e28186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028186>.
- Paton, C. M., and J. M. Ntambi. 2009. "Biochemical and Physiological Function of Stearoyl-CoA Desaturase." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 297 (1): E28–37. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90897.2008>.
- Pawar, Anjali, and Donald B. Jump. 2003. "Unsaturated Fatty Acid Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor?? Activity in Rat Primary Hepatocytes." *Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 35931–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306238200>.
- Pawlosky, Robert, Joseph Hibbeln, Yuhong Lin, and Norman Salem. 2003. "N-3 Fatty Acid Metabolism in Women." *The British Journal of Nutrition* 90 (5): 993–95. <https://doi.org/10.1079/BJN2003985>.
- Pawlosky, Robert J, Joseph R Hibbeln, and Norman Salem. 2007. "Compartmental Analyses of Plasma N-3 Essential Fatty Acids among Male and Female Smokers and Nonsmokers." *Journal of Lipid Research* 48 (4): 935–43. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600310-JLR200>.
- Pédrono, Frédérique, Hélène Blanchard, Maela Kloareg, Sabine D'andréa, Stéphanie Daval, Vincent Rioux, and Philippe Legrand. 2010. "The Fatty Acid Desaturase 3 Gene Encodes for Different FADS3 Protein Isoforms in Mammalian Tissues." *Journal of Lipid Research* 51 (3): 472–79. <https://doi.org/10.1194/jlr.M000588>.
- Pereira, Suzette L., Amanda E. Leonard, and Pradip Mukerji. 2003. "Recent Advances in the Study of Fatty Acid Desaturases from Animals and Lower Eukaryotes." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68 (2): 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00259-4).

- Perkins, Neil D. 2007. "Integrating Cell-Signalling Pathways with NF-KB and IKK Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (1): 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>.
- Phang, M., L. F. Lincz, and M. L. Garg. 2013. "Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid Supplementations Reduce Platelet Aggregation and Hemostatic Markers Differentially in Men and Women." *Journal of Nutrition* 143 (4): 457–63. <https://doi.org/10.3945/jn.112.171249>.
- Phang, Melinda, Manohar L. Garg, and Andrew J. Sinclair. 2009. "Inhibition of Platelet Aggregation by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Is Gender Specific-Redefining Platelet Response to Fish Oils." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81 (1): 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.001>.
- Phillips, Michael C. 2013. "New Insights into the Determination of HDL Structure by Apolipoproteins." *Journal of Lipid Research* 54 (8): 2034–48. <https://doi.org/10.1194/jlr.R034025>.
- Pinto, T. J. P., A. A. F. Vilela, D. R. Farias, J. Lepsch, G. M. Cunha, J. S. Vaz, P. Factor-Litvak, and G. Kac. 2017. "Serum N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Are Inversely Associated with Longitudinal Changes in Depressive Symptoms during Pregnancy." *Epidemiology and Psychiatric Sciences* 26 (02): 157–68. <https://doi.org/10.1017/S204579601500116X>.
- Pistorius, Kimberly, Patricia R. Souza, Roberta De Matteis, Shani Austin-Williams, Karoline G. Primdahl, Anders Vik, Francesca Mazzacuva, et al. 2018. "PDn-3 DPAPathway Regulates Human Monocyte Differentiation and Macrophage Function." *Cell Chemical Biology* 25 (6): 749–760.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.04.017>.
- Plourde, Mélanie, Raphaël Chouinard-Watkins, Milène Vandal, Ying Zhang, Peter Lawrence, J. Thomas Brenna, and Stephen C. Cunnane. 2011. "Plasma Incorporation, Apparent Retroconversion and β -Oxidation Of¹³C-Docosahexaenoic Acid in the Elderly." *Nutrition and Metabolism* 8 (January): 5. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-5>.
- Poirier, Yves, Vasily D. Antonenkov, Tuomo Glumoff, and J. Kalervo Hiltunen. 2006. "Peroxisomal β -Oxidation-A Metabolic Pathway with Multiple Functions." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Peroxisomes: Morphology, Function, Biogenesis and Disorders, 1763 (12): 1413–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.034>.
- Portolesi, Roxanne, Barry C. Powell, and Robert A. Gibson. 2007. "Competition between 24:5n-3 and ALA for Δ 6 Desaturase May Limit the Accumulation of DHA in HepG2 Cell Membranes." *Journal of Lipid Research* 48 (7): 1592–98. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700081-JLR200>.
- Poudyal, Hemant, and Lindsay Brown. 2015. "Should the Pharmacological Actions of Dietary Fatty Acids in Cardiometabolic Disorders Be Classified Based on Biological or Chemical Function?" *Progress in Lipid Research* 59: 172–200. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.07.002>.
- Priego, Teresa, Juana Sánchez, Ana Paula García, Andreu Palou, and Catalina Picó. 2013. "Maternal Dietary Fat Affects Milk Fatty Acid Profile and Impacts on Weight Gain and Thermogenic Capacity of Suckling Rats." *Lipids* 48 (5): 481–95. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3764-8>.
- Primdahl, K.G., Jø.E. Tungen, P.R.S. De Souza, R.A. Colas, J. Dalli, T.V. Hansen, and A. Vik. 2017. "Stereocontrolled Synthesis and Investigation of the Biosynthetic Transformations of 16(S),17(S)-Epoxy-PDⁿ⁻³ DPA</sup>." *Organic and Biomolecular Chemistry* 15 (40): 8606–13. <https://doi.org/10.1039/c7ob02113e>.
- Prostek, Adam, Małgorzata Gajewska, and Bożena Bałasińska. 2016. "The Influence of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Expression of Genes Connected with Metabolism and Secretory Functions of Ageing 3T3-L1 Adipocytes." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 125 (9): 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.04.002>.
- Qawasmi, A., A. Landeros-Weisenberger, and M. H. Bloch. 2013. "Meta-Analysis of LCPUFA Supplementation of Infant Formula and Visual Acuity." *Pediatrics* 131 (1): e262–72. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0517>.

- Qiu, Xiao, Haiping Hong, and Samuel L. MacKenzie. 2001. "Identification of a Δ^4 Fatty Acid Desaturase from *Thraustochytrium* Sp. Involved in the Biosynthesis of Docosahexanoic Acid by Heterologous Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Brassica Juncea*." *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 31561–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102971200>.
- Querques, Giuseppe, Raimondo Forte, and Eric H. Souied. 2011. "Retina and Omega-3." *Journal of Nutrition and Metabolism* 2011 (October): 748361. <https://doi.org/10.1155/2011/748361>.
- Quinn, P. J., F. Joo, and L. Vigh. 1989. "The Role of Unsaturated Lipids in Membrane Structure and Stability." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 53 (2): 71–103. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(89\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0079-6107(89)90015-1).
- Rahm, Joseph J., and Ralph T. Holman. 1964. "Effect of Linoleic Acid upon the Metabolism of Linolenic Acid." *The Journal of Nutrition* 84 (1): 15–19. <http://jn.nutrition.org/content/84/1/15>. <http://jn.nutrition.org/content/84/1/15.full.pdf> <http://jn.nutrition.org/content/84/1/15.long> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14210015>.
- Rahmawaty, Setyaningrum, Karen Charlton, Philippa Lyons-Wall, and Barbara J. Meyer. 2013. "Dietary Intake and Food Sources of EPA, DPA and DHA in Australian Children." *Lipids* 48 (9): 869–77. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3812-4>.
- Rakhshandehroo, Maryam, Bianca Knoch, Michael Müller, and Sander Kersten. 2010. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes." *PPAR Research* 2010 (September): 1–20. <https://doi.org/10.1155/2010/612089>.
- Ran-Ressler, R. R., D. Sim, A. M. O'Donnell-Megaró, D. E. Bauman, D. M. Barbano, and J. T. Brenna. 2011. "Branched Chain Fatty Acid Content of United States Retail Cow's Milk and Implications for Dietary Intake." *Lipids* 46 (7): 569–76. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3530-8>.
- Rapoport, Stanley I. 2013. "Translational Studies on Regulation of Brain Docosahexaenoic Acid (DHA) Metabolism in Vivo." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, The Tenth Fatty Acids and Cell Signalling Meeting (FACS-10)*, 88 (1): 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.05.003>.
- Reddy, Janardan K., and Takashi Hashimoto. 2001. "PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System." *Annual Review of Nutrition* 21 (1): 193–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.193>.
- Redmile-Gordon, M. A., E. Armenise, R. P. White, P. R. Hirsch, and K. W.T. Goulding. 2013. "A Comparison of Two Colorimetric Assays, Based upon Lowry and Bradford Techniques, to Estimate Total Protein in Soil Extracts." *Soil Biology and Biochemistry* 67: 166–73. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.017>.
- Rednicka-Tober, Dominika, Marcin Barański, Chris Seal, Roy Sanderson, Charles Benbrook, Håvard Steinshamn, Joanna Gromadzka-Ostrowska, et al. 2016. "Composition Differences between Organic and Conventional Meat: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis." *British Journal of Nutrition* 115 (6): 994–1011. <https://doi.org/10.1017/S0007114515005073>.
- Reeves, Philip G., Forrest H. Nielsen, and George C. Fahey. 1993. "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet." *The Journal of Nutrition* 123 (11): 1939–51. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>.
- Ren, B, A P Thelen, J M Peters, F J Gonzalez, and D B Jump. 1997. "Polyunsaturated Fatty Acid Suppression of Hepatic Fatty Acid Synthase and S14 Gene Expression Does Not Require Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 26827–32. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.43.26827>.
- Rhee, Jinnie J., Eunjung Kim, Julie E. Buring, and Tobias Kurth. 2017. "Fish Consumption, Omega-3

- Fatty Acids, and Risk of Cardiovascular Disease.” *American Journal of Preventive Medicine* 52 (1): 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2016.07.020>.
- Ricciotti, Emanuela, and Garret A. Fitzgerald. 2011. “Prostaglandins and Inflammation.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5): 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- Riezman, Howard. 2007. “The Long and Short of Fatty Acid Synthesis.” *Cell* 130 (4): 587–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.008>.
- Rimoldi, Omar J., Gabriela S. Finarelli, and Rodolfo R. Brenner. 2001. “Effects of Diabetes and Insulin on Hepatic $\Delta 6$ Desaturase Gene Expression.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (2): 323–26. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4785>.
- Rioux, V., D. Catheline, E. Beauchamp, J. Le Bloc’H, F. Pédrono, and P. Legrand. 2008. “Substitution of Dietary Oleic Acid for Myristic Acid Increases the Tissue Storage of α -Linolenic Acid and the Concentration of Docosahexaenoic Acid in the Brain, Red Blood Cells and Plasma in the Rat.” *Animal* 2 (4): 636–44. <https://doi.org/10.1017/S1751731108001705>.
- Rioux, V., D. Catheline, and P. Legrand. 2007. “In Rat Hepatocytes, Myristic Acid Occurs through Lipogenesis, Palmitic Acid Shortening and Lauric Acid Elongation.” *Animal* 1 (6): 820–26. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000122>.
- Rioux, V, D Catheline, M Bouriel, and P Legrand. 1999. “High Performance Liquid Chromatography of Fatty Acids as Naphthacyl Derivatives.” *Analisis* 27 (2): 186–93. <https://doi.org/10.1051/analisis:1999165>.
- Rioux, V, S Daval, H Guillou, S Jan, and P Legrand. 2003. “Although It Is Rapidly Metabolized in Cultured Rat Hepatocytes, Lauric Acid Is Used for Protein Acylation.” *Reproduction Nutrition Development* 43 (5): 419–30. <https://doi.org/10.1051/Rnd:2003036>.
- Rioux, Vincent, Daniel Catheline, Monique Bouriel, and Philippe Legrand. 2005. “Dietary Myristic Acid at Physiologically Relevant Levels Increases the Tissue Content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the Rat.” *Reproduction, Nutrition, Development* 45 (1): 599–612. <https://doi.org/10.1051/rnd>.
- Rioux, Vincent, Frédérique Pédrono, Hélène Blanchard, Cécile Duby, Nathalie Boulier-Monthéan, Laurence Bernard, Erwan Beauchamp, Daniel Catheline, and Philippe Legrand. 2013. “*Trans* - Vaccenate Is $\Delta 13$ -Desaturated by FADS3 in Rodents.” *Journal of Lipid Research* 54 (12): 3438–52. <https://doi.org/10.1194/jlr.M042572>.
- Rioux, Vincent, Frédérique Pédrono, and Philippe Legrand. 2011. “Regulation of Mammalian Desaturases by Myristic Acid: N-Terminal Myristoylation and Other Modulations.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.09.005>.
- Riséus, Ulf, and Matti Marklund. 2017. “Milk Fat Biomarkers and Cardiometabolic Disease.” *Current Opinion in Lipidology* 28 (1): 46–51. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000381>.
- Rissanen, T., S. Voutilainen, K. Nyyssonen, T. A. Lakka, and J. T. Salonen. 2000. “Fish Oil-Derived Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, and the Risk of Acute Coronary Events: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study.” *Circulation* 102 (22): 2677–79. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.22.2677>.
- Rodriguez, a, P Sarda, C Nessmann, P Boulot, C L Leger, and B Descomps. 1998. “Delta6- and Delta5-Desaturase Activities in the Human Fetal Liver: Kinetic Aspects.” *Journal of Lipid Research* 39 (9): 1825–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741695>.
- Rolland, Valérie, Suzanne Roseau, Gilles Fromentin, Stylianos Nicolaidis, Daniel Tomé, and Patrick C Even. 2002. “Body Weight, Body Composition, and Energy Metabolism in Lean and Obese Zucker Rats Fed Soybean Oil or Butter.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 75 (1): 21–30.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.21>.

- Rosenthal, M D. 1987. "Fatty Acid Metabolism of Isolated Mammalian Cells." *Progress in Lipid Research* 26 (2): 87–124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3310011>.
- Rosenthal, Miriam D., and Jenny R. Hill. 1986. "Elongation of Arachidonic and Eicosapentaenoic Acids Limits Their Availability for Thrombin-Stimulated Release from the Glycerolipids of Vascular Endothelial Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 875 (2): 382–91. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90189-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90189-X).
- Rouzer, Carol A., and Lawrence J. Marnett. 2009. "Cyclooxygenases: Structural and Functional Insights." *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S29–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>.
- Saadatian-elahi, Mitra, Nadia Slimani, Mazda Jenab, Carine Biessy, Pietro Ferrari, Bas Bueno De Mesquita, Ingegerd Johansson, et al. 2009. "Plasma Phospholipid Fatty Acid Profiles and Their Association with Food Intakes: Results from a Cross-Sectional Study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (1): 331–46. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26834.In>.
- Saiz, Leonor, and Michael L. Klein. 2001. "Structural Properties of a Highly Polyunsaturated Lipid Bilayer from Molecular Dynamics Simulations." *Biophysical Journal* 81 (1): 204–16. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75692-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75692-5).
- Salem, Norman, and Manfred Eggersdorfer. 2015. "Is the World Supply of Omega-3 Fatty Acids Adequate for Optimal Human Nutrition?" *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18 (2): 147–54. <https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000145>.
- Salem, Norman, Burton Litman, Hee Yong Kim, and Klaus Gawrisch. 2001. "Mechanisms of Action of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System." *Lipids* 36 (9): 945–59. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0805-6>.
- Salem, Norman, Milene Vandal, and Frederic Calon. 2015. "The Benefit of Docosahexaenoic Acid for the Adult Brain in Aging and Dementia." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 92: 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.003>.
- Samieri, Cécilia, Simon Lorrain, Benjamin Buaud, Carole Vaysse, Claudine Berr, Evelyne Peuchant, Stephen C. Cunnane, and Pascale Barberger-Gateau. 2013. "Relationship between Diet and Plasma Long-Chain n-3 PUFAs in Older People: Impact of Apolipoprotein E Genotype." *Journal of Lipid Research* 54 (9): 2559–67. <https://doi.org/10.1194/jlr.P036475>.
- Sampath, Harini, and James M. Ntambi. 2005. "Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 25 (1): 317–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.051804.101917>.
- SanGiovanni, J P, S Parra-Cabrera, G a Colditz, C S Berkey, and J T Dwyer. 2000. "Meta-Analysis of Dietary Essential Fatty Acids and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids as They Relate to Visual Resolution Acuity in Healthy Preterm Infants." *Pediatrics* 105 (6): 1292–98. <https://doi.org/10.1542/peds.105.6.1292>.
- SanGiovanni, John Paul, and Emily Y. Chew. 2005. "The Role of Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Health and Disease of the Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 24 (1): 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>.
- Schacky, Clemens von, and William S. Harris. 2018. "Why Docosapentaenoic Acid Is Not Included in the Omega-3 Index." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 135 (August): 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.06.003>.
- Schmitz, Gerd, and Josef Ecker. 2008. "The Opposing Effects of N-3 and n-6 Fatty Acids." *Progress in Lipid Research* 47 (2): 147–55. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.12.004>.

- Schuchardt, Jan Philipp, and Andreas Hahn. 2013. "Bioavailability of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.010>.
- Schüller, Ártur Krumberg, Diego Antonio Mena Canata, Fernanda Schäfer Hackenhaar, Vanessa Krüger Engers, Fernanda Maciel Heemann, Jordana Salette Putti, Tiago Boeira Salomon, and Mara Silveira Benfato. 2018. "Effects of Lipoic Acid and N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid on the Liver Ovariectomized Rat Model of Menopause." *Pharmacological Reports* 70 (2): 263–69. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.10.006>.
- Schumacher, T. L., T. L. Burrows, M. E. Rollo, L. G. Wood, R. Callister, and C. E. Collins. 2016. "Comparison of Fatty Acid Intakes Assessed by a Cardiovascular-Specific Food Frequency Questionnaire with Red Blood Cell Membrane Fatty Acids in Hyperlipidaemic Australian Adults: A Validation Study." *European Journal of Clinical Nutrition* 70 (12): 1433–38. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.144>.
- Schwab, Jan M., Nan Chiang, Makoto Arita, and Charles N. Serhan. 2007. "Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programmes." *Nature* 447 (7146): 869–74. <https://doi.org/10.1038/nature05877>.
- Sciences, Behavioural, P G Williams, and V Droulez. 2010. "Australian Red Meat Consumption – Predominantly Lean in Response to Public Health and Consumer Demand" 62 (3): 87–94.
- Seiliez, I., S. Panserat, S. Kaushik, and P. Bergot. 2001. "Cloning, Tissue Distribution and Nutritional Regulation of a $\Delta 6$ -Desaturase-like Enzyme in Rainbow Trout." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 130 (1): 83–93. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00410-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00410-9).
- Sengupta, Pallav. 2013. "The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's." *International Journal of Preventive Medicine*. <https://doi.org/23930179>.
- Serhan, Charles N. 2017. "Discovery of Specialized Pro-Resolving Mediators Marks the Dawn of Resolution Physiology and Pharmacology." *Molecular Aspects of Medicine* 58 (March): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.001>.
- Serhan, Charles N., Jesmond Dalli, Romain A. Colas, Jeremy W. Winkler, and Nan Chiang. 2015. "Protectins and Maresins: New pro-Resolving Families of Mediators in Acute Inflammation and Resolution Bioactive Metabolome." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851 (4): 397–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.006>.
- Serrano-Cinca, Carlos, Yolanda Fuertes-Callén, and Cecilio Mar-Molinero. 2005. "Measuring DEA Efficiency in Internet Companies." *Decision Support Systems* 38 (4): 557–73. <https://doi.org/10.1016/j.dss.2003.08.004>.
- Sessler, a M, N Kaur, J P Palta, and J M Ntambi. 1996. "Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase 1 mRNA Stability by Polyunsaturated Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (47): 29854–58. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.47.29854>.
- Shaikh, Saame Raza, Alfred C. Dumauual, Alicia Castillo, Daniel LoCascio, Rafat A. Siddiqui, William Stillwell, and Stephen R. Wassall. 2004. "Oleic and Docosahexaenoic Acid Differentially Phase Separate from Lipid Raft Molecules: A Comparative NMR, DSC, AFM, and Detergent Extraction Study." *Biophysical Journal* 87 (3): 1752–66. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044552>.
- Shao, Xianrong, Gizem Bor, Sabah Al-Hosayni, Stefan Salentinig, and Anan Yaghmur. 2018. "Structural Characterization of Self-Assemblies of New Omega-3 Lipids: Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Monoglycerides." *Physical Chemistry Chemical Physics* In press. <https://doi.org/10.1039/C8CP04256J>.
- Sheaff Greiner, R C, Q Zhang, K J Goodman, D A Giussani, P W Nathanielsz, and J T Brenna. 1996. "Linoleate, Alpha-Linolenate, and Docosahexaenoate Recycling into Saturated and

- Monounsaturated Fatty Acids Is a Major Pathway in Pregnant or Lactating Adults and Fetal or Infant Rhesus Monkeys.” *Journal of Lipid Research* 37 (12): 2675–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9017518>.
- Shindou, Hideo, Hideto Koso, Junko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Hiroshi Sagara, Koh M. Nakagawa, Yoshikazu Takahashi, et al. 2017. “Docosahexaenoic Acid Preserves Visual Function by Maintaining Correct Disc Morphology in Retinal Photoreceptor Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 292 (29): 12054–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790568>.
- Simmer, Karen, Sanjay Patole, and Shripada C Rao. 2008. “Longchain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Infants Born at Term.” In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000376.pub2>.
- Simopoulos, A. P., A. Leaf, and N. Salem. 2000. “Workshop Statement on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 63 (3): 119–21. <https://doi.org/10.1054/plf.2000.0176>.
- Sinclair, Andrew J, Nadia M Attar-Bashi, and Duo Li. 2002. “What Is the Role of Alpha-Linolenic Acid for Mammals?” *Lipids* 37 (12): 1113–23. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-1008-x>.
- Singh, Gulab, and S. K. Patidar. 2018. “Microalgae Harvesting Techniques: A Review.” *Journal of Environmental Management* 217 (July): 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
- Singh, N., S. J. Wakil, and J. K. Stoops. 1984. “On the Question of Half- or Full-Site Reactivity of Animal Fatty Acid Synthetase.” *Journal of Biological Chemistry* 259 (6): 3605–11.
- SINHA, K. P., A. SARAN, and A. S. SINHA. 1959. “Composition of Human Milk.” *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 3 (3): 173–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/392766>.
- Skinner, E R, C Watt, J A Besson, and P V Best. 1993. “Differences in the Fatty Acid Composition of the Grey and White Matter of Different Regions of the Brains of Patients with Alzheimer’s Disease and Control Subjects.” *Brain* 116 (Pt 3 (0006-8950): 717–25. <https://doi.org/10.1093/brain/116.3.717>.
- Skrzypski, Jérémy, Sandrine Bellenger, Jérôme Bellenger, Andrew Sinclair, Jean Pierre Poisson, Christian Tessier, Mickaël Riolland, and Michel Narce. 2009. “Revisiting Delta-6 Desaturase Regulation by C18 Unsaturated Fatty Acids, Depending on the Nutritional Status.” *Biochimie* 91 (11–12): 1443–49. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.08.001>.
- Skulas-Ray, Ann C., Michael R. Flock, Chesney K. Richter, William S. Harris, Sheila G. West, and Penny M. Kris-Etherton. 2015. “Red Blood Cell Docosapentaenoic Acid (DPA n-3) Is Inversely Associated with Triglycerides and C-Reactive Protein (CRP) in Healthy Adults and Dose-Dependently Increases Following n-3 Fatty Acid Supplementation.” *Nutrients* 7 (8): 6390–6404. <https://doi.org/10.3390/nu7085291>.
- Söderberg, M., C. Edlund, K. Kristensson, and G. Dallner. 1991. “Fatty Acid Composition of Brain Phospholipids in Aging and in Alzheimer’s Disease.” *Lipids* 26 (6): 421–25. <https://doi.org/10.1007/BF02536067>.
- Sophie JAN, Hervé GUILLOU, Sabine D’ANDREA, Stéphanie DAVAL, Monique BOURIEL, Vincent RIOUX, Philippe LEGRAND. 2004. “Myristic Acid Increases Δ 6-Desaturase Activity in Cultured Rat Hepatocytes.” *Reproduction, Nutrition, Development* 44 (6): 89–98. <https://doi.org/10.1051/rnd>.
- Souied, Eric H., Tariq Aslam, Alfredo Garcia-Layana, Frank G. Holz, Anita Leys, Rufino Silva, and Cécile Delcourt. 2016. “Omega-3 Fatty Acids and Age-Related Macular Degeneration.” *Ophthalmic Research* 55 (2): 62–69. <https://doi.org/10.1159/000441359>.
- Spady, D K, L A Woollett, and J M Dietschy. 1993. “Regulation of Plasma LDL-Cholesterol Levels by Dietary Cholesterol and Fatty Acids.” *Annual Review of Nutrition* 13 (1): 355–81.

<https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.002035>.

- Sprecher, H. 2002. "The Roles of Anabolic and Catabolic Reactions in the Synthesis and Recycling of Polyunsaturated Fatty Acids." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 67 (2–3): 79–83. <https://doi.org/10.1054/plef.2002.0402>.
- Sprecher, Howard. 2000. "Metabolism of Highly Unsaturated N-3 and n-6 Fatty Acids." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486 (2–3): 219–31. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00077-9).
- Stahl, Andreas. 2004. "A Current Review of Fatty Acid Transport Proteins (SLC27)." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5): 722–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1106-z>.
- Stampfer, M. J. 2006. "Cardiovascular Disease and Alzheimer's Disease: Common Links." *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01687.x>.
- Stark, Ken D., Juan J. Aristizabal Henao, Adam H. Metherel, and Louise Pilote. 2016. "Translating Plasma and Whole Blood Fatty Acid Compositional Data into the Sum of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid in Erythrocytes." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 104 (January): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.11.002>.
- Stark, Ken D., Mary E. Van Elswyk, M. Roberta Higgins, Charli A. Weatherford, and Norman Salem. 2016. "Global Survey of the Omega-3 Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid in the Blood Stream of Healthy Adults." *Progress in Lipid Research* 63: 132–52. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.001>.
- Stillwell, William, and Stephen R. Wassall. 2003. "Docosahexaenoic Acid: Membrane Properties of a Unique Fatty Acid." *Chemistry and Physics of Lipids* 126 (1): 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4).
- Stinson, Ann M., Rex D. Wiegand, and Robert E. Anderson. 1991. "Fatty Acid and Molecular Species Compositions of Phospholipids and Diacylglycerols from Rat Retinal Membranes." *Experimental Eye Research* 52 (2): 213–18. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(91\)90261-C](https://doi.org/10.1016/0014-4835(91)90261-C).
- Stoffel, Wilhelm, Wolfgang Ecker, Hatem Assad, and Howard Sprecher. 1970. "Enzymatic Studies on the Mechanism of the Retroconversion of C22-Polyenoic Fatty Acids to Their C20-Homologues." *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 351 (2): 1545–54. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1970.351.2.1545>.
- Strittmatter, P, L Spatz, D Corcoran, M J Rogers, B Setlow, and R Redline. 1974. "Purification and Properties of Rat Liver Microsomal Stearyl Coenzyme A Desaturase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (11): 4565–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.11.4565>.
- Stubbs, C D, and A D Smith. 1990. "Essential Fatty Acids in Membrane: Physical Properties and Function." *Biochemical Society Transactions* 18 (5): 779–81. <https://doi.org/10.1042/bst0180779>.
- Su, H M, L Bernardo, M Mirmiran, X H Ma, P W Nathanielsz, and J T Brenna. 1999. "Dietary 18:3n-3 and 22:6n-3 as Sources of 22:6n-3 Accretion in Neonatal Baboon Brain and Associated Organs." *Lipids* 34 Suppl: S347-50. <https://doi.org/10.1007/BF02562339>.
- Su, Hui Min, Luca Bernardo, Majid Mirmiran, Xiao Hong Ma, Thomas N. Corso, Peter W. Nathanielsz, and J. Thomas Brenna. 1999. "Bioequivalence of Dietary α -Linolenic and Docosahexaenoic Acids as Sources of Docosahexaenoate Accretion in Brain and Associated Organs of Neonatal Baboons." *Pediatric Research* 45 (1): 87–93. <https://doi.org/10.1203/00006450-199901000-00015>.
- Su, Hui Min, Ann B. Moser, Hugo W. Moser, and Paul A. Watkins. 2001. "Peroxisomal Straight-Chain Acyl-CoA Oxidase and D-Bifunctional Protein Are Essential for the Retroconversion Step in Docosahexaenoic Acid Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38115–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106326200>.

- Subbaiah, Papasani V., Karigowda J. Dammanahalli, Peng Yang, Jian Bi, and J. Michael O'Donnell. 2016. "Enhanced Incorporation of Dietary DHA into Lymph Phospholipids by Altering Its Molecular Carrier." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861 (8): 723–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.05.002>.
- Sugasini, Dhavamani, Riya Thomas, Poorna C.R. Yalagala, Leon M. Tai, and Papasani V. Subbaiah. 2017. "Dietary Docosahexaenoic Acid (DHA) as Lysophosphatidylcholine, but Not as Free Acid, Enriches Brain DHA and Improves Memory in Adult Mice." *Scientific Reports* 7 (1): 11263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11766-0>.
- Sukemori, S., S. Ikeda, Y. Kurihara, and S. Ito. 2003. "Amino Acid, Mineral and Vitamin Levels in Hydrous Faeces Obtained from Coprophagy-Prevented Rats." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87 (5–6): 213–20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00415.x>.
- Sun, Grace Y., Agnes Simonyi, Kevin L. Fritsche, Dennis Y. Chuang, Mark Hannink, Zezong Gu, C. Michael Greenlief, Jeffrey K. Yao, James C. Lee, and David Q. Beversdorf. 2016. "Docosahexaenoic Acid (DHA): An Essential Nutrient and a Nutraceutical for Brain Health and Diseases." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.03.006>.
- Szanto, Attila, and Laszlo Nagy. 2008. "The Many Faces of PPAR γ : Anti-Inflammatory by Any Means?" *Immunobiology* 213 (9–10): 789–803. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.015>.
- Taha, Ameer Y., Yewon Cheon, Kaizong Ma, Stanley I. Rapoport, and Jagadeesh S. Rao. 2013. "Altered Fatty Acid Concentrations in Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients." *Journal of Psychiatric Research* 47 (5): 636–43. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.01.016>.
- Takeuchi, Hiroyuki, Keiichi Kojima, Seiji Sekine, Yoshihiro Murano, and Toshiaki Aoyama. 2008. "Effect of Dietary N-6/n-3 Ratio on Liver n-6/n-3 Ratio and Peroxisomal Beta-Oxidation Activity in Rats." *Journal of Oleo Science* 57 (12): 649–57. <https://doi.org/10.5650/jos.57.649>.
- Tanaka, Satohiro, and Toshiaki Yaguchi. 1997. Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid. Patent-WO1998003671. *WO Patent 1,998,003,671*, issued 1997.
- Tanaka, Satohiro, Toshiaki Yaguchi, Sakayu Shimizu, Tsutomu Sogo, and Shigeaki Fujikawa. 2003. United States Patent. Patent-US 6509178 B1, issued 2003.
- Tapiero, H., G. Nguyen Ba, P. Couvreur, and K. D. Tew. 2002. "Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) and Eicosanoids in Human Health and Pathologies." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56 (5): 215–22. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00193-2).
- Ternes, Philipp, Stephan Franke, Ulrich Zähringer, Petra Sperling, and Ernst Heinz. 2002. "Identification and Characterization of a Sphingolipid Δ 4-Desaturase Family." *Journal of Biological Chemistry* 277 (28): 25512–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202947200>.
- Thies, Frank, Jennifer M.C. Garry, Parveen Yaqoob, Kittipan Rerkasem, Jennifer Williams, Cliff P. Shearman, Patrick J. Gallagher, Philip C. Calder, and Robert F. Grimble. 2003. "Association of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids with Stability of Atherosclerotic Plaques: A Randomised Controlled Trial." *Lancet* 361 (9356): 477–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12468-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12468-3).
- Tian, Yanzhu, Ami Katsuki, Donato Romanazzi, Matthew R. Miller, Serean L. Adams, Kazuo Miyashita, and Masashi Hosokawa. 2017. "Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) Downregulates MRNA Expression of Pro-Inflammatory Factors InLPS-Activated Murine Macrophage Like RAW264.7 Cells." *Journal of Oleo Science*. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17111>.
- Tian, Yanzhu, Donato Romanazzi, Kazuo Miyashita, and Masashi Hosokawa. 2016. "Bioconversion of Docosapentaenoic Acid in Human Cell Lines, Caco-2, HepG2, and THP-1." *Journal of Oleo Science* 65 (12): 1017–22. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16128>.
- Tikhonenko, Maria, Todd A. Lydic, Madalina Opreanu, Sergio Li Calzi, Svetlana Bozack, Kelly M.

- McSorley, Andrew L. Sochacki, et al. 2013. "N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Diabetic Retinopathy by Inhibition of Retinal Vascular Damage and Enhanced Endothelial Progenitor Cell Reparative Function." Edited by Gian Paolo Fadini. *PLoS ONE* 8 (1): e55177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055177>.
- Tinoco, J. 1982. "~ -Linolenic Acid in Animals" 21.
- Toke, David A., and Charles E. Martin. 1996. "Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 271 (31): 18413–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18413>.
- Tonon, Thierry, David Harvey, Tony R. Larson, and Ian A. Graham. 2003. "Identification of a Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Δ 4-Desaturase from the Microalga *Pavlova Lutheri*." *FEBS Letters* 553 (3): 440–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01078-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01078-0).
- Toral, P.G., G. Hervás, H. Leskinen, K.J. Shingfield, and P. Frutos. 2018. "In Vitro Ruminant Biohydrogenation of Eicosapentaenoic (EPA), Docosapentaenoic (DPA), and Docosahexaenoic Acid (DHA) in Cows and Ewes: Intermediate Metabolites and Pathways." *Journal of Dairy Science* 101 (7): 6109–21. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14183>.
- Tortosa-Caparrós, Esther, Diana Navas-Carrillo, Francisco Marín, and Esteban Orenes-Piñero. 2017. "Anti-Inflammatory Effects of Omega 3 and Omega 6 Polyunsaturated Fatty Acids in Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (16): 3421–29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126549>.
- Tosi, Federica, Filippo Sartori, Patrizia Guarini, Oliviero Olivieri, and Nicola Martinelli. 2014. "Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 824:61–81. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-7320-0_7.
- Tou, Janet C., Stephanie N. Altman, Joseph C. Gigliotti, Vagner A. Benedito, and Elizabeth L. Cordonier. 2011. "Different Sources of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Affects Apparent Digestibility, Tissue Deposition, and Tissue Oxidative Stability in Growing Female Rats." *Lipids in Health and Disease* 10 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-179>.
- Trautwein, Elke A., Dörte Rieckhoff, Angelika Kunath-Rau, and Helmut F. Erbersdobler. 1999. "Replacing Saturated Fat with PUFA-Rich (Sunflower Oil) or MUFA-Rich (Rapeseed, Olive and High-Oleic Sunflower Oil) Fats Resulted in Comparable Hypocholesterolemic Effects in Cholesterol-Fed Hamsters." *Annals of Nutrition and Metabolism* 43 (3): 159–72. <https://doi.org/10.1159/000012782>.
- Tressou, J, S Pasteau, S Darrigo Dartinet, N Simon, and C Le Guillou. 2016. "Lipid Consumption and Functionality: New Perspectives." *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 2 (3).
- Truswell, A. S., and N. Choudhury. 1998. "Monounsaturated Oils Do Not All Have the Same Effect on Plasma Cholesterol." *European Journal of Clinical Nutrition* 52 (5): 312–15. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600566>.
- Tsuji, M, S Murota, I Morita - Prostaglandins, leukotrienes and essential Fatty, and Undefined 2003. 2003. "Docosapentaenoic Acid (22: 5, n-3) Suppressed Tube-Forming Activity in Endothelial Cells Induced by Vascular Endothelial Growth Factor." *Elsevier* 68 (5): 337–42. [https://doi.org/10.1016/s0952-3278\(03\)00025-5](https://doi.org/10.1016/s0952-3278(03)00025-5).
- Tu, W. C., R. J. Cook-Johnson, M. J. James, B. S. Mühlhäusler, and R. A. Gibson. 2010. "Omega-3 Long Chain Fatty Acid Synthesis Is Regulated More by Substrate Levels than Gene Expression." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 83 (2): 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.04.001>.
- Tu, W. C., B. S. Mühlhäusler, L. N. Yelland, and R. A. Gibson. 2013. "Correlations between Blood and Tissue Omega-3 LCPUFA Status Following Dietary ALA Intervention in Rats." *Prostaglandins*

- Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, The Tenth Fatty Acids and Cell Signalling Meeting (FACS-10), 88 (1): 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.04.005>.
- Tungen, Jørn Eivind, Marius Aursnes, Jesmond Dalli, Hildur Arnardottir, Charles Nicholas Serhan, and Trond Vidar Hansen. 2014. “Total Synthesis of the Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Lipid Mediator MaR1 $n-3$ DPA Utilizing an Sp^3 - Sp^3 Negishi Cross-Coupling Reaction.” *Chemistry - A European Journal* 20 (45): 14575–78. <https://doi.org/10.1002/chem.201404721>.
- Turck, Dominique, Kim F. Michaelsen, Raanan Shamir, Christian Braegger, Cristina Campoy, Virginie Colomb, Tamás Decsi, et al. 2013. “World Health Organization 2006 Child Growth Standards and 2007 Growth Reference Charts: A Discussion Paper by the Committee on Nutrition of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57 (2): 258–64. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318298003f>.
- Turk, Harmony F, and Robert S Chapkin. 2013. “Membrane Lipid Raft Organization Is Uniquely Modified by N-3 Polyunsaturated Fatty Acids.” *National Institute of Health* 88 (1): 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.03.008>. Membrane.
- Tvrđik, P, R Westerberg, S Silve, A Asadi, A Jakobsson, B Cannon, G Loison, and A Jacobsson. 2000. “Role of a New Mammalian Gene Family in the Biosynthesis of Very Long Chain Fatty Acids and Sphingolipids.” *The Journal of Cell Biology* 149 (3): 707–18. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.3.707>.
- Uauy, Ricardo, Dennis R. Hoffman, Patricio Peirano, David G. Birch, and Eileen E. Birch. 2001. “Essential Fatty Acids in Visual and Brain Development.” *Lipids* 36 (9): 885–95. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0798-1>.
- Uauy, Ricardo, Dennis R Hoffman, Patricia Mena, Adolfo Llanos, and Eileen E Birch. 2003. “Term Infant Studies of DHA and ARA Supplementation on Neurodevelopment: Results of Randomized Controlled Trials.” *The Journal of Pediatrics* 143 (03): S17–25. [https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00398-6](https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00398-6).
- Uenishi, Kazuhiro. 2007. “Dietary Reference Intakes for Japanese, 2005.” *Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 48 (4): J268–72.
- Utsunomiya, Akihiro, Yuji Owada, Takashi Yoshimoto, and Hisatake Kondo. 1997. “Localization of MRNA for Fatty Acid Transport Protein in Developing and Mature Brain of Rats.” *Molecular Brain Research* 46 (1–2): 217–22. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(96\)00303-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00303-8).
- Vallièrès, Cindy, Sara L. Holland, and Simon V. Avery. 2017. Mitochondrial Ferredoxin Determines Vulnerability of Cells to Copper Excess. *Cell Chemical Biology*, issued 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.005>.
- Vellas, B, I Carrie, S Gillette-Guyonnet, J Touchon, T Dantoine, J F Dartigues, M N Cuffi, et al. 2014. “Mapt Study: A Multidomain Approach for Preventing Alzheimer’s Disease: Design and Baseline Data.” *The Journal of Prevention of Alzheimer’s Disease* 1 (1): 13–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594639> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4652787>.
- Vik, Anders, Jesmond Dalli, and Trond Vidar Hansen. 2017. “Recent Advances in the Chemistry and Biology of Anti-Inflammatory and Specialized pro-Resolving Mediators Biosynthesized from n-3 Docosapentaenoic Acid.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27 (11): 2259–66. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.079>.
- Voss, A., M. Reinhart, S. Sankarappa, and H. Sprecher. 1991. “The Metabolism of 7,10,13,16,19-Docosapentaenoic Acid to 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid in Rat Liver Is Independent of a 4-Desaturase.” *Journal of Biological Chemistry* 266 (30): 19995–0. <http://www.jbc.org/content/266/30/19995>.
- Wakil, Ammar, Grahame MacKenzie, Alberto Diego-Taboada, J. Gordon Bell, and Stephen L. Atkin.

2010. "Enhanced Bioavailability of Eicosapentaenoic Acid from Fish Oil after Encapsulation within Plant Spore Exines as Microcapsules." *Lipids* 45 (7): 645–49. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3427-y>.
- Wakil, S J, J K Stoops, and V C Joshi. 1983. "Fatty Acid Synthesis and Its Regulation." *Annual Review of Biochemistry* 52 (1): 537–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.002541>.
- Walker, Celia G., Susan A. Jebb, and Philip C. Calder. 2013. "Stearidonic Acid as a Supplemental Source of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids to Enhance Status for Improved Human Health." *Nutrition* 29 (2): 363–69. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.003>.
- Wanders, Ronald J.A., Jasper Komen, and Stephan Kemp. 2011. "Fatty Acid Omega-Oxidation as a Rescue Pathway for Fatty Acid Oxidation Disorders in Humans." *FEBS Journal* 278 (2): 182–94. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07947.x>.
- Wanders, Ronald J.A., and Hans R. Waterham. 2006. "Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited." *Annual Review of Biochemistry* 75 (1): 295–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>.
- Wang, Xiaosan, Xiaohan Wang, Wei Wang, Qingzhe Jin, and Xingguo Wang. 2018. "Synthesis of Docosapentaenoic Acid-Enriched Diacylglycerols by Enzymatic Glycerolysis of Schizochytrium Sp. Oil." *Bioresource Technology* 262: 278–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.061>.
- Wang, Yun, Daniela Botolin, Barbara Christian, Julia Busik, Jinghua Xu, and Donald B. Jump. 2005. "Tissue-Specific, Nutritional, and Developmental Regulation of Rat Fatty Acid Elongases." *Journal of Lipid Research* 46 (4): 706–15. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400335-JLR200>.
- Wang, Yun, Daniela Botolin, Jinghua Xu, Barbara Christian, Ernestine Mitchell, Bolleddula Jayaprakasam, Muraleedharan Nair, et al. 2006. "Regulation of Hepatic Fatty Acid Elongase and Desaturase Expression in Diabetes and Obesity." *Journal of Lipid Research* 47 (9): 2028–41. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600177-JLR200>.
- Ward, Owen P., and Ajay Singh. 2005. "Omega-3/6 Fatty Acids: Alternative Sources of Production." *Process Biochemistry* 40 (12): 3627–52. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>.
- Wassall, Stephen R., and William Stillwell. 2009. "Polyunsaturated Fatty Acid-Cholesterol Interactions: Domain Formation in Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788 (1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.011>.
- Weill, Pierre, Bernard Schmitt, Guillaume Chesneau, Norohanta Daniel, Faouzi Saфраou, and Philippe Legrand. 2002. "Effects of Introducing Linseed in Livestock Diet on Blood Fatty Acid Composition of Consumers of Animal Products." *Annals of Nutrition and Metabolism* 46 (5): 182–91. <https://doi.org/10.1159/000065405>.
- Weylandt, Karsten H. 2016. "Docosapentaenoic Acid Derived Metabolites and Mediators – The New World of Lipid Mediator Medicine in a Nutshell." *European Journal of Pharmacology, Immunopharmacology of fatty acids*, 785: 108–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.002>.
- Whelan, J., J. Gouffon, and Y. Zhao. 2012. "Effects of Dietary Stearidonic Acid on Biomarkers of Lipid Metabolism." *Journal of Nutrition* 142 (3): 630S–634S. <https://doi.org/10.3945/jn.111.149138>.
- Whelan, Jay, and Cheryl Rust. 2006. "Innovative Dietary Sources of N-3 Fatty Acids." *Annual Review of Nutrition* 26 (1): 75–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092605>.
- Wiklund, Susanne, Erik Johansson, Lina Sjöström, Ewa J. Mellerowicz, Ulf Edlund, John P. Shockcor, Johan Gottfries, Thomas Moritz, and Johan Trygg. 2008. "Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models." *Analytical Chemistry* 80 (1): 115–22. <https://doi.org/10.1021/ac0713510>.
- Williams, Michael. 2009. *Unsaturated Fatty Acid: Structure & Example | Study.Com*. Study.com.

<https://study.com/academy/lesson/unsaturated-fatty-acid-structure-example.html>.

- Williams, P.a, V.a Droulez, G.a Levy, and T.b Stobaus. 2007. "Composition of Australian Red Meat 2002 3. Nutrient Profile." *Food Australia* 59 (7): 331–41.
- Williard, D. E., S. D. Harmon, T. L. Kaduce, and A. A. Spector. 2002. "Comparison of 20-, 22-, and 24-Carbon n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acid Utilization in Differentiated Rat Brain Astrocytes." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 67 (2–3): 99–104. <https://doi.org/10.1054/plef.2002.0405>.
- Wolff, Robert L., Corinne C. Bayard, and Robert J. Fabien. 1995. "Evaluation of Sequential Methods for the Determination of Butterfat Fatty Acid Composition with Emphasis on Trans-18:1 Acids. Application to the Study of Seasonal Variations in French Butters." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (12): 1471–83. <https://doi.org/10.1007/BF02577840>.
- World Health Organization. 2008. "Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Report of an Expert Consultation." *FAO Food and Nutrition Paper* 91: 180. <https://doi.org/10.11953E/1/11.10>.
- Wymelbeke, Virginie Van, Jeanine Louis-Sylvestre, and Marc Fantino. 2001. "Substrate Oxidation and Control of Food Intake in Men after a Fat-Substitute Meal Compared with Meals Supplemented with an Isoenergetic Load of Carbohydrate, Long-Chain Triacylglycerols, or Medium-Chain Triacylglycerols." *American Journal of Clinical Nutrition* 74 (5): 620–30. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.5.620>.
- Xu, Jiayi, Nathan C. Gaddis, Traci M Bartz, Ruixue Hou, Ani W Manichaikul, Nathan Pankratz, Albert V. Smith, et al. 2018. "Omega-3 Fatty Acids and Genome-Wide Interaction Analyses Reveal *DPP10* -Pulmonary Function Association." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, September, rccm.201802-0304OC. <https://doi.org/10.1164/rccm.201802-0304OC>.
- Xu, Jing, Manabu T. Nakamura, Hyekyung P. Cho, and Steven D. Clarke. 1999. "Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 Expression Is Suppressed by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids. A Mechanism for the Coordinate Suppression of Lipogenic Genes by Polyunsaturated Fats." *Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 23577–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23577>.
- Yamamura, R., and Y. Shimomura. 1997. "Industrial High-Performance Liquid Chromatography Purification of Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Docosapentaenoic Acid Ethyl Ester from Single-Cell Oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (11): 1435–40. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0250-6>.
- Yang, Rong, Gabrielle Fredman, Sriram Krishnamoorthy, Nitin Agrawal, Daniel Irimia, Daniele Piomelli, and Charles N. Serhan. 2011. "Decoding Functional Metabolomics with Docosahexaenoyl Ethanolamide (DHEA) Identifies Novel Bioactive Signals." *Journal of Biological Chemistry* 286 (36): 31532–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237990>.
- Yazdi, Puya G. 2014. "A Review of the Biologic and Pharmacologic Role of Docosapentaenoic Acid N-3." *F1000Research*, November. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-256.v2>.
- Yuhas, Rebecca, Kathryn Pramuk, and Eric L Lien. 2006. "Human Milk Fatty Acid Composition from Nine Countries Varies Most in DHA" 41 (9): 2–4.
- Zhang, Ji Yao, Kumar S.D. Kothapalli, and J. Thomas Brenna. 2016. "Desaturase and Elongase-Limiting Endogenous Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 19 (2): 103–10. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000254>.
- Zhang, Lei, Yeeman Ramtohol, Sebastien Gagné, Angela Styhler, Hao Wang, Jocelyne Guay, and Zheng Huang. 2010. "A Multiplexed Cell Assay in Hepg2 Cells for the Identification of Delta-5, Delta-6, and Delta-9 Desaturase and Elongase Inhibitors." *Journal of Biomolecular Screening* 15 (2): 169–76. <https://doi.org/10.1177/1087057109356208>.

- Zhang, Meng, Cui Cui Li, Fang Li, Hong Li, Xiao Jun Liu, Juan J. Loo, Xiang Tao Kang, and Gui Rong Sun. 2017. "Estrogen Promotes Hepatic Synthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Regulating ELOVL5 at Post-Transcriptional Level in Laying Hens." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18071405>.
- Zhang, Wenting, Peiying Li, Xiaoming Hu, Feng Zhang, Jun Chen, and Yanqin Gao. 2011. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Brain: Metabolism and Neuroprotection." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 17 (June): 2653–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622201>.
- Zhang, Ying, Min Zhang, Bochao Lyu, Hiroko Kishi, and Sei Kobayashi. 2017. "Omega-3 and Omega-6 DPA Equally Inhibit the Sphingosylphosphorylcholine-Induced Ca²⁺-Sensitization of Vascular Smooth Muscle Contraction via Inhibiting Rho-Kinase Activation and Translocation." *Scientific Reports* 7 (1): 36368. <https://doi.org/10.1038/srep36368>.

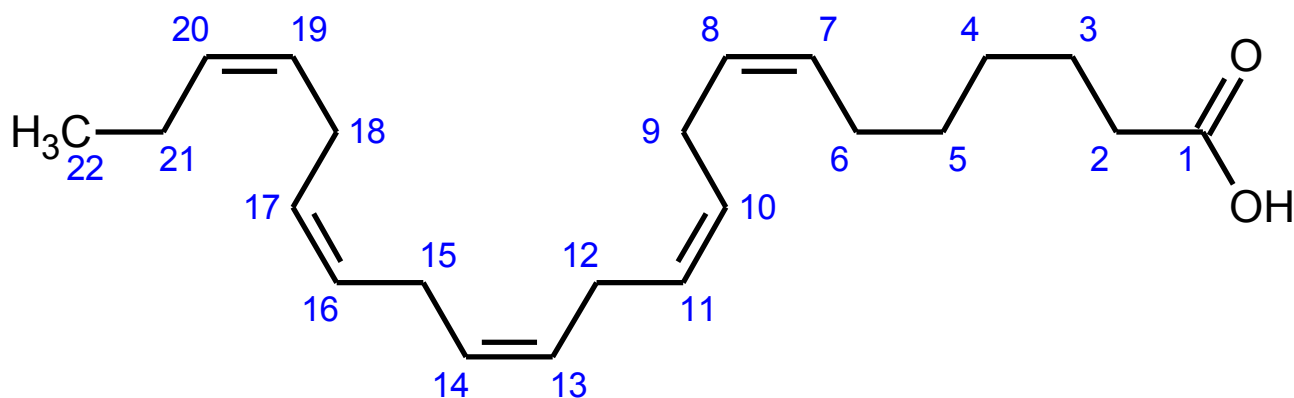
ANNEXES

ANNEXE I:
Revue générale sur le DPA

**The n-3 docosapentaenoic acid (DPA): a new player in the n-3 long chain
polyunsaturated fatty acid family**

Biochimie

Graphical abstract



n-3 docosapentaenoic acid

Abstract

The n-3 docosapentaenoic acid (DPA) is a poorly known n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LCPUFA), compared to its counterparts eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Present in food sources in non-negligible quantities, as well as in human milk, dietary DPA is of current interest both for its ability to increase EPA and DHA tissue status and for its specific or shared biological effects. Indeed, some evidence showed that dietary DPA is a source of EPA and slightly DHA in the major metabolic organs. DPA is also the precursor of a large panel of lipid mediators (protectins, resolvins, maresins, isoprostanes) principally implicated in the pro-resolution of the inflammation with specific effects compared to the other n-3 LCPUFA. Recent results showed that DPA is implied in the improvement of cardiovascular and metabolic disease risk markers, especially plasma lipid parameters, platelet aggregation, insulin sensitivity and cellular plasticity. Moreover, DPA is the most abundant n-3 LCPUFA in the brain after DHA and it could be specifically beneficial for elderly neuroprotection, and early-life development. These results led to the development of two drugs specifically containing DPA. This review summarizes the different knowledge about DPA direct and indirect sources, availability and purification methods, focusing thereafter on the recent findings showing DPA relationship with fatty acid metabolism, lipid mediators, Finally, the DPA biological and pharmacological effects are described.

Highlights

- DPA could be considered like a dietary source of EPA tissue content
- No evidence showed that dietary DPA increased brain DHA
- Hydroxy-metabolites from DPA are involved in the pro-resolution of inflammation
- More and more evidences about the DPA specific effects to decrease lipid parameters
- DPA purification methods will allow its accessibility for further *in vivo* studies

The n-3 docosapentaenoic acid (DPA): a new player in the n-3 long chain polyunsaturated fatty acid family

Drouin Gaetan¹, Rioux Vincent¹, Legrand Philippe¹,

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest, Rennes F-35042, France

Author contacts

Gaetan Drouin : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

Philippe Legrand : philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Vincent Rioux : vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr

* Corresponding author:

Philippe Legrand

Mail: philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr;

Tel.: +33-223-485-545

Fax: +33-223-485-550

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition

Agrocampus Ouest - INRA USC1378

Rennes F-35042, France

Funding source: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of interest: none

Abbreviations: ALA: α -linolenic acid, COX: cyclooxygenase, DHA: docosahexaenoic acid, EFOX: oxo derivatives, EPA: eicosapentaenoic acid, LCPUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid(s), LOX, lipoxygenase, RBC: red blood cells,

Keywords: docosahexaenoic acid DHA, eicosapentaenoic acid EPA, polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism, specialized pro-resolving mediator SPM,

Contents

1. INTRODUCTION	4
2. DIETARY SOURCES AND AVAILABILITY OF DPA	4
2.1. COMMERCIAL AVAILABILITY.....	4
2.2. PURIFICATION	5
2.3. DIETARY SOURCES AND CONSUMPTION	5
2.4. MARKERS OF FOOD CONSUMPTION	6
2.5. NUTRITIONAL RECOMMENDATIONS	7
3. METABOLISM OF DPA.....	7
3.1. A RESERVOIR OF EPA AND DHA.....	7
3.2. BIOAVAILABILITY.....	8
3.3. PRECURSOR OF LIPID MEDIATORS	9
4. BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF DPA	10
4.1. INFLAMMATION AND CANCER.....	10
4.2. CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASES	11
4.3. NEUROPROTECTION AND DEVELOPMENT	13
5. CONCLUSION AND PROSPECTS	13
6. ACKNOWLEDGMENTS.....	14
7. REFERENCES.....	15

Table 1 – Recent findings about n-3 docosapentaenoic acid (june 2016-sept. 2018)

Ref	Year	Model	Main findings
Sources			
[34]	2016	Meta-analysis	DPA content was 47% greater in organic meat than in conventional meat
[44]	2016	Humans	Echium oil diet increased DPA level in plasma, RBC and PBMC compared to linseed oil diet.
[46]	2018	Sprague Dawley rats	A partial incorporation of dairy lipids in the diet increased DPA status in tissues (RBC, liver, heart, brain)
[45]	2018	Newborns (0-4 month)	Infant fed with dairy lipids containing formula increased RBC DPA status compared to plant oils formula and breastfeeding
[23]	2018	<i>In tubo</i>	Structural characterization of self-assemblies of DPA monoglycerides
[18]	2018	Algae	DPA diglyceride production from <i>Schizochytrium sp.</i> (16.4% oil purity) and crystallization purification (28% purity)
[12]	2018	Review	Current scientific evidence does not support including DPA into the Omega-3 index
Metabolism			
[25]	2018	Sprague Dawley rats	Dietary DPA was assimilated in major tissues and mainly retroconverted in EPA (18 tissues). Dietary dairy lipids and DPA had complementary positive effect on n-3 LCPUFA status.
[65]	2016	Human cell lines	DPA was converted to DHA in HepG2 but not in Caco-2 and THP-1 cells. DPA was retroconverted into EPA in all cell lines and a greater increase of EPA was found in phospholipid than in neutral lipid fraction
[78]	2016	Humans	7-day DPA supplementation increased plasma specialized pro-resolving mediators derived from DPA
[76]	2017	Human neutrophils	Elucidation of stereocontrolled total synthesis of the intermediate 16(S),17(S)-epoxy-protectin n-3 DPA, its role in PD1 biosynthesis by human neutrophils and its regulation of the formation of the potent neutrophil chemoattractant LTB4
[36]	2017	Cannulated cows and ewes	DPA ruminal biohydrogenation was complete and like that of EPA, contrary to DHA forming intermediate derivatives
[126]	2017	Rabbit	DPA-enriched semen did not affect semen characteristics but had a negative impact on the lipid peroxidation and DNA integrity of the spermatozoa
Inflammation and cancer			
[95]	2018	Meta-analysis	DPA is positively associated with spirometric measures of pulmonary function tests in meta-analyses
[96]	2016	Airway models	DPA monoglyceride mediated antiphlogistic effects in stimulated human bronchi or guinea pig trachea by increasing the resolution of inflammation, while resetting Ca ²⁺ sensitivity and contractile reactivity
[41]	2017	Epidemiological	DPA intake is the most potent n-3 LCPUFA associated with slower forced expiratory volume decline in smokers
[87]	2017	Mouse macrophage cell line	DPA increased EPA, DPA and DHA contents in activated RAW264.7 cells, down-regulated mRNA expression of pro-inflammatory factors in a dose-dependent manner similarly than DHA supplementation and independently of DHA conversion from DPA.
[75]	2018	Human monocytes	Protectins n-3DPA positively regulated monocyte differentiation and macrophage efferocytosis and phagocytosis
[85]	2017	Mice	ProtectinD1 and resolvin D5 n-3 DPA protected against colitis and intestinal inflammation and cell adhesion
[94]	2016	Cohort	Dietary DPA was inversely associated with breast cancer risk, as well as dietary EPA and DHA
[73]	2017	Review	An overview of recent knowledge about ProtectinD1 n-3 DPA
[10]	2017	Review	Update in biosynthesis and chemistry of specialized pro-resolving mediators from n-3 DPA
[24]	2016	Review	Anti-inflammatory and anti-proliferative effects of n-3 LCPUFA monoacylglycerides
Metabolic diseases			
[26]	2018	Sprague Dawley rats	DPA (>99% obtained by liquid chromatography) was the only n-3 LCPUFA improving lipid parameters. Fatty acid tissue changes were similar with dietary DPA and EPA but not with dietary DHA.
[13]	2017	C57BL/6J mice	Following High-fat diet, only DPA (not DHA and EPA) improved insulin resistance. DPA- and DHA-supplementations acted similarly on the decrease in serum adiponectin, ALT and liver lipogenesis.
[50]	2016	Cohort	Only DPA tissue contents were associated with a lower risk of total coronary heart diseases (CHD), and as well as the others n-3 LCPUFA with fatal CHD in a pool of 19 cohort studies.
[109]	2016	Sprague Dawley rats	Plasma DPA was strongly and positively associated with insulin sensitivity index in rats fed high-fat or high-fructose diets
[110]	2016	Association	In obese adolescent with cardiometabolic syndrome following a 1-year interdisciplinary therapy, changes in DPA were negatively associated with leptin and leptin/adiponectin ratio and positively with adiponectin.
[106]	2016	Association	Serum DPA was the only n-3 LCPUFA inversely associated with the risk of orthostatic hypotension
[101]	2016	Association	Plasma DPA was negatively associated (less than EPA) with all-cause mortality in men but not in women
Neuro-visual protection			
[124]	2017	Cohort	DPA intake was the only n-3 LCPUFA independently associated with reduced risk of major depressive disorder in aged Japanese individuals
[125]	2016	Humans	Negative association between RBC DPA and depression in postmenopausal women using hormone therapy
[120]	2017	Humans	DPA decreased in RBC of cognitively normal elderly participants with high neocortical β -amyloid load and could be an early potential marker of Alzheimer's disease
[119]	2017	Human CASMC cells	DPA (and n-6 DPA) inhibited sphingosylphosphorylcholine-induced Ca ²⁺ -sensitization of coronary artery smooth muscle cell (CASMC) contraction by inhibiting Rho-kinase activation and translocation to the cell membrane
[121]	2016	Cohort	No association was found between serum DPA and with performance on neuropsychological tests in an older population
[122]	2017	Humans	DPA plasma level was the only one associated with higher macular pigment optical density
[6]	2016	Review	Links between DPA intake and blood level in pregnant and lactating mothers with better neural and bone developments and fewer allergy diseases.

EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; LCPUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid(s); PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RBC, red blood cells.

1. Introduction

The n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) have been widely studied and contribute to numerous beneficial effects, mainly associated with cardiovascular prevention [1], neurodevelopment, but also with the reduction of the risk of neurodegenerative diseases. [2]. Indeed, these n-3 LCPUFA are involved in many processes such as the increase of membrane plasticity, the synthesis of oxygenated metabolites and the resolution of inflammation or the regulation of genes [3].

The majority of the n-3 LCPUFA studies were conducted using fish oils, composed of a mixture of three major n-3 LCPUFA: docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and n-3 docosapentaenoic acid (DPA). Most of the beneficial effects of fish oils have been attributed to DHA and then to EPA, for which there is growing interest in the independent and shared functions. On the other hand, the literature concerning the potential protective effects of DPA is brief because DPA represents less than one-third of each EPA and DHA in fish oils. In addition, DPA is not commercially available in sufficient quantity, with high purity (> 98%) and at an affordable price to set up in vivo nutritional supplementation studies [4].

Studies about DPA have however begun to grow in recent years. DPA is indeed the second n-3 LCPUFA found in the brain (w/w), although its cerebral concentration is about 70 times lower than DHA. Moreover, the level of DPA in human milk is higher than that of EPA, similar to that of DHA and its level is more stable [5], implying a potential impact of DPA during pregnancy and development, which is the subject of a recent review [6]. While obtaining optimal tissue status in n-3 LCPUFA is one of the current public health challenges, DPA is also the only intermediate between EPA and DHA in the n-3 LCPUFA conversion pathway from α -linolenic acid (ALA) present in significant quantities in the diet. Therefore, could DPA serve as a dietary source or biological reservoir of DHA and EPA?

This paper reviews and summarizes the different knowledges about DPA and focus on the most recent findings synthesized in Table 1. To more thorough review concerning specific knowledges, the reader is encouraged to read another reviews specific about DPA or including it, as mentioned in adequate sections below [2,4,6–12].

2. *Dietary sources and availability of DPA*

2.1. Commercial availability

Suppliers who offer DPA > 98-99% purity cannot provide on demand enough quantities of DPA for in vivo studies at prices that are affordable for most research laboratories (supplier communications, 2017). Thus, studies focusing on DPA are often association studies in humans or in vitro studies. Most in vivo studies thus used DPA with a purity level <98% which therefore also contains mainly DHA, EPA and n-6 DPA, limiting the interpretation of these findings [8,9,13]. In addition, only one supplier offers radiolabelled ¹⁴C- DPA (ARC, 10 μ Ci), which is also very expensive and inaccessible for DPA metabolism monitoring studies, although two studies have reported its use in vivo [14,15]. A DPA-based dietary supplement has also recently appeared on the market and contains 15% DPA in proportion to n-3 LCPUFAs (Super DPA Fish Oil®, Swanson, USA, 2018).

2.2. Purification

To alleviate this problem of commercial availability as well as to study DPA in various dietary lipid forms, some teams have been interested in the purification of DPA from natural sources. Historically, a Japanese study first focused on the industrial scale purification of DPA in ethyl ester form from *Schizochytrium* sp. algae oil by industrial high-performance liquid chromatography (HPLC) using two reverse phase columns. They obtained DPA (and DHA) > 99% purities with a production of 70 g/hour of DPA [16]. A Chinese team then focused on purifying DPA in the laboratory from tuna oil, firstly by crystallization of the fatty acids complexed with urea, then by purification by liquid chromatography (LC) on a silver nitrate silica column. [17]. They obtained DPA at 22.3% purity with a purification efficiency of 70.7%. Very recently, the same team managed to purify DPA from 16.4% to 28.1% of the total fatty acids in the form of diacylglycerol by crystallization (6h, -80 ° C) from the *Schizochytrium* sp oil [18]. Various patents have also been filed to produce, extract and purify DPA (and DHA) as fatty acid methyl esters from *Ulkenia* [19–21]. In addition, DPA monoglycerides have been synthesized through esterification at the sn-1 position of the glycerol backbone by using DPA ethyl esters as starting materials [22]. The self-assembly of this compound has been structurally characterized [23], which could give it a better bioavailability than DPA ethyl ester and triglyceride forms, as shown previously for EPA monoglycerides [24]. More recently, we have

purified tens of grams of DPA > 99% by flash and preparative LC from commercial fish oils enriched with n-3 LCPUFA [25,26]. The purification involved seven successive purification cycles with a purification efficiency > 70% and allowed to purify 8g of DPA/week [25] as well as EPA and DHA > 99% [26].

The advance of these methods could quickly allow access to the amounts of DPA needed for clinical studies in humans, requiring several hundred grams of pure DPA. DPA-enriched dietary supplements could be a good source for the purification of DPA by LC compared to fish or algae oils, as well as the combination of LC purification methods, crystallization and distillation [27] or the use of drug under development enriched with DPA [24,28].

2.3. Dietary sources and consumption

The major source of DPA is obviously seafood, including fish from the Clupeidae family that gave the DPA its common name: clupanodonic acid (USDA, 2014). Seal meat and fats appear to be the richest in DPA, containing 5.6% of DPA [29], which would amount to a daily consumption between 1.7 and 4.0 g of DPA per day for the Inuit population [30]. Among the most common consumer products in Western society, salmon contains 393 mg of DPA per 100g serving, Atlantic mackerel 200 mg, and other oily fish between 100 and 200mg (USDA, 2014). Beef liver and lamb are the richest land-based sources of DPA but are also highly variable in terms of provenances [4]. Thus, they contain about 140 mg of DPA/100 g in New Zealand, but only 20-30mg in the United Kingdom, while American beef does not contain any, surely associated with differences in pasture production and quality [31–33]. Indeed, the quantities of DPA in organic meat are around 50% greater than in conventional meat [34]. While the dominant sources of EPA and DHA are seafood products that contain less DPA, DPA is the most prevalent n-3 LCPUFA in meat [35], thus varying the sources and amounts consumed of DPA according to eating habits. In another hand, the ruminal biohydrogenation of DPA was similar to that of EPA and appears complete without the formation of intermediate derivatives expected after biohydrogenation of DHA [36]. Food supplements made from fish oils enriched with n-3 LCPUFA may also provide a DPA intake, with mackerel oils containing about 4.9% DPA, compared with 3.0% for salmon or 2% for sardine.

The main dietary sources of DPA in pregnant and lactating women are seafood (59%), poultry (14%), meat products (11%) and dairy products (9%) [4]. About two-thirds of seafood-derived DPA intake in these women was attributed to salmon consumption [37]. In Australian children,

intake of EPA and DHA is strongly correlated with consumption of fish and seafood, while intake of DPA is moderately correlated with meat consumption [38]. The main contributor to DPA consumption among these children was meat, poultry and wildfowl (56%), fish and seafood (23%), cereal products and dishes (5.7%), dairy products (5.6%) and finally egg products (3.6%) [38,39]. In Europe, the average daily intake of DPA in adults is between 25 mg/day (Belgium, women aged 18-39) and 75 mg/day (France, male > 45 years), with quartile intakes of 12 to 80 mg/day. In France, the maximum intake, estimated by the 5 highest percentiles of the population, is 129 mg / day of DPA [37]. There is no database of young children for DPA (0-3 years old) and adolescents (13-19 years old). Swedish, Norwegian and German consumption data indicate that the average daily intake of DPA in 4-year-old children is 30 mg/day, 40 mg/day for 8-12 years and 120 mg/day for 8-12 years old [37,39]. Thus, DPA could contribute up to 30% of the intake of n-3 LCPUFA in the diet of these populations [40] but there are important disparity of consumption beyond populations and ethnicity [41].

Dietary sources of DPA can also be indirect, either by providing the precursors of the n-3 LCPUFA conversion pathway, or by providing lipid mixture to increase the conversion from ALA to DPA. Several studies have shown that DPA can be increased in the blood compartment in human as well as in tissues in animals after a diet rich in ALA or EPA [42]. More recently, the addition of echium oil rich in stearidonic acid in the diet of rats increased the tissue DPA status, showing that stearidonic acid could also be a source of DPA, in addition to a source of EPA for which it is mainly described [43,44]. While human milk contains DPA and cerebral accumulation of n-3 LCPUFA occurs mainly during the first years of life [5], some studies have shown that the addition of milk lipids in the diet of young people, whose fatty acid composition are closer to breast milk than a mixture of vegetable oils, also increased tissue DPA status. First, in a monocentric, double-blind controlled and randomized trial, healthy newborns fed formula containing a mixture of dairy lipids and plant oils from birth to 4 month-old increased their DPA content in red blood cells (RBC) compared to newborns fed with a formula composed with plant oils only [45]. Moreover, this increase in RBC DPA was more important than in breastfed newborns. In healthy post-weaning Sprague Dawley rats, a partial incorporation of dairy lipids in the diet with vegetable oils (50% w/w) during 6 weeks increased the DPA status in the RBC, brain, liver and principally in the heart, compared to 100% vegetable oil diets [46]. Thus, dairy lipids could be a potential indirect help to increase the DPA status in early life. Surprisingly, it has been shown that DPA supplementation (0.5% of total fatty acids, 10% lipid w/w) and the partial incorporation of dairy lipids in the diet (50% w/w) had a complementary

effect to increase the n-3 LCPUFA status in tissues of Sprague Dawley rats fed from weaning for 6 weeks, especially EPA and DPA tissue contents [25].

2.4. Markers of food consumption

The DPA composition of the RBC membranes and the different lipid classes of plasma in humans are positively correlated with dietary intake of n-3 LCPUFA, as for EPA and DHA. This increase, however, tends to be relatively limited compared to that of EPA and DHA [47]. In addition, DPA is present in whole blood in lower amounts than EPA and DHA and the proportion of DPA decreases less than EPA or DHA as the proportion of n-6 PUFA increases in the blood [48]. This suggests that DPA present in other blood compartments than RBC (plasma, platelets, peripheral blood mononuclear cells) may have a different metabolism than EPA and DHA and that the DPA blood level would be preserved [49].

DPA is for now not considered in the calculation of the Omega-3 index (EPA + DHA of the RBC membranes), which is used as a marker of consumption but also as a risk marker for total mortality, sudden cardiac death or other cardiovascular risks in epidemiological studies [50]. Although the inclusion of DPA in the Omega-3 index was more precise to estimate n-3 LCPUFA contents in whole blood [49], it did not improve the prediction of the risks associated with the existing Omega-3 index [12].

2.5. Nutritional recommendations

The different health national agencies agreed that the data about DPA were insufficient to produce specific recommendations for this n-3 LCPUFA. Nevertheless, England [51], Australia and New Zealand [52] as well as the Netherlands [53] included the DPA in the sum of the recommended n-3 LCPUFA (EPA + DPA + DHA).

3. *Metabolism of DPA*

3.1. A reservoir of EPA and DHA

DPA is the only intermediate between EPA and DHA, in the conversion pathway from ALA, to be present in significant amounts in the human diet compared to the C24:5 n-3 and

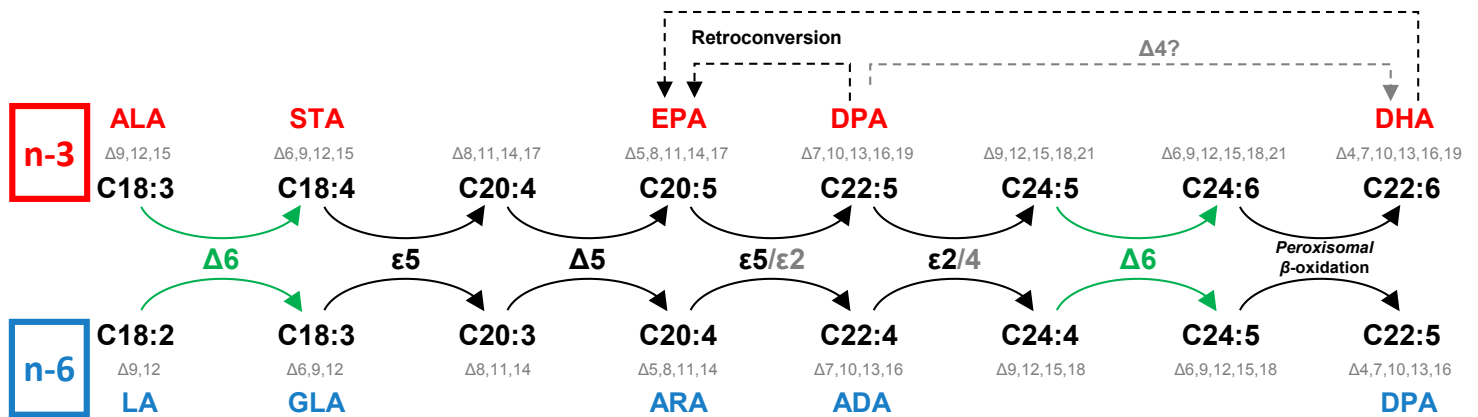


Figure 1 –Bioconversion pathways of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid families

Δ: desaturase, ε: elongase, ALA: α-linolenic acid, ADA: adrenic acid, ARA: arachidonic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, GLA: γ-linolenic acid, DHA: docosahexaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid, LA: linoleic acid, STA: stearidonic acid.

C24:6 n-3 derivatives [38]. This conversion pathway is well known and involves a sequence of desaturase enzymes adding one double bond to the carbon chain and elongase enzymes extending the carbon-chain of two carbons (Figure 1). The n-3 LCPUFA conversion pathway is parallel to that of n-6 LCPUFA using the same sequence and enzymes. Thus, the two pathways are in competition for substrates with each other. In the n-3 LCPUFA conversion pathway, the DPA is elongated to the C24:5 n-3 derivative by the elongase-5 and weaker elongase-2 enzymes, then desaturated to the C24:6 n-3 by the action of the Δ 6-desaturase, and finally converted to DHA by a peroxisomal β -oxidation step [54]. The Δ 6-desaturase and more recently elongase-2 are considered as the limiting enzymes in this conversion pathway to DHA [55]. Thus, it has been hypothesized that dietary DPA could be a better precursor of DHA than dietary EPA, bypassing the conversion of EPA to DPA using elongase-2 and elongase-5 as well [25,26]. One Δ 4-desaturase activity has also been described in vitro in humans to convert n-3 DPA directly to DHA but these results need to be confirmed [56]. Some authors have also hypothesized that DPA could not only serve as a reservoir of DHA but also of EPA in humans, in farm animals and potentially in other mammals [57].

The ability of dietary DPA to increase tissue status in DHA remains however controversial and seems tissue-dependent. In humans, a 7-day supplementation with a single daily dose of pure DPA resulted in an increase in plasma DHA in triglycerides only [57]. Gavage of rats for 7 days with 50 mg of DPA/day in the form of free fatty acid led to an increase in DHA in the liver only compared to ALA control [58]. In the miniature poodle, intravitreal injection of 1-¹⁴C-DPA showed an increase in radiolabeled DHA in the retina [15]. Conversely, in the C57BL/KsJ-db/db obese mouse supplemented for 4 weeks with tri-DPA, no increase in DHA was found in studied tissues [59], as in the C57BL/6J mouse fed a high-fat diet and force-fed with 50mg of DPA daily for 6 weeks [13]. In these mice, DPA supplementation tended to impact tissue fatty acid composition more like DHA than EPA supplementations [13]. While brain tissue composition is known to remain highly stable, oral administration of DPA to rats resulted in the increase of cerebral DPA and DHA, regardless of animal age [60]. However, these both studies used DPA nearby 70% purity containing DHA and is not easy to interpret. The addition of DPA in endothelial cell cultures of aorta [61,62], rat hepatocyte line (FaO) [63], primary rat hepatocytes [64] or human hepatocyte line (HepG2) [65] caused an increase in EPA in cells and media, as well as DHA in media, but DHA was conversely not increased in human intestine (Caco-2) or monocyte (THP-1) cell lines [65].

Dietary DPA could also be used as a source of EPA. The EPA produced from DPA certainly comes from the retroconversion of DPA, implicating, as for DHA, the acyl-CoA oxidase and one peroxisomal β -oxidation step. This pathway was demonstrated in acyl-CoA oxidase deficient fibroblasts which do not lead to n-3 LCPUFA [66]. In Sprague Dawley rats, we showed that the overall tissue fatty acid change following a dietary DPA supplementation was more similar to EPA supplementation than DHA supplementation [26]. In this study, the apparent retroconversion of DPA into EPA was particularly important in the kidney (68%), the liver (38%) and the spleen (20%). These results are confirmed by another study showing a higher apparent retroconversion of DPA in the kidney than in the liver in rats (50 mg/day by oral gavage) [67] (Figure 1). Finally, the apparent retroconversion of DPA to EPA was shown in humans [57], Sprague-Dawley rat [58], C57BL/6J-db/db mouse [59], C57BL/6J mouse (high-fat diet) [13] and miniature poodle [15]. However, this retroconversion is still estimated relative to control without dietary DPA and there is a lack of labeled DPA monitoring studies to really quantify the importance of this pathway.

We recently investigated for the first time the tissue distribution of n-3 LCPUFA in 18 tissues, following a 3-week nutritional pure DPA supplementation (0.5% of the total fatty acids included in the diet) of healthy Sprague Dawley rats in post weaning [25]. The DPA content increased in half of the studied tissues and mostly in the spleen, lung, heart, liver and bone marrow from +50% to +110% compared to the control group. DPA was mostly retroconverted into EPA, especially in the liver (35%) and the kidney (46%) and slightly converted into DHA, showing an increased content of these two LCPUFA in affected tissues. Moreover, the DPA supplementation decreased total n-6 PUFA in affected tissues and especially n-6 DPA and adrenic acid (C22:4 n-6) [25]. In organs most affected by its supplementation, another study showed that dietary DPA was mainly incorporated into the phospholipid fractions, (phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines) [67].

To conclude, dietary DPA is mainly incorporated in major metabolic organs and esterified into the same lipid species than EPA and DHA. It is mainly retroconverted into EPA and slightly converted to DHA. It could therefore be considered as a source of EPA but also DHA to a lesser extent, implying potential physiological effects associated within these tissues.

3.2. Bioavailability

Only one study investigated the bioavailability (efficiency with which dietary DPA is used systematically through normal metabolic pathways) of dietary DPA. After oral administration

of 2.5 μCi of 1- ^{14}C -DPA, 1- ^{14}C -EPA or 1- ^{14}C -DHA in the rat housed in metabolic cage for 6h, 1- ^{14}C -DPA was catabolized to $^{14}\text{CO}_2$ in the same proportion as the 1- ^{14}C -DHA (about 7% of the ingested dose) and less than the 1- ^{14}C -EPA (about 18%). In addition, the percentage of the ingested radioactivity measured in the heart and muscle was similar from 1- ^{14}C -DPA and 1- ^{14}C -DHA and higher from 1- ^{14}C -EPA. Conversely, the radioactivity found in liver, brain and kidney was similar from 1- ^{14}C -DPA and 1- ^{14}C -EPA but less than from 1- ^{14}C -DHA [14].

The digestibility (difference between intake and excretion) of dietary DPA in ethyl ester form (96.6%) was similar than DHA (96.9%) and lower than EPA (98.3%) in post weaning Sprague Dawley healthy rats [26]. In another study, the excretion of DPA was 4.6 times greater than that of EPA after ingestion of 250 mg/day of DPA or EPA as free fatty acids for 3 days in rats [68]. DPA was also preferentially hydrolyzed by porcine pancreatic lipase *in vitro* compared to EPA and DHA, suggesting a faster absorption [69].

Thus, the DPA seems slightly less absorbed than the other n-3 LCPUFA. Nevertheless, its digestibility remains greater than 95% regardless of its form of intake. More studies are needed to better address the DPA bioavailability compared to other n-3 LCPUFA.

3.3. Precursor of lipid mediators

Like DHA, DPA is a precursor of docosanoids whose physiological effects are however poorly known. Several metabolites of DPA are indeed discovered each year in different tissues, [10,11,70–74]. The multiple lipid mediators identified from DPA and their deduced biosynthesis pathways are summarized in Figure 2.

The 17-Hydro(peroxy) n-3 DPA is first synthesized by the action of the 15-lipoxygenase (15-LOX). It can thereafter be converted either into 16,17-Epoxy n-3 DPA which will be converted into protectins by enzymatic hydrolysis [75,76]; or into 7,17-Dihydro(peroxy) n-3 DPA by the 5-LOX to give resolvins [74]. The maresins derived from DPA come from the action of the 12-LOX followed by the reduction of 14-Hydro(peroxy) n-3 DPA to 13,14-Epoxy n-3 DPA, itself enzymatically hydrolyzed to give the maresin family. The 5-LOX can also produce mono- and di-hydroxylated derivatives from DPA. The 15-LOX pathway is the most efficient, converting 85% of the DPA to its 17-Hydro(peroxy) n-3 DPA derivative *in vitro*, compared to only 10%

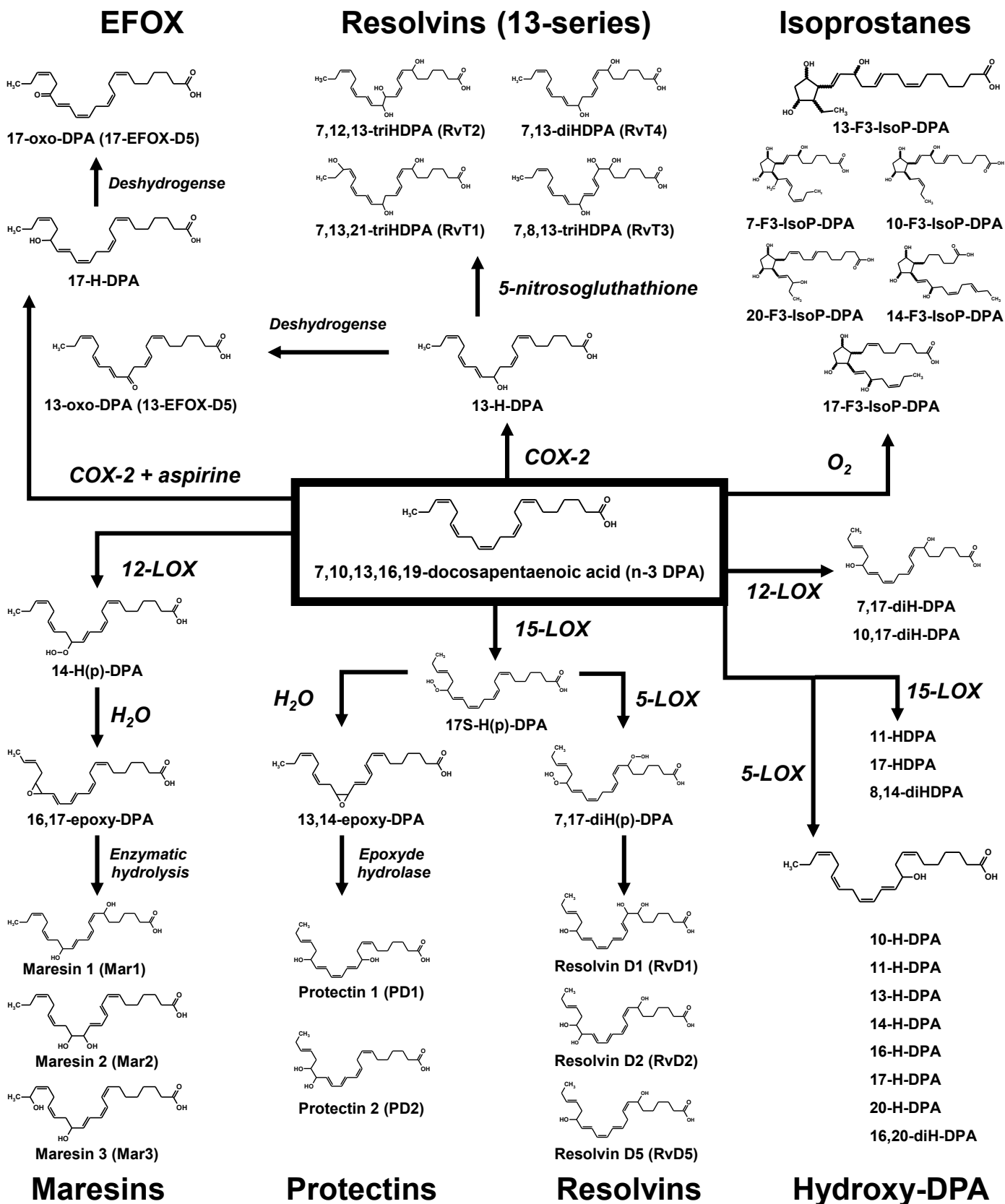


Figure 2 – Biosynthesis pathway of n-3 docosapentaenoic acid-derived metabolites

COX: cyclooxygenase, DPA: docosapentaenoic acid, EFOX: oxo derivative, isoP: isoprostane, LOX: lipoxygenase, H-DPA: hydrox-DPA, H(p)-DPA: hydro(peroxy)-DPA

for 12-LOX and 5-LOX [77]. Some of these mono-hydroxylated metabolites as well as resolvinDn-3DPA were detected in human serum after DPA supplementation for 7 days [78].

DPA can additionally undergo the induced action of cyclooxygenase-2 (COX-2), to form the 13-Hydroxy n-3 DPA which will be able, as for derivatives from DHA, to be reduced to 13-oxo derivatives (EFOX). The 17-EFOX-D5 was for instance produced when aspirin was added to the culture medium of macrophages, as for EFOX derivatives from DHA [79]. The 13-series resolvins from 13-HydroxyDPA n-3 have been identified in co-incubations of neutrophils and endothelial cells [80]. These derivatives are formed by COX-2 then by S-nitrosylation. The cytochrome P450 can also metabolize DPA, but to a lesser extent than other n-3 LCPUFAs, although this result must be confirmed [81,82]. Isoprostanes resulting from the peroxidation of DPA are not yet known. Nevertheless, a series of isoprostanes derived from DPA have recently been described from the n-6 isomer of n-3 DPA [83]. Very few studies report on the overall distribution and action of oxygenated metabolites from DPA because of their very recent discovery and the lack of synthetic standards [84]. More information on the chemical synthesis, availability and biological effects of DPA-derived metabolites can be found in these reviews [10,11].

4. Biological and pharmacological effects of DPA

4.1. Inflammation and cancer

The decrease in inflammation associated with DPA seems to come mainly from these lipid mediators, and mainly the specialized pro-resolving mediator (SPM) (maresins, protectins, resolvins). Indeed, incubation of human macrophages with Protectin D1n-3DPA increased the monocyte differentiation, the phagocytic activity of macrophages and the apoptosis of neutrophils, which are key factors in the resolution of inflammation [70,75]. Moreover, the incubation of DPA-derived Maresin1n-3DPA also stimulated macrophage phagocytosis and clearance of human apoptotic neutrophils in a similar manner to DHA-derived Maresin1n-3DHA [71]. In human inflammatory bowel disease colon biopsies, the Protectin D1n-3DPA and Resolvin D5n-3DPA increased [85]. These lipid mediators protected against colitis and intestinal inflammation in mice and decreased the extent of leukocyte adhesion and emigration post-stimulation. Contrary, the inhibition to their metabolic pathway (15-LOX) led to increased intestinal inflammation [85]. In a series of other studies, 13-series resolvins from DPA

accelerated the resolution of inflammation and increased survival by 60% in *Escherichia coli*-infected mice [71,80,86]. In LPS-activated murine macrophage like RAW264.7 cells incubated with DPA, EPA or DHA, DPA increased EPA and DHA cell contents, down-regulated mRNA expression of pro-inflammatory factors (IL-6, IL-1 β , iNOS, COX-2), and especially decreased IL-6 mRNA expression dose-dependently more than EPA and similarly than DHA [87]. Interestingly, the down-regulation of IL-6 and IL-1 β mRNAs were similar when cells were incubated with an inhibitor of the delta-6 desaturase, demonstrating that DPA exhibited anti-inflammatory effects independent of DHA conversion [87].

Several studies from the same research team have shown that DPA-monoacylglyceride had greater anti-inflammatory, anti-proliferative and pro-apoptotic effects than EPA- or DHA-monoacylglycerides [24], in a model of colorectal cancer [88], in a model of rheumatoid arthritis [33], and in pulmonary hypertension where DPA reduced the markers of inflammation and remodeled vascular pattern [89]. As a consequence, a prescription drug containing monoglyceride DPA is in the final stages of development by SCF Pharma for its anti-inflammatory and anti-proliferative properties and has been patented [90]. In healthy adult men, a high level of DPA was correlated with a lower inflammation score, mainly associated with decrease in C-reactive protein (CRP) and TNF- α scores [91]. In another study, DPA reduced the expression of genes involved in the inflammation of blood vessel membranes [92]. Treatment of aortic endothelial cells with DPA strongly inhibited angiogenesis, implicated in tumor growth, inflammation, and microangiopathies [93]. A prospective study associated dietary DPA with a reduction of breast cancer risk (like EPA and DHA intake) [94].

On the other hand, DPA anti-inflammatory properties could benefit adults with compromised pulmonary health. DPA was positively associated with forced expiratory volume in the first second (FEV1), forced vital capacity (FEV) and FEV1/FVC, modified by smoking and sex, in meta-analyses across seven cohorts (n=16,134) [95]. A recent epidemiological study has shown that the consumed DPA was the most fatty acid associated with a better average FEV1 and slower FEV1 decline in the smoking patient [41]. Interestingly, the FEV1 decline from the adverse effect of continuous current smoking was completely negated with high DPA intake in the Lovelace Smokers cohort [41]. In human bronchus and guinea pig trachea preparations treated with DPA-monoacylglyceride, the higher concentration of DPA reduced the TNF- α /NF- κ B pathway, suppressed COX-2 expression, decreased the Ca²⁺ sensitivity of bronchial explants and reversed the induced contractile reactivity [96].

4.2. Cardiovascular and metabolic diseases

The effect of DPA on the lipid parameters associated with the prevention of cardiovascular diseases is the most documented topic (anti-inflammatory properties, inhibition of cytokine synthesis, decrease in thrombosis, decrease in plasma lipids, inhibition of atherosclerosis...). Studies on the potential effect of DPA in the prevention of cardiovascular diseases in humans are usually association studies and concern the blood compartment. It has been shown that a high level of DPA in the red blood cell membranes in men and in women is associated with a lower risk of developing metabolic syndrome in Chinese adults [97]. In addition, a high plasma DPA (and DHA) level would also be the most correlated with a reduction of the risk of cardiovascular disease with plasma DHA level [50,98–101]. Moreover, in a pool of 19 cohort studies, DPA (in plasma and adipose tissue) was the only n-3 LCPUFA associated with a lower risk of total coronary heart disease, while all n-3 LCPUFA were associated with a lower risk of fatal coronary heart disease [102]. In addition, a cross-sectional study found that decrease in RBC DPA concentrations (3.0% vs. 3.9%) was associated with an increased incidence in cardiovascular diseases [103]. Plasma DPA was also inversely correlated with arterial obstruction and stroke. DPA was the only fatty acid whose plasma level is inversely correlated with arterial obstruction in smokers [41,104]. In addition, a cross-sectional study of carotid ultrasonography showed an association between DPA consumption and carotid wall thickness reduction [105]. Serum DPA (1st vs 3rd tertile) was the only n-3 LCPUFA inversely associated with the risk of orthostatic hypotension [106]. However, the association of DPA with the reduction of cardiovascular risk was moderate (but significant) [107] and these results remain controversial because some studies didn't show any impact of DPA intake on these factors [12].

In another hand, in children, the highest RBC levels of DPA have also been associated with a decreased risk of pancreatic islet autoimmunity in children with type I diabetes [108]. Moreover, plasma DPA and DHA were strongly and positively associated with insulin sensitivity using a global lipidomic approach in rats fed high-fat or high-fructose diets [109]. Serum DPA was influenced by lifestyle: in obese adolescent with cardiometabolic syndrome following a 1-year interdisciplinary therapy, changes in DPA were negatively associated with leptin and leptin/adiponectin ratio and positively with adiponectin [110]. Moreover, high-fat diets supplemented with DPA decreased serum adiponectin level in mice [13].

Some in vitro and in vivo studies, mainly in the rodent model, tried to decrypt the mechanisms by which DPA could help improving cardiovascular diseases risk markers. Compared with

ALA, EPA or DHA contents, the rate of DPA in RBC was inversely and dose-dependently the most correlated with fasting plasma triglycerides in humans, after a 5 month supplementation with EPA + DHA [111]. Thus, several studies in animals have shown that DPA improved the lipid profile of plasma like EPA and DHA. In healthy rats fed 0.1% DPA (in energy) for 6 weeks, plasma total cholesterol, non-HDL cholesterol and cholesterol esters decreased compared to control group [25]. Compared to EPA and DHA supplementations in ethyl ester forms, DPA-fed rats (7.6 mg/day/kg.bw) were the only one with lower plasma triglycerides, total cholesterol, non-HDL cholesterol, total cholesterol/ HDL cholesterol ratio and cholesterol esters concentrations [26]. The DPA-supplemented group also increased its plasma total antioxidant status and superoxide dismutase activity like EPA and DHA fed-rats, with no change in complete blood count, white blood cell and splenocytes subpopulations [26]. In hamster fed high-cholesterol diets, supplementation with DPA (50 mg/day) reduced plasma total cholesterol and non-HDL cholesterol, associated with inhibition of SREBP2 mRNA, resulting in a decrease in the transcription of the HMG-CoA Reductase involved in cholesterol synthesis [112]. Mice supplemented with dietary DPA showed a decrease in the activity of Fatty Acid Synthase (FAS), plasma total cholesterol and triglyceride concentrations [113]. A very interesting recent study in C57BL/6J mice fed high-fat diets (23% w/w) and supplemented with DPA (72% purity), pure EPA or pure DHA for 6 weeks showed that only DPA improved insulin resistance (HOMA) [13]. In this study, both DPA and DHA prevented the increase in serum alanine aminotransferase (ALT) levels, probably associated with inhibition of the TLR-4/NFκB signaling pathway and decreased liver lipogenesis. Another study showed that C57BL/KsJ-db/db mice receiving purified tri-DPA or DHA decreased their hepatic triglyceride levels significantly more than mice treated with EPA [59]. In a human liver cell culture model (HepG2), the decrease in triglyceride synthesis after supplementation with n-3 LCPUFA in the medium was associated with a decrease in FAS mRNA expression and was classified as depending on the supplementations as follow: C24:6 n-3 > DHA > DPA > EPA [113]. In a rat hepatocyte cell line model (FAO) treated with 50 μM EPA, DPA or DHA, DPA decreased most strongly the expression of HMG-CoA reductase, FAS, acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC-1), SREBP1-c and ChREBP [63]. On the other hand, the concentration of postprandial plasma chylomicrons decreased in healthy women after a breakfast supplemented with DPA, compared to supplementation with EPA or olive oil [57]. Finally, it appears that the DPA is transported mainly in the triglyceride part of the chylomicrons and not in the PL after the evaluation period of 5 hours in humans [114].

Based on these studies, Matinas BioPharma has patented and placed on the market a prescription-only drug containing a mixture of DPA and EPA in the form of ethyl ester and containing only traces of DHA for the treatment of severe hypertriglyceridemia [28]. Compared to the ingestion of EPA ethyl esters in humans with severe hypertriglyceridemia (200-400 mg of triglycerides/dL plasma), this drug (MAT9001) helped reducing the plasma triglycerides, total cholesterol, non-HDL cholesterol and VLDL concentrations more significantly [28]. The lack of comparison with the ethyl ester of DHA nevertheless reduces the scope of these findings.

DPA can also decrease platelet aggregation more significantly than EPA and DHA. DPA indeed inhibited collagen or ARA-stimulated platelet aggregation in a dose-dependent manner using rabbit platelets [115] or human platelets, but this regulation appears sex-dependent in humans because only platelet aggregation in women were inhibited [116,117]. DPA also increased the LOX pathway and may act as a strong inhibitor of COX-1 and COX-2 activities leading to decreased platelet aggregation and active aortic tension [112,115]. DPA also stimulated the migration of endothelial cells, whose migration and proliferation are processes involved in the control of the healing response of blood vessels [62]. In addition, the treatment of aortic endothelial cells with DPA inhibited their migratory activity due to the stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) [62]. The supplementation of Sprague Dawley rats with echium oil, rich in stearidonic acid and potential source of DPA, showed an anti-arrhythmic action comparable to that obtained by supplementation with fish oils rich in DHA and was associated with tissue augmentation. of the DPA [118].

The association between DPA blood status and prevention of cardiovascular and metabolic risks remains uncertain. Nevertheless, an even greater level of evidence is accumulating in favor of a specific effect of DPA on the improvement of risk factors associated with metabolic diseases, including improvements in blood lipid parameters, in platelet aggregation, in pro-resolution of inflammation, improvement of insulin sensitivity or modulation of adiponectin. On the other hand, these effects and their mechanisms remain to be elucidated in humans.

4.3. Neuroprotection and development

DPA is the most abundant n-3 LCPUFA in the brain after DHA and it could be specifically beneficial for neuroprotection and for depression prevention [2]. Elderly rats (20-22 months) supplemented with DPA, EPA, or purified monounsaturated fatty acids for 56 days had neuro-restorative benefits associated with decrease in microglial activation and oxidative stress in the hippocampus, two mechanisms involved in the loss of synaptic functions and therefore related to cognitive decline [60]. Moreover, DPA (and n-6 DPA) inhibited sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction by inhibiting Rho-kinase activation and translocation to the cell membrane, a major cause of cerebrovascular vasospasm [119]. Some authors also hypothesized that RBC DPA content could be one of the diagnostic marker of Alzheimer's disease and one therapeutic target because RBC DPA decreased in cognitively normal elderly participants with high neocortical β -amyloid load [120]. Conversely, no association was found between serum DPA and performance on neuropsychological tests in an older population [121]. While n-3 LCPUFA are well-known to decrease the risk of age-related macular degeneration, plasma level of DPA was the only n-3 LCPUFA associated with higher macular pigment optical density in subjects with family history of age-related macular degeneration [122].

Concerning depression, purified DPA supplementation at 150 mg/kg/day for 6 days in rats resulted in a reduction of symptoms associated with depression and increased levels of cerebral DPA [123]. In a prospective cohort study in aged subjects, the third quartile of DPA intake was also correlated with a reduced risk of major depressive disorder as well as EPA and fish intake. However, only DPA and fish intake remained significant when odd ratios were adjusted for cancer, myocardial infarction, stroke and diabetes [124]. RBC DPA (and both ALA and DHA) levels were also negatively associated with depression of postmenopausal women only if they used hormone therapy, suggesting an interaction between DPA and hormones on depression [125].

DPA is also present in non-negligible quantities in human and mammalian milk, so it could be involved in fertility [126], pregnancy [127] and early-life development. Indeed, high DPA intake by lactating mothers was linked to better neuro-development and bone health of children [6]. Moreover, DPA blood levels in mothers were associated with lower allergic diseases in children and mothers. These findings were recently well reviewed [6] and are not detailed here.

5. Conclusion and prospects

An increasing number of association studies support the hypothesis that DPA is a bioactive fatty acid beneficial to human health. The suggested mechanisms involve the importance of DPA-derived lipid metabolites in the pro-resolution of inflammation in various models and mainly the importance of protectin-1 and resolvin-D5 found in humans. Many other DPA-derived metabolites have also recently been identified and their potential physiological effects are not yet known. Likewise, *in vivo* and *in vitro* studies suggest that DPA is implied in the improvement of cardiovascular and metabolic disease risk markers, especially plasma lipid parameters, platelet aggregation, insulin sensitivity and cellular plasticity. Moreover, DPA is the most abundant n-3 LCPUFA in the brain after DHA and it could be specifically beneficial for elderly neuroprotection, and early-life development. Nevertheless, there is still a lack of clinical intervention studies in humans to elucidate the specific biological effects of DPA and its underlying mechanisms and no studies are currently underway (search on ClinicalTrials.gov, September 21, 2018). The increase in commercial DPA availability as well as the efficiency and diversity of DPA purification methods should facilitate the implementation of new studies in the coming years.

While the effects associated with n-3 LCPUFA are studied independently, it remains difficult to differentiate the effects specific to DPA itself compared to those of EPA and DHA as they are biologically interconverted. For this, labeled-DPA monitoring studies are necessary to better understand the independent effects of DPA compared to other n-3 LCPUFA. In contrast, dietary DPA appears to be a good source of EPA and a low source of DHA in major metabolic organs, in addition to being well assimilated. The DPA could thus contribute to increasing the omega-3 status. Indeed, DPA is more present in meat than EPA or DHA and while the sources of fatty fish are limited, its food consumption is not negligible and DPA should surely be considered as well as DHA and EPA within the next nutritional recommendations. While food sources most often contain a mix of different n-3 LCPUFAs, they are studied independently, and it would be interesting to see if the impact of dietary DPA alone on omega-3 status is of nutritional interest compared to a mixture of n-3 LCPUFA representative of human consumption.

6. Acknowledgments

We thank Pr. Thierry Durand (Institute of Biomolecules Max Mousseron, Montpellier, France) for the design of isoprostanes and Daniel for his help in the figure realization.

7. *References*

- [1] J.K. Innes, P.C. Calder, The differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiometabolic risk factors: A systematic review, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19020532.
- [2] S.C. Dyall, Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA, *Front. Aging Neurosci.* 7 (2015). doi:10.3389/fnagi.2015.00052.
- [3] J.J. Rhee, E. Kim, J.E. Buring, T. Kurth, Fish Consumption, Omega-3 Fatty Acids, and Risk of Cardiovascular Disease, *Am. J. Prev. Med.* 52 (2017) 10–19. doi:10.1016/j.amepre.2016.07.020.
- [4] O.A. Byelashov, A.J. Sinclair, G. Kaur, Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid, *Lipid Technol.* 27 (2015) 79–82. doi:10.1002/lite.201500013.
- [5] B. Delplanque, R. Gibson, B. Koletzko, A. Lapillonne, B. Strandvik, Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 61 (2015) 8–17. doi:10.1097/MPG.0000000000000818.
- [6] J. Li, H. Yin, D.M. Bibus, O.A. Byelashov, The role of Omega-3 docosapentaenoic acid in pregnancy and early development, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118 (2016) 1692–1701. doi:10.1002/ejlt.201600076.
- [7] P.G. Yazdi, A review of the biologic and pharmacologic role of docosapentaenoic acid n-3, *F1000Research.* (2014). doi:10.12688/f1000research.2-256.v2.
- [8] G. Kaur, D. Cameron-Smith, M. Garg, A.J. Sinclair, Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects, *Prog. Lipid Res.* 50 (2011) 28–34. doi:10.1016/j.plipres.2010.07.004.
- [9] G. Kaur, X.F. Guo, A.J. Sinclair, Short update on docosapentaenoic acid: A bioactive long-chain n-3 fatty acid, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 19 (2016) 88–91. doi:10.1097/MCO.0000000000000252.
- [10] A. Vik, J. Dalli, T.V. Hansen, Recent advances in the chemistry and biology of anti-inflammatory and specialized pro-resolving mediators biosynthesized from n-3

docosapentaenoic acid, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 2259–2266. doi:10.1016/j.bmcl.2017.03.079.

[11] K.H. Weylandt, Docosapentaenoic acid derived metabolites and mediators – The new world of lipid mediator medicine in a nutshell, *Eur. J. Pharmacol.* 785 (2016) 108–115. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.002.

[12] C. von Schacky, W.S. Harris, Why docosapentaenoic acid is not included in the Omega-3 Index, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 135 (2018) 18–21. doi:10.1016/j.plefa.2018.06.003.

[13] X. fei Guo, A.J. Sinclair, G. Kaur, D. Li, Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* (2017). doi:10.1016/j.plefa.2017.09.011.

[14] G. Kaur, J.C. Molero, H.S. Weisinger, A.J. Sinclair, Orally administered [14C]DPA and [14C]DHA are metabolised differently to [14C]EPA in rats, *Br. J. Nutr.* 109 (2013) 441–448. doi:10.1017/S0007114512001419.

[15] R.A. Alvarez, G.D. Aguirre, G.M. Acland, R.E. Anderson, Docosapentaenoic acid is converted to docosahexaenoic acid in the retinas of normal and pred-affected miniature poodle dogs, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (1994) 402–408.

[16] R. Yamamura, Y. Shimomura, Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1435–1440. doi:10.1007/s11746-997-0250-6.

[17] H. Mu, J. Jin, D. Xie, X. Zou, X. Wang, X. Wang, Q. Jin, Combined Urea Complexation and Argentated Silica Gel Column Chromatography for Concentration and Separation of PUFAs from Tuna Oil: Based on Improved DPA Level, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 93 (2016) 1157–1167. doi:10.1007/s11746-016-2842-5.

[18] X. Wang, X. Wang, W. Wang, Q. Jin, X. Wang, Synthesis of docosapentaenoic acid-enriched diacylglycerols by enzymatic glycerolysis of *Schizochytrium* sp. oil, *Bioresour. Technol.* 262 (2018) 278–283. doi:10.1016/j.biortech.2018.04.061.

[19] S. Tanaka, T. Yaguchi, S. Shimizu, T. Sogo, S. Fujikawa, United States Patent, Patent-US 6509178 B1, 2003.

- [20] H. Ding, Y. Zhang, S. Xu, W. Wang, Process for preparing and separating methyl docosapentaenoate and methyl docosahexenoate, Patent-CN101265185B, 2008.
- [21] S. Tanaka, T. Yaguchi, Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, Patent-WO1998003671, 1997.
- [22] S. Forin, Polyunsaturated fatty acid monoglycerides, derivatives, and uses thereof - Patent - PubChem, Patent-US8119690, 2012.
- [23] X. Shao, G. Bor, S. Al-Hosayni, S. Salentinig, A. Yagmur, Structural Characterization of Self-Assemblies of New Omega-3 Lipids: Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Monoglycerides, *Phys. Chem. Chem. Phys.* In press (2018). doi:10.1039/C8CP04256J.
- [24] R. Khaddaj-Mallat, C. Morin, i¹/₂ric Rousseau, Novel n-3 PUFA monoacylglycerides of pharmacological and medicinal interest: Anti-inflammatory and anti-proliferative effects, *Eur. J. Pharmacol.* 792 (2016) 70–77. doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.038.
- [25] G. Drouin, E. Guillocheau, D. Catheline, C. Baudry, P. Le Ruyet, V. Rioux, P. Legrand, The impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation on fatty acid composition in rat differs depending upon tissues and is influenced by the presence of dairy lipids in the diet, *J. Agric. Food Chem.* (2018) acs.jafc.8b03069. doi:10.1021/acs.jafc.8b03069.
- [26] G. Drouin, D. Catheline, E. Guillocheau, P. Gueret, C. Baudry, P. le Ruyet, V. Rioux, P. Legrand, Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition, *J. Nutr. Biochem.* in press (2018).
- [27] L.M. Magallanes, L. V Tarditto, N.R. Grosso, M.C. Pramparo, M.F. Gayol, Highly concentrated omega-3 fatty acid ethyl esters by urea complexation and molecular distillation, *J. Sci. Food Agric.* (2018). doi:10.1002/jsfa.9258.
- [28] K.C. Maki, G. Bobotas, M.R. Dicklin, M. Huebner, W.F. Keane, Effects of MAT9001 containing eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid, compared to eicosapentaenoic acid ethyl esters, on triglycerides, lipoprotein cholesterol, and related variables, *J. Clin. Lipidol.* 11 (2017) 102–109. doi:10.1016/j.jacl.2016.10.010.
- [29] H.O. Bang, J. Dyerberg, H.M. Sinclair, The composition of the Eskimo food in north Western Greenland, *Am. J. Clin. Nutr.* 33 (1980) 2657–2661. doi:10.1093/ajcn/33.12.2657.

- [30] H.O. Bang, J. Dyerberg, Lipid Metabolism and Ischemic Heart Disease in Greenland Eskimos, in: *Adv. Nutr. Res.*, Springer US, Boston, MA, 1980: pp. 1–22. doi:10.1007/978-1-4757-4448-4_1.
- [31] P.. Williams, V.. Droulez, G.. Levy, T.. Stobaus, Composition of Australian red meat 2002 3. Nutrient profile, *Food Aust.* 59 (2007) 331–341.
- [32] B. Sciences, P.G. Williams, V. Droulez, Australian red meat consumption – predominantly lean in response to public health and consumer demand, 62 (2010) 87–94.
- [33] C. Morin, P.U. Blier, S. Fortin, Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potent than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model, *Arthritis Res. Ther.* 17 (2015). doi:10.1186/s13075-015-0653-y.
- [34] D. Ąrednicka-Tober, M. Barański, C. Seal, R. Sanderson, C. Benbrook, H. Steinshamn, J. Gromadzka-Ostrowska, E. Rembiałkowska, K. Skwarło-Sońta, M. Eyre, G. Cozzi, M. Krogh Larsen, T. Jordon, U. Niggli, T. Sakowski, P.C. Calder, G.C. Burdge, S. Sotiraki, A. Stefanakis, H. Yolcu, S. Stergiadis, E. Chatzidimitriou, G. Butler, G. Stewart, C. Leifert, Composition differences between organic and conventional meat: A systematic literature review and meta-analysis, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 994–1011. doi:10.1017/S0007114515005073.
- [35] J.M. Curtis, B.A. Black, Analysis of omega-3 fatty acids in foods and supplements, in: *Food Enrich. with Omega-3 Fat. Acids*, Woodhead Publishing, 2013: pp. 226–254. doi:10.1533/9780857098863.2.226.
- [36] P.G. Toral, G. Hervás, H. Leskinen, K.J. Shingfield, P. Frutos, In vitro ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in cows and ewes: Intermediate metabolites and pathways, *J. Dairy Sci.* 101 (2018) 6109–6121. doi:10.3168/jds.2017-14183.
- [37] S.C.I. Enti, F.I.C. Opi, N.I. On, Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA), *EFSA J.* 10 (2012) 1–48. doi:10.2903/j.efsa.2012.2815.
- [38] S. Rahmawaty, K. Charlton, P. Lyons-Wall, B.J. Meyer, Dietary intake and food sources of EPA, DPA and DHA in Australian children, *Lipids.* 48 (2013) 869–877. doi:10.1007/s11745-013-3812-4.

- [39] European Food Safety Authority, Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol, *EFSA J.* 8 (2010) 1461. doi:10.2903/j.efsa.2010.1461.
- [40] P. Howe, B. Meyer, S. Record, K. Baghurst, Dietary intake of long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids: Contribution of meat sources, *Nutrition.* 22 (2006) 47–53. doi:10.1016/j.nut.2005.05.009.
- [41] S. Leng, M.A. Picchi, Y. Tesfaigzi, G. Wu, W. James Gauderman, F. Xu, F.D. Gilliland, S.A. Belinsky, Dietary nutrients associated with preservation of lung function in hispanic and Non-Hispanic white smokers from New Mexico, *Int. J. COPD.* 12 (2017) 3171–3181. doi:10.2147/COPD.S142237.
- [42] L.M. Arterburn, E.B. Hall, H. Oken, Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) S1467–1476S. doi:10.1093/ajcn/83.6.1467s.
- [43] K. Kuhnt, C. Fuhrmann, M. Kohler, M. Kiehntopf, G. Jahreis, Dietary Echium Oil Increases Long-Chain n-3 PUFAs, Including Docosapentaenoic Acid, in Blood Fractions and Alters Biochemical Markers for Cardiovascular Disease Independently of Age, Sex, and Metabolic Syndrome, *J. Nutr.* 144 (2014) 447–460. doi:10.3945/jn.113.180802.
- [44] K. Kuhnt, S. Weiß, M. Kiehntopf, G. Jahreis, Consumption of echium oil increases EPA and DPA in blood fractions more efficiently compared to linseed oil in humans, *Lipids Health Dis.* 15 (2016) 1–11. doi:10.1186/s12944-016-0199-2.
- [45] M.L. Gianni, P. Roggero, C. Baudry, C. Fressange-Mazda, C. Galli, C. Agostoni, P. Le Ruyet, F. Mosca, An infant formula containing dairy lipids increased red blood cell membrane Omega 3 fatty acids in 4 month-old healthy newborns: A randomized controlled trial, *BMC Pediatr.* 18 (2018) 1–8. doi:10.1186/s12887-018-1047-5.
- [46] G. Drouin, D. Catheline, A. Siquin, C. Baudry, P. Le Ruyet, V. Rioux, P. Legrand, Incorporation of dairy lipids in the diet increased long-chain Omega-3 fatty acids status in post-weaning rats., *Front. Nutr.* (2018) in press. doi:10.3389/FNUT.2018.00042.
- [47] K.D. Stark, M.E. Van Elswyk, M.R. Higgins, C.A. Weatherford, N. Salem, Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults, *Prog. Lipid Res.* 63 (2016) 132–152. doi:10.1016/j.plipres.2016.05.001.

- [48] D. Bibus, B. Lands, Balancing proportions of competing omega-3 and omega-6 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in tissue lipids, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 99 (2015) 19–23. doi:10.1016/j.plefa.2015.04.005.
- [49] W.S. Harris, C. Von Schacky, The Omega-3 Index: A new risk factor for death from coronary heart disease?, *Prev. Med. (Baltim).* 39 (2004) 212–220. doi:10.1016/j.ypmed.2004.02.030.
- [50] W.S. Harris, L. Del Gobbo, N.L. Tintle, The Omega-3 Index and relative risk for coronary heart disease mortality: Estimation from 10 cohort studies, *Atherosclerosis.* 262 (2017) 51–54. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.007.
- [51] V. Contreras, M.J. Toro, A.R. Eliás-Boneta, A. Encarnación-Burgos, Effectiveness of silver diamine fluoride in caries prevention and arrest: A systematic literature review, *Gen. Dent.* 65 (2017) 22–29. doi:10.5588/ijtld.16.0716.Isoniazid.
- [52] Nhmrc, *Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes*, 2005.
- [53] Gezondheidsraad, *Guidelines for healthy diet 2006*, (2006) 110. https://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/200621E_0.pdf.
- [54] M.K. Gregory, L.G. Cleland, M.J. James, Molecular basis for differential elongation of omega-3 docosapentaenoic acid by the rat Elovl5 and Elovl2, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2851–2857. doi:10.1194/jlr.M041368.
- [55] M.K. Gregory, R.A. Gibson, R.J. Cook-Johnson, L.G. Cleland, M.J. James, Elongase reactions as control points in Long-Chain polyunsaturated fatty acid synthesis, *PLoS One.* 6 (2011) e29662. doi:10.1371/journal.pone.0029662.
- [56] H.G. Park, W.J. Park, K.S.D. Kothapalli, J.T. Brenna, The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes $\Delta 4$ desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells, *FASEB J.* 29 (2015) 3911–3919. doi:10.1096/fj.15-271783.
- [57] E. Miller, G. Kaur, A. Larsen, S.P. Loh, K. Linderborg, H.S. Weisinger, G.M. Turchini, D. Cameron-Smith, A.J. Sinclair, A short-term n-3 DPA supplementation study in humans, *Eur. J. Nutr.* 52 (2013) 895–904. doi:10.1007/s00394-012-0396-3.

- [58] G. Kaur, D.P. Begg, D. Barr, M. Garg, D. Cameron-Smith, A.J. Sinclair, Short-term docosapentaenoic acid (22:5n-3) supplementation increases tissue docosapentaenoic acid, DHA and EPA concentrations in rats, *Br. J. Nutr.* 103 (2010) 32–37. doi:10.1017/S0007114509991334.
- [59] N. Gotoh, K. Nagao, S. Onoda, B. Shirouchi, R. Furuya, T. Nagai, H. Mizobe, K. Ichioka, H. Watanabe, T. Anagita, S. Wada, Effects of three different highly purified n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in C57BL/KsJ-dbl db mice, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 11047–11054. doi:10.1021/jf9026553.
- [60] L. Kelly, B. Grehan, A. Della Chiesa, S.M. O'Mara, E. Downer, G. Sahyoun, K.A. Massey, A. Nicolaou, M.A. Lynch, The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat, *Neurobiol. Aging.* 32 (2011) 2318.e1-2318.e15. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.001.
- [61] F. Achard, C. Bénistant, M. Lagarde, Interconversions and distinct metabolic fate of eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in bovine aortic endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1255 (1995) 260–266. doi:10.1016/0005-2760(94)00238-T.
- [62] T. Kanayasu-Toyoda, I. Morita, S.I. Murota, Docosapentaenoic acid (22:5, n-3), an elongation metabolite of eicosapentaenoic acid (20:5, n-3), is a potent stimulator of endothelial cell migration on pretreatment in vitro, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 54 (1996) 319–325. doi:10.1016/S0952-3278(96)90045-9.
- [63] G. Kaur, A.J. Sinclair, D. Cameron-Smith, D.P. Barr, J.C. Molero-Navajas, N. Konstantopoulos, Docosapentaenoic acid (22:5n-3) down-regulates the expression of genes involved in fat synthesis in liver cells, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 85 (2011) 155–161. doi:10.1016/j.plefa.2011.06.002.
- [64] A. Pawar, D.B. Jump, Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor ?? activity in rat primary hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35931–35939. doi:10.1074/jbc.M306238200.
- [65] Y. Tian, D. Romanazzi, K. Miyashita, M. Hosokawa, Bioconversion of Docosapentaenoic Acid in Human Cell Lines, Caco-2, HepG2, and THP-1, *J. Oleo Sci.* 65 (2016) 1017–1022. doi:10.5650/jos.ess16128.

- [66] E. Christensen, B. Woldseth, T.A. Hagve, B.T. Poll-The, R.J. Wanders, H. Sprecher, O. Stokke, B.O. Christophersen, Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase, *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 215 (1993) 61–74.
- [67] B.J. Holub, P. Swidinsky, E. Park, Oral docosapentaenoic acid (22:5n-3) is differentially incorporated into phospholipid pools and differentially metabolized to eicosapentaenoic acid in tissues from young rats, *Lipids.* 46 (2011) 399–407. doi:10.1007/s11745-011-3535-3.
- [68] S. Ghasemi Fard, K.M. Linderborg, G.M. Turchini, A.J. Sinclair, Comparison of the bioavailability of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5N-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) in the rat, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 90 (2014) 23–26. doi:10.1016/j.plefa.2013.10.001.
- [69] T.O. Akanbi, A.J. Sinclair, C.J. Barrow, Pancreatic lipase selectively hydrolyses DPA over EPA and DHA due to location of double bonds in the fatty acid rather than regioselectivity, *Food Chem.* 160 (2014) 61–66. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.092.
- [70] M. Aursnes, J.E. Tungen, A. Vik, R. Colas, C.C. Cheng, J. Dalli, C.N. Serhan, T. V. Hansen, Total Synthesis of the Lipid Mediator PD1, (2013) 4–10. doi:10.1021/np4009865.
- [71] J.E. Tungen, M. Aursnes, J. Dalli, H. Arnardottir, C.N. Serhan, T.V. Hansen, Total Synthesis of the Anti-inflammatory and Pro-resolving Lipid Mediator MaR1 n-3 DPA Utilizing an sp³-sp³ Negishi Cross-Coupling Reaction, *Chem. - A Eur. J.* 20 (2014) 14575–14578. doi:10.1002/chem.201404721.
- [72] M. Aursnes, J.E. Tungen, A. Vik, R. Colas, C.Y.C. Cheng, J. Dalli, C.N. Serhan, T. V. Hansen, Total synthesis of the lipid mediator PD1n-3 DPA: Configurational assignments and anti-inflammatory and pro-resolving actions, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 910–916. doi:10.1021/np4009865.
- [73] T.V. Hansen, J. Dalli, C.N. Serhan, The novel lipid mediator PD1n-3 DPA: An overview of the structural elucidation, synthesis, biosynthesis and bioactions, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 133 (2017) 103–110. doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.06.003.
- [74] J. Dalli, R.A. Colas, C.N. Serhan, Novel n-3 immunoresolvents: Structures and actions, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1940. doi:10.1038/srep01940.

- [75] K. Pistorius, P.R. Souza, R. De Matteis, S. Austin-Williams, K.G. Primdahl, A. Vik, F. Mazzacuva, R.A. Colas, R.M. Marques, T. V. Hansen, J. Dalli, PDn-3 DPAPathway Regulates Human Monocyte Differentiation and Macrophage Function, *Cell Chem. Biol.* 25 (2018) 749–760.e9. doi:10.1016/j.chembiol.2018.04.017.
- [76] K.G. Primdahl, J.E. Tungen, P.R.S. De Souza, R.A. Colas, J. Dalli, T.V. Hansen, A. Vik, Stereocontrolled synthesis and investigation of the biosynthetic transformations of 16(S),17(S)-epoxy-PDn-3 DPA, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 8606–8613. doi:10.1039/c7ob02113e.
- [77] B. Dangi, M. Obeng, J.M. Nauroth, M. Teymourlouei, M. Needham, K. Raman, L.M. Arterburn, Biogenic synthesis, purification, and chemical characterization of anti-inflammatory resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPAn-6), *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 14744–14759. doi:10.1074/jbc.M809014200.
- [78] J.F. Markworth, G. Kaur, E.G. Miller, A.E. Larsen, A.J. Sinclair, K.R. Maddipati, D. Cameron-Smith, Divergent shifts in lipid mediator profile following supplementation with n-3 docosapentaenoic acid and eicosapentaenoic acid, *FASEB J.* 30 (2016) 3714–3725. doi:10.1096/fj.201600360R.
- [79] O. Kuda, Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid, *Biochimie.* 136 (2017) 12–20. doi:10.1016/j.biochi.2017.01.002.
- [80] C.N. Serhan, J. Dalli, R.A. Colas, J.W. Winkler, N. Chiang, Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851 (2015) 397–413. doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.006.
- [81] A. Dupuy, P. Le Faouder, C. Vigor, C. Oger, J.M. Galano, C. Dray, J.C.Y. Lee, P. Valet, C. Gladine, T. Durand, J. Bertrand-Michel, Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples, *Anal. Chim. Acta.* 921 (2016) 46–58. doi:10.1016/j.aca.2016.03.024.
- [82] P. Le Faouder, V. Baillif, I. Spreadbury, J.P. Motta, P. Rousset, G. Chêne, C. Guigné, F. Tercé, S. Vanner, N. Vergnolle, J. Bertrand-Michel, M. Dubourdeau, N. Cenac, LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 932 (2013) 123–133. doi:10.1016/j.jchromb.2013.06.014.

- [83] I. De las Heras-Gómez, S. Medina, T. Casas-Pina, L. Marín-Soler, A. Tomás, P. Martínez-Hernández, C. Oger, J.M. Galano, T. Durand, L. Jimeno, S. Llorente, E. Lozoya, F. Ferreres, Á. Gil-Izquierdo, Potential applications of lipid peroxidation products – F4-neuroprostanes, F3-neuroprostanesn-6 DPA, F2-dihomo-isoprostanes and F2-isoprostanes - in the evaluation of the allograft function in renal transplantation, *Free Radic. Biol. Med.* 104 (2017) 178–184. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.019.
- [84] C.N. Serhan, Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology, *Mol. Aspects Med.* 58 (2017) 1–11. doi:10.1016/j.mam.2017.03.001.
- [85] T. Gobbetti, J. Dalli, R.A. Colas, D. Federici Canova, M. Aursnes, D. Bonnet, L. Alric, N. Vergnolle, C. Deraison, T. V. Hansen, C.N. Serhan, M. Perretti, Protectin D1 n-3 DPA and resolvin D5 n-3 DPA are effectors of intestinal protection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) 3963–3968. doi:10.1073/pnas.1617290114.
- [86] J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Elucidation of novel 13-series resolvins that increase with atorvastatin and clear infections, *Nat. Med.* 21 (2015) 1071–1075. doi:10.1038/nm.3911.
- [87] Y. Tian, A. Katsuki, D. Romanazzi, M.R. Miller, S.L. Adams, K. Miyashita, M. Hosokawa, Docosapentaenoic acid (22:5n-3) Downregulates mRNA Expression of Pro-inflammatory Factors in LPS-activated Murine Macrophage Like RAW264.7 Cells, *J. Oleo Sci.* (2017). doi:10.5650/jos.ess17111.
- [88] C. Morin, É. Rousseau, S. Fortin, Anti-proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride in colorectal carcinoma cells, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 89 (2013) 203–213. doi:10.1016/j.plefa.2013.07.004.
- [89] C. Morin, R. Hiram, E. Rousseau, P.U. Blier, S. Fortin, Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 307 (2014) H574–H586. doi:10.1152/ajpheart.00814.2013.
- [90] C. Vallières, S.L. Holland, S. V. Avery, Mitochondrial Ferredoxin Determines Vulnerability of Cells to Copper Excess, 2017. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.005.
- [91] M. Labonté^{1/2}, Dewailly, M. Lucas, P. Couture, B. Lamarche, Association of red blood cell n-3 polyunsaturated fatty acids with plasma inflammatory biomarkers among the Quebec Cree population, *Eur. J. Clin. Nutr.* 68 (2014) 1042–1047. doi:10.1038/ejcn.2014.125.

- [92] E. Kishida, M. Tajiri, Y. Masuzawa, Docosahexaenoic acid enrichment can reduce L929 cell necrosis induced by tumor necrosis factor, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1761 (2006) 454–462. doi:10.1016/j.bbailip.2006.03.023.
- [93] M. Tsuji, S. Murota, I.M.- Prostaglandins, leukotrienes and essential Fatty, U. 2003, Docosapentaenoic acid (22: 5, n-3) suppressed tube-forming activity in endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor, Elsevier. 68 (2003) 337–342. doi:10.1016/s0952-3278(03)00025-5.
- [94] J.K. Bassett, A.M. Hodge, D.R. English, R.J. MacInnis, G.G. Giles, Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk, *Cancer Causes Control*. 27 (2016) 759–773. doi:10.1007/s10552-016-0753-2.
- [95] J. Xu, N.C. Gaddis, T.M. Bartz, R. Hou, A.W. Manichaikul, N. Pankratz, A. V. Smith, F. Sun, N. Terzikhan, C.A. Markunas, B.K. Patchen, M. Schu, M.A. Beydoun, G.G. Brusselle, G. Eiriksdottir, X. Zhou, A.C. Wood, M. Graff, T.B. Harris, M.A. Ikram, D.R. Jacobs, Jr., L.J. Launer, R.N. Lemaitre, G. O’Connor, E.C. Oelsner, B.M. Psaty, V.S. Ramachandran, R.R. Rohde, S.S. Rich, J.I. Rotter, S. Seshadri, L.J. Smith, H. Tiemeier, M.Y. Tsai, A.G. Uitterlinden, V.S. Voruganti, H. Xu, N.R. Zilhão, M. Fornage, M.C. Zillikens, S.J. London, R.G. Barr, J. Dupuis, S.A. Gharib, V. Gudnason, L. Lahousse, K.E. North, L.M. Steffen, P.A. Cassano, D.B. Hancock, Omega-3 Fatty Acids and Genome-wide Interaction Analyses Reveal DPP10 - Pulmonary Function Association, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2018) rccm.201802-0304OC. doi:10.1164/rccm.201802-0304OC.
- [96] R. Khaddaj-Mallat, R. Hiram, C. Sirois, M. Sirois, E. Rizcallah, S. Marouan, C. Morin, É. Rousseau, MAG-DPA curbs inflammatory biomarkers and pharmacological reactivity in cytokine-triggered hyperresponsive airway models, *Pharmacol. Res. Perspect.* 4 (2016) e00263. doi:10.1002/prp2.263.
- [97] X. Dai, Y. Chen, F. Zeng, L. Sun, C. Chen, Y. Su, Association between n-3 polyunsaturated fatty acids in erythrocytes and metabolic syndrome in Chinese men and women, *Eur. J. Nutr.* 55 (2016) 981–989. doi:10.1007/s00394-015-0912-3.
- [98] X. Guo, X. Li, M. Shi, D. Li, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis, *Nutrients*. 9 (2017) 703. doi:10.3390/nu9070703.
- [99] E. Oda, K. Hatada, J. Kimura, Y. Aizawa, P.V. Thanikachalam, K. Watanabe, Relationships between serum unsaturated fatty acids and coronary risk factors: negative

relations between nervonic acid and obesity-related risk factors., *Int. Heart J.* 46 (2005) 975–985. doi:JST.JSTAGE/ihj/46.975 [pii].

[100] T. Rissanen, S. Voutilainen, K. Nyyssonen, T.A. Lakka, J.T. Salonen, Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Circulation*. 102 (2000) 2677–2679. doi:10.1161/01.CIR.102.22.2677.

[101] K. Miura, M.C.B. Hughes, J.P. Ungerer, A.C. Green, Plasma eicosapentaenoic acid is negatively associated with all-cause mortality among men and women in a population-based prospective study, *Nutr. Res.* 36 (2016) 1202–1209. doi:10.1016/j.nutres.2016.09.006.

[102] L.C. Del Gobbo, F. Imamura, S. Aslibekyan, M. Marklund, J.K. Virtanen, M. Wennberg, M.Y. Yakoob, S.E. Chiuve, L. Dela Cruz, A.C. Frazier-Wood, A.M. Fretts, E. Guallar, C. Matsumoto, K. Prem, T. Tanaka, J.H.Y. Wu, X. Zhou, C. Helmer, E. Ingelsson, J.M. Yuan, P. Barberger-Gateau, H. Campos, P.H.M. Chaves, L. Djoussé, G.G. Giles, J. Gómez-Aracena, A.M. Hodge, F.B. Hu, J.H. Jansson, I. Johansson, K.T. Khaw, W.P. Koh, R.N. Lemaitre, L. Lind, R.N. Luben, E.B. Rimm, U. Risérus, C. Samieri, P.W. Franks, D.S. Siscovick, M. Stampfer, L.M. Steffen, B.T. Steffen, M.Y. Tsai, R.M. Van Dam, S. Voutilainen, W.C. Willett, M. Woodward, D. Mozaffarian, ω -3 Polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: Pooling project of 19 cohort studies, *JAMA Intern. Med.* 176 (2016) 1155–1166. doi:10.1001/jamainternmed.2016.2925.

[103] F. Paganelli, J.M. Maixent, M.J. Duran, R. Parhizgar, G. Pieroni, S. Sennoune, Altered erythrocyte n-3 fatty acids in Mediterranean patients with coronary artery disease, *Int. J. Cardiol.* 78 (2001) 27–32. doi:10.1016/S0167-5273(00)00442-3.

[104] G.C. Leng, D.F. Horrobin, F.G. Fowkes, F.B. Smith, G.D. Lowe, P.T. Donnan, K. Ells, Plasma essential fatty acids, cigarette smoking, and dietary antioxidants in peripheral arterial disease. A population-based case-control study., *Arterioscler. Thromb.* 14 (1994) 471–478. doi:10.1161/01.ATV.14.3.471.

[105] A. Hino, H. Adachi, K. Toyomasu, N. Yoshida, M. Enomoto, A. Hiratsuka, Y. Hirai, A. Satoh, T. Imaizumi, Very long chain N-3 fatty acids intake and carotid atherosclerosis: An epidemiological study evaluated by ultrasonography, *Atherosclerosis*. 176 (2004) 145–149. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.020.

[106] N. A.N., T. T.-P., K. J., V. S., A.N. Nyantika, T.-P. Tuomainen, J. Kauhanen, S. Voutilainen, J.K. Virtanen, Serum long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and risk of

orthostatic hypotension, *Hypertens. Res.* 39 (2016) 543–547. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/hr.2016.19>.

[107] T.L. Schumacher, T.L. Burrows, M.E. Rollo, L.G. Wood, R. Callister, C.E. Collins, Comparison of fatty acid intakes assessed by a cardiovascular-specific food frequency questionnaire with red blood cell membrane fatty acids in hyperlipidaemic Australian adults: A validation study, *Eur. J. Clin. Nutr.* 70 (2016) 1433–1438. doi:[10.1038/ejcn.2016.144](https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.144).

[108] J.M. Norris, M. Kroehl, T.E. Fingerlin, B.N. Frederiksen, J. Seifert, R. Wong, M. Clare-Salzler, M. Rewers, Erythrocyte membrane docosapentaenoic acid levels are associated with islet autoimmunity: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young, *Diabetologia.* 57 (2014) 295–304. doi:[10.1007/s00125-013-3106-7](https://doi.org/10.1007/s00125-013-3106-7).

[109] J.-P. Huang, M.-L. Cheng, C.-Y. Hung, C.-H. Wang, P.-S. Hsieh, M.-S. Shiao, J.-K. Chen, D.-E. Li, L.-M. Hung, Docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are positively associated with insulin sensitivity in rats fed high-fat and high-fructose diets, *J. Diabetes.* 9 (2016) 936–946. doi:[10.1111/1753-0407.12505](https://doi.org/10.1111/1753-0407.12505).

[110] D.C.L. Masquio, A. de Piano-Ganen, L.M. Oyama, R.M. da S. Campos, A.B. Santamarina, G.I. de M.H. de Souza, A.D.O. Gomes, R.G. Moreira, F.C. Corgosinho, C.M.O. do Nascimento, L. Tock, S. Tufik, M.T. de Mello, A.R. Dâmaso, The role of free fatty acids in the inflammatory and cardiometabolic profile in adolescents with metabolic syndrome engaged in interdisciplinary therapy, *J. Nutr. Biochem.* 33 (2016) 136–144. doi:[10.1016/j.jnutbio.2016.03.017](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.017).

[111] A.C. Skulas-Ray, M.R. Flock, C.K. Richter, W.S. Harris, S.G. West, P.M. Kris-Etherton, Red blood cell docosapentaenoic acid (DPA n-3) is inversely associated with triglycerides and C-reactive protein (CRP) in healthy adults and dose-dependently increases following n-3 fatty acid supplementation, *Nutrients.* 7 (2015) 6390–6404. doi:[10.3390/nu7085291](https://doi.org/10.3390/nu7085291).

[112] J. Chen, Y. Jiang, Y. Liang, X. Tian, C. Peng, K.Y. Ma, J. Liu, Y. Huang, Z.Y. Chen, DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet, *Atherosclerosis.* 221 (2012) 397–404. doi:[10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.005](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.005).

[113] K. Nagao, K. Nakamitsu, H. Ishida, K. Yoshinaga, T. Nagai, H. Mizobe, K. Kojima, T. Yanagita, F. Beppu, N. Gotoh, Comparison of the lipid-lowering effects of four different n-3

highly unsaturated fatty acids in HepG2 cells., *J. Oleo Sci.* 63 (2014) 979–985. doi:10.5650/jos.ess14118.

[114] K.M. Linderborg, G. Kaur, E. Miller, P.J. Meikle, A.E. Larsen, J.M. Weir, A. Nuora, C.K. Barlow, H.P. Kallio, D. Cameron-Smith, A.J. Sinclair, Postprandial metabolism of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) in humans, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 88 (2013) 313–319. doi:10.1016/j.plefa.2013.01.010.

[115] S. AKIBA, T. MURATA, K. KITATANI, T. SATO, Involvement of Lipoxygenase Pathway in Docosapentaenoic Acid-Induced Inhibition of Platelet Aggregation., *Biol. Pharm. Bull.* 23 (2000) 1293–1297. doi:10.1248/bpb.23.1293.

[116] M. Phang, L.F. Lincz, M.L. Garg, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid Supplementations Reduce Platelet Aggregation and Hemostatic Markers Differentially in Men and Women, *J. Nutr.* 143 (2013) 457–463. doi:10.3945/jn.112.171249.

[117] M. Phang, M.L. Garg, A.J. Sinclair, Inhibition of platelet aggregation by omega-3 polyunsaturated fatty acids is gender specific-Redefining platelet response to fish oils, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 81 (2009) 35–40. doi:10.1016/j.plefa.2009.05.001.

[118] M.Y. Abeywardena, M. Adams, J. Dallimore, S.M. Kitessa, Rise in DPA following SDA-rich dietary echium oil less effective in affording anti-arrhythmic actions compared to high DHA levels achieved with fish oil in Sprague-Dawley rats, *Nutrients.* 8 (2016) 14. doi:10.3390/nu8010014.

[119] Y. Zhang, M. Zhang, B. Lyu, H. Kishi, S. Kobayashi, Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation, *Sci. Rep.* 7 (2017) 36368. doi:10.1038/srep36368.

[120] K. Goozee, P. Chatterjee, I. James, K. Shen, H.R. Sohrabi, P.R. Asih, P. Dave, B. Ball, C. Manyan, K. Taddei, R. Chung, M.L. Garg, R.N. Martins, Alterations in erythrocyte fatty acid composition in preclinical Alzheimer's disease, *Sci. Rep.* 7 (2017) 676. doi:10.1038/s41598-017-00751-2.

[121] T.A. D'Ascoli, J. Mursu, S. Voutilainen, J. Kauhanen, T.P. Tuomainen, J.K. Virtanen, Association between serum long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive

performance in elderly men and women: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Eur. J. Clin. Nutr.* 70 (2016) 970–975. doi:10.1038/ejcn.2016.59.

[122] B.M.J. Merle, B. Buaud, J.F. Korobelnik, A. Bron, M.N. Delyfer, M.B. Rougier, H. Savel, C. Vaysse, C. Creuzot-Garcher, C. Delcourt, Plasma long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and macular pigment in subjects with family history of age-related macular degeneration: the Limpia Study, *Acta Ophthalmol.* 95 (2017) e763–e769. doi:10.1111/aos.13408.

[123] C.H. Laino, P. Garcia, M.F. Podestá, C. Höcht, N. Slobodianik, A. Reinés, Fluoxetine potentiation of omega-3 fatty acid antidepressant effect: Evaluating pharmacokinetic and brain fatty acid-related aspects in rodents, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 3316–3325. doi:10.1002/jps.24123.

[124] Y.J. Matsuoka, N. Sawada, M. Mimura, R. Shikimoto, S. Nozaki, K. Hamazaki, Y. Uchitomi, S. Tsugane, Dietary fish, n-3 polyunsaturated fatty acid consumption, and depression risk in Japan: a population-based prospective cohort study, *Transl. Psychiatry.* 7 (2017) e1242. doi:10.1038/tp.2017.206.

[125] Y. Jin, T.H. Kim, Y. Park, Association between erythrocyte levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and depression in postmenopausal women using or not using hormone therapy, *Menopause.* 23 (2016) 1012–1018. doi:10.1097/GME.0000000000000667.

[126] A.N. Kokoli, S.N. Lavrentiadou, I.A. Zervos, M.P. Tsantarliotou, M.P. Georgiadis, E.A. Nikolaidis, N. Botsoglou, C.M. Boscov, I.A. Taitzoglou, Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids induce plasminogen activator activity and DNA damage in rabbit spermatozoa, *Andrologia.* 49 (2017) e12776. doi:10.1111/and.12776.

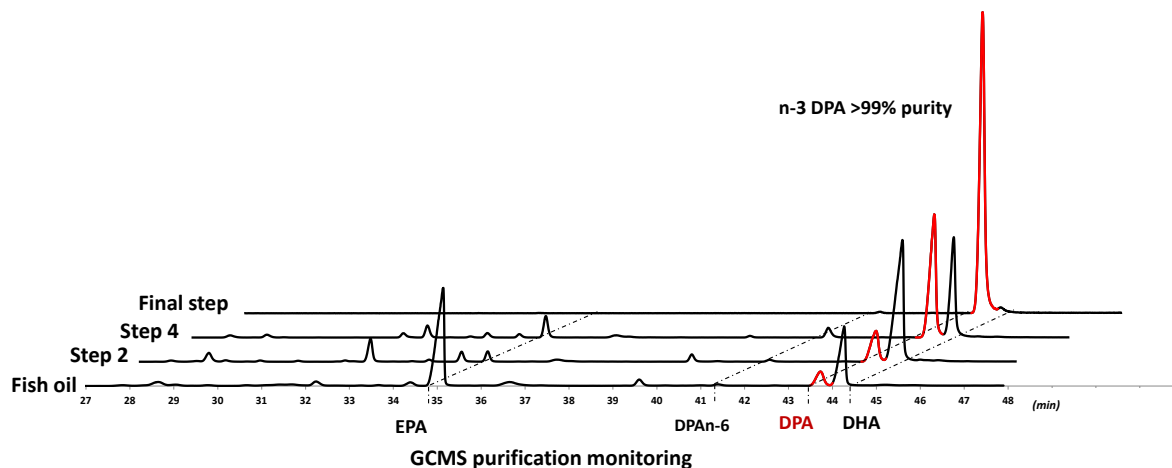
[127] T.J.P. Pinto, A.A.F. Vilela, D.R. Farias, J. Lepsch, G.M. Cunha, J.S. Vaz, P. Factor-Litvak, G. Kac, Serum n-3 polyunsaturated fatty acids are inversely associated with longitudinal changes in depressive symptoms during pregnancy, *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* 26 (2017) 157–168. doi:10.1017/S204579601500116X.

ANNEXE II:
Appendix de l'article 01

The impact of n-3 docosapentaenoic acid supplementation on fatty acid composition in rats differs depending upon tissues and is influenced by the presence of dairy lipids in the diet

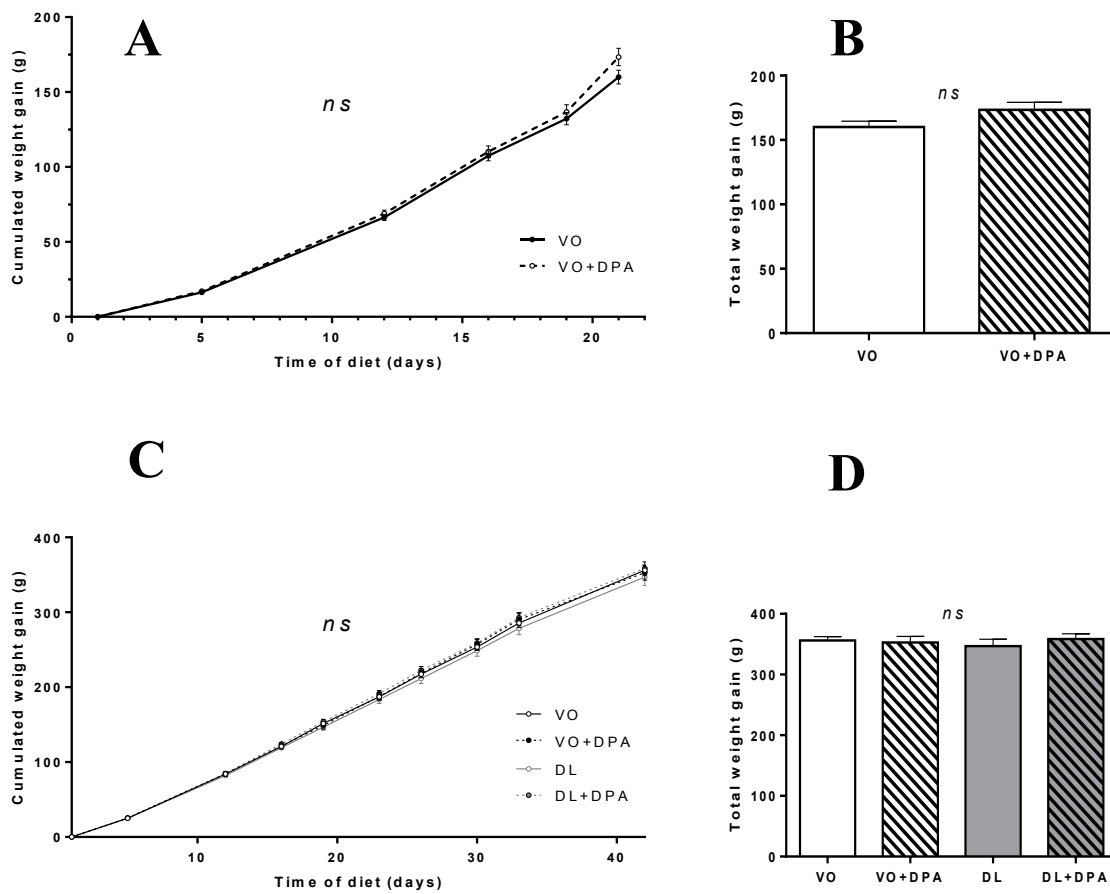
JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Appendix A - Figure 1: Purification of n-3 DPA by liquid chromatography



Follow-up of the n-3 DPA purification as ethyl ester. Chromatograms represented the GC-MS analysis of the pooled collected fractions corresponding to the n-3 DPA fraction separated by liquid chromatography. The n-3 DPA is represented in red.

Appendix A - Figure 2: Rats cumulated body weight gain (A) and total weight gain (B)



Cumulated weigh gain (A-C) and total weight gain (B-D) of rats fed from weaning for 3 weeks (A-B) (experiment 1) or 6 weeks (C-D) (experiment 2) are presented as mean \pm SEM (n = 8 /group). Animals were fed with a blend of vegetable oils (VO) or a blend of vegetable oils and dairy lipids (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% n-3 DPA (VO+DPA and DL+DPA). Groups were compared by Student t-test (experiment 1) or type III two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test adjusted by false discovery rate method (experiment 2). *ns*: non-significant.

Appendix A - Table 1: Organs weight at the end of the experimentation

Experiment 1

A	Liver	Heart	Lung	Spleen	Kidney	Bone marrow
VO	3.65 ±0.11	0.42 ±0.01	0.52 ±0.01	0.50 ±0.01*	0.86 ±0.03	0.04 ±0.0
VO+DPA	3.94 ±0.17	0.42 ±0.01	0.50 ±0.01	0.46 ±0.02	0.90 ±0.02	0.05 ±0.0
	Stomach	EAT	Testis	Pancreas	Intestin	Muscle
VO	0.43 ±0.01	1.13 ±0.08	0.86 ±0.02	0.11 ±0.01	0.74 ±0.02	0.46 ±0.02
VO+DPA	0.42 ±0.02	1.08 ±0.08	0.86 ±0.03	0.11 ±0.01	0.72 ±0.04	0.46 ±0.01

Experiment 2

B	Liver	Brain	Heart	Lung	Spleen
VO	3.09 ±0.24	0.37 ±0.03	0.31 ±0.02	0.34 ±0.02	0.31 ±0.06
VO+DPA	3.14 ±0.36	0.36 ±0.02	0.33 ±0.04	0.35 ±0.02	0.30 ±0.01
DL	3.24 ±0.16	0.50 ±0.03	0.35 ±0.02	0.39 ±0.03	0.31 ±0.04
DL+DPA	3.29 ±0.35	0.37 ±0.03	0.31 ±0.02	0.36 ±0.04	0.31 ±0.07
ANOVA	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Organs weight at the end of the experimentation of rats fed from weaning during **A**) 3 weeks (experiment 1) or **B**) 6 weeks (experiment 2) are presented as mean ± SEM (n = 8 /group). Animals were fed with a blend of vegetable oils (VO) or a blend of vegetable oils and dairy lipids (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% n-3 DPA (VO+DPA and DL+DPA). Groups were compared by Student t-test (experiment 1) or type III two-way ANOVA followed by a post-hoc test of Tukey adjusted by false discovery rate method (experiment 2). *ns*: non-significant. EAT: epididymal adipose tissue.

Appendix B

Appendix B – Table 1: Liver, red blood cells and plasma total lipid fatty acid composition.

Appendix B – Table 2: Gut, stomach and heart fatty acid composition of total lipids

Appendix B – Table 3: Kidney, brain and retina fatty acid composition of total lipids

Appendix B – Table 4: Spleen, lung and bone marrow fatty acid composition of total lipids

Appendix B – Table 5: Pancreas, epididymal adipose tissue (TAE) and skin fatty acid composition of total lipids

Appendix B – Table 6: Sub-cutaneous adipose tissue (SCAT), muscle and testis fatty acid composition of total lipids

Legend for all Tables of the Appendix B:

The mass percentages of the identified fatty acids in tissues of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA) for 3 weeks are presented as mean \pm SEM (n=8/group, Experiment 1). Fatty acids with a proportion $<0.1\%$ are noted as trace (Tr). Groups were compared with multiple Student t-test ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$). The tissues are presented in the same order than in Figure 1, section 3.2.1.

Appendix B – Table 1: Liver, red blood cells and plasma total lipid fatty acid composition.

% of total fatty acids	Liver		Red blood cells		Plasma	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	0.16 ±0.01	0.16 ±0.02	0.64 ±0.15	0.62 ±0.07	0.75 ±0.17	0.87 ±0.15
C14:0	0.71 ±0.06	0.72 ±0.06	1.31 ±0.31	1.00 ±0.12	2.35 ±0.32	1.82 ±0.28
C16:0	26.05 ±1.24	24.54 ±1.45	19.27 ±0.31	19.47 ±0.70	22.05 ±0.70	21.53 ±1.19
C18:0	10.81 ±1.07	11.23 ±0.82	13.47 ±0.51	13.49 ±0.46	11.63 ±1.39	10.98 ±1.42
C20:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C24:0	nd	nd	nd	nd	0.32 ±0.07	0.29 ±0.06
Σsaturated	37.73 ±0.49	36.65 ±0.82	34.69 ±0.44	34.57 ±0.82	37.10 ±1.91	35.50 ±2.84
C16:1 n-9	0.61 ±0.06	0.61 ±0.05	3.30 ±1.93	3.67 ±2.01	nd	nd
C18:1 n-9	32.20 ±1.51	33.03 ±1.36	16.10 ±1.25	17.05 ±1.49	25.43 ±2.35	24.76 ±1.07
C20:1 n-9	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
C20:3 n-9	nd	nd	0.37 ±0.15	0.47 ±0.13	0.46 ±0.04	0.47 ±0.03
Σ n-9	32.81 ±1.57	33.64 ±1.41	19.77 ±1.33	21.19 ±1.59	25.90 ±2.34	25.24 ±1.08
C16:1 n-7	2.99 ±0.53	2.39 ±0.46	0.88 ±0.12	1.27 ±0.28	2.30 ±0.22	2.15 ±0.06
C18:1 n-7	2.98 ±0.43	2.40 ±0.04	2.37 ±0.12	2.22 ±0.08	1.66 ±0.12	1.75 ±0.12
C20:1 n-7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ n-7	5.98 ±0.59	4.79 ±0.45	3.25 ±0.21	3.49 ±0.32	3.96 ±0.31	3.90 ±0.13
C18:2 n-6	6.83 ±0.61	8.31 ±0.85	5.54 ±0.35	6.40 ±0.54	8.76 ±0.48	9.17 ±0.65
C18:3 n-6	0.25 ±0.04	0.31 ±0.06	0.36 ±0.03	0.56 ±0.12	nd	nd
C20:2 n-6	0.15 ±0.01	0.15 ±0.02	0.66 ±0.04	0.79 ±0.17	Tr	Tr
C20:3 n-6	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01	0.42 ±0.02	0.42 ±0.08	0.37 ±0.04	0.36 ±0.03
C20:4 n-6	11.04 ±1.07	10.65 ±1.00	25.88 ±1.13	22.26 ^{td} ±1.68	18.99 ±1.87	19.01 ±2.01
C22:4 n-6	0.07 ±0.01	0.07 ±0.01	1.46 ±0.08	1.34 ±0.13	0.55 ±0.08	0.82* ±0.09
C22:5 n-6	0.12 ±0.01	0.08* ±0.02	0.82 ±0.07	0.64 ±0.12	0.25 ±0.03	0.20 ±0.02
Σ n-6	18.58 ±1.70	19.67 ±1.91	35.13 ±1.15	32.4 ±1.39	28.91 ±2.03	29.56 ±2.27
C18:3 n-3	0.26 ±0.03	0.37 ±0.05	0.39 ±0.08	0.66 ±0.17	0.65 ±0.04	0.82 ±0.09
C20:5 n-3	0.09 ±0.01	0.22* ±0.04	0.36 ±0.03	0.56 ±0.12	0.50 ±0.15	1.03* ±0.14
C22:5 n-3	0.18 ±0.02	0.21 ±0.02	1.87 ±0.13	2.63* ±0.36	0.39 ±0.06	0.52 ±0.07
C22:6 n-3	4.37 ±0.42	4.45 ±0.41	4.53 ±0.17	4.50 ±0.30	2.58 ±0.39	3.42 ±0.33
Σ n-3	4.91 ±0.47	5.25 ±0.50	7.15 ±0.29	8.34^{td} ±0.48	4.13 ±0.47	5.80* ±0.50

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix B - page 1.

Appendix B – Table 2: Intestin, stomach and heart fatty acid composition of total lipids

% of total fatty acids	Gut		Stomach		Heart	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	0.14 ±0.04	0.10 ±0.03	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.12 ±0.02	0.11 ±0.02
C14:0	0.93 ±0.11	0.89 ±0.06	1.44 ±0.08	1.18* ±0.07	0.36 ±0.05	0.37 ±0.05
C16:0	20.81 ±0.49	21.36 ±0.38	21.93 ±0.33	21.69 ±0.44	14.01 ±0.25	13.81* ±0.55
C18:0	11.93 ±1.36	13.00 ±0.62	5.34 ±0.29	7.02* ±0.60	22.45 ±0.23	20.98 ^{td} ±0.53
C20:0	0.31 ±0.03	0.29 ±0.04	0.20 ±0.02	0.39 ±0.09	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>
C24:0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.21 ±0.04	0.29 ±0.03	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σsaturated	34.11 ±0.93	35.64 ±0.38	29.12 ±0.31	30.56* ±0.51	36.94 ±0.42	35.27 ±0.72
C16:1 n-9	0.51 ±0.04	0.57 ^{td} ±0.06	0.44 ±0.01	0.41 ±0.01	0.31 ±0.03	0.29 ±0.02
C18:1 n-9	29.92 ±3.19	27.24 ±1.40	46.16 ±0.71	41.09* ±1.82	10.87 ±0.63	14.97* ±1.48
C20:1 n-9	0.59 ±0.03	0.63 ±0.06	0.40 ±0.02	0.55 ±0.10	0.24 ±0.04	0.18 ±0.04
C20:3 n-9	0.43 ±0.04	0.45 ±0.03	0.20 ±0.01	0.29 ^{td} ±0.04	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ n-9	31.45 ±3.13	28.89 ±1.34	47.19 ±0.69	42.33* ±1.76	11.42 ±0.64	15.44* ±1.48
C16:1 n-7	2.53 ±0.33	2.40 ±0.32	3.72 ±0.25	3.20 ±0.39	0.58 ±0.05	0.62 ±0.12
C18:1 n-7	2.95 ±0.09	2.94 ±0.07	2.95 ±0.08	3.11 ±0.10	4.33 ±0.13	4.25 ±0.17
C20:1 n-7	0.21 ±0.04	0.19 ±0.03	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ n-7	5.68 ±0.28	5.53 ±0.32	6.67 ±0.30	6.31 ±0.37	4.91 ±0.15	4.87 ±0.20
C18:2 n-6	7.86 ±0.33	6.86 ±0.16	9.64 ±0.21	10.07 ±0.33	12.74 ±0.60	12.27 ±0.52
C18:3 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C20:2 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.21 ±0.01	0.20 ±0.02
C20:3 n-6	0.70 ±0.08	0.83 ±0.07	0.18 ±0.02	0.29* ±0.03	0.23 ±0.01	0.27 ±0.03
C20:4 n-6	14.02 ±1.86	15.21 ±0.96	4.84 ±0.47	7.44* ±1.01	22.73 ±0.16	20.10*** ±0.57
C22:4 n-6	1.90 ±0.23	2.25 ±0.19	0.49 ±0.05	0.67 ±0.09	0.60 ±0.02	0.42** ±0.05
C22:5 n-6	0.32 ±0.04	0.27 ±0.02	0.12 ±0.02	0.15 ±0.02	0.83 ±0.07	0.51** ±0.06
Σ n-6	24.81 ±2.17	25.42 ±1.13	15.27 ±0.67	18.63* ±1.39	37.34 ±0.45	33.77** ±0.91
C18:3 n-3	0.78 ±0.31	0.47 ±0.04	0.88 ±0.03	0.75 ^{td} ±0.05	0.16 ±0.01	0.14 ±0.01
C20:5 n-3	0.14 ±0.03	0.12 ±0.02	0.11 ±0.01	0.26* ±0.05	0.16 ±0.03	0.15 ±0.03
C22:5 n-3	0.57 ±0.08	1.08*** ±0.07	0.24 ±0.02	0.40 ^{td} ±0.08	0.74 ±0.05	1.48** ±0.14
C22:6 n-3	2.45 ±0.37	2.86 ±0.17	0.51 ±0.05	0.76 ^{td} ±0.12	8.33 ±0.61	8.88 ±0.41
Σ n-3	3.94 ±0.36	4.52 ±0.19	1.74 ±0.05	2.18^{td} ±0.20	9.39 ±0.65	10.65 ±0.49

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix B - page 1.

Appendix B – Table 3: Kidney, brain and retina fatty acid composition of total lipids

% of total fatty acids	Kidney		Brain		Retina	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	0.06 ±0.03	0.14 ±0.04	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.23 ±0.06	0.22 ±0.06
C14:0	0.71 ±0.03	0.90 ^{td} ±0.08	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.91 ±0.59	1.26 ±0.11
C16:0	22.77 ±0.20	23.34 ±0.25	20.94 ±0.21	20.73 ±0.20	25.45 ±0.55	25.97 ±0.96
C18:0	15.64 ±0.28	14.58* ±0.39	20.18 ±0.20	20.09 ±0.23	13.24 ±0.72	17.22** ±0.76
C20:0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.31 ±0.02	0.30 ±0.04	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C24:0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.13 ±0.02	0.12 ±0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σsaturated	39.19 ±0.33	38.96 ±0.36	41.56 ±0.29	41.25 ±0.35	40.82 ±1.42	44.67 ±1.56
C16:1 n-9	0.77 ±0.03	0.92 ^{td} ±0.06	0.48 ±0.06	0.44 ±0.03	0.64 ±0.06	0.76 ±0.09
C18:1 n-9	15.82 ±0.72	18.54 ^{td} ±1.17	19.68 ±0.31	19.73 ±0.41	29.59 ±2.08	25.73 ±1.79
C20:1 n-9	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.39 ±0.19	1.55 ±0.08	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C20:3 n-9	0.31 ±0.01	0.31 ±0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ n-9	16.90 ±0.73	19.77* ±1.11	21.55 ±0.43	21.71 ±0.46	30.22 ±2.08	26.5 ±1.79
C16:1 n-7	1.17 ±0.11	1.41 ±0.19	0.67 ±0.06	0.62 ±0.02	3.24 ±0.27	2.42 ^{td} ±0.34
C18:1 n-7	2.77 ±0.06	2.58** ±0.03	4.16 ±0.10	4.04 ±0.06	3.00 ±0.28	2.96 ±0.16
C20:1 n-7	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.60 ±0.17	0.43 ±0.02	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ n-7	3.94 ±0.14	3.99 ±0.20	5.42 ±0.22	5.09 ±0.06	6.24 ±0.47	5.39 ±0.46
C18:2 n-6	7.92 ±0.20	8.39 ±0.30	0.81 ±0.09	0.91 ±0.08	7.91 ±0.72	6.10 ±0.77
C18:3 n-6	0.26 ±0.09	0.09 ^{td} ±0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C20:2 n-6	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>	0.21 ±0.01	0.19 ±0.01	0.25 ±0.02	0.29 ±0.02
C20:3 n-6	0.50 ±0.03	0.52 ±0.03	0.36 ±0.01	0.40 ±0.02	0.33 ±0.03	0.38 ±0.03
C20:4 n-6	27.17 ±0.68	24.14* ±0.89	11.27 ±0.10	11.27 ±0.13	6.07 ±0.50	8.21* ±0.47
C22:4 n-6	0.57 ±0.03	0.49 ±0.05	2.81 ±0.07	2.85 ±0.11	1.53 ±0.27	1.78 ±0.24
C22:5 n-6	0.14 ±0.03	0.03* ±0.03	0.61 ±0.02	0.56 ^{td} ±0.02	0.26 ±0.05	0.27 ±0.04
Σ n-6	36.57 ±0.60	33.66* ±0.98	16.17 ±0.16	16.32 ±0.24	16.35 ±0.68	17.03 ±1.09
C18:3 n-3	0.30 ±0.04	0.31 ±0.02	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.95 ±0.14	0.82 ±0.14
C20:5 n-3	0.39 ±0.04	0.47 ±0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C22:5 n-3	0.34 ±0.02	0.44** ±0.03	0.13 ±0.02	0.13 ±0.01	0.43 ±0.12	0.42 ±0.05
C22:6 n-3	2.37 ±0.07	2.40 ±0.11	15.17 ±0.27	15.5 ±0.27	4.97 ±0.94	5.17 ±1.70
Σ n-3	3.40 ±0.09	3.62 ±0.19	15.3 ±0.27	15.63 ±0.27	6.36 ±0.99	6.41 ±1.61
C24:4 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.11 ±0.02	0.14 ±0.03	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ others	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.11 ±0.02	0.14 ±0.03	<i>nd</i>	<i>nd</i>

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix B - page 1.

Appendix B – Table 4: Spleen, lung and bone marrow fatty acid composition of total lipids

% of total fatty acids	Spleen		Lung		Bone marrow	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.99 ±0.15	0.78 ±0.11
C14:0	0.57 ±0.08	0.56 ±0.09	1.22 ±0.08	1.16 ±0.05	2.21 ±0.23	1.86 ±0.22
C16:0	27.04 ±0.60	26.77 ±0.29	29.26 ±0.53	30.04 ±0.40	21.5 ±0.91	23.58 ^{td} ±0.55
C18:0	15.78 ±0.65	16.24 ±0.40	10.74 ±0.35	11.29 ±0.27	7.70 ±1.21	9.98 ±1.02
C20:0	0.31 ±0.06	0.23 ±0.05	0.22 ±0.02	0.22 ±0.01	0.13 ±0.03	0.15 ±0.03
C24:0	0.07 ±0.02	0.07 ±0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σsaturated	43.76 ±1.19	43.87 ±0.51	41.43 ±0.74	42.71 ±0.57	32.52 ±1.66	36.35^{td} ±1.07
C16:1 n-9	0.69 ±0.10	0.64 ±0.07	2.29 ±0.11	2.44 ±0.13	0.68 ±0.03	0.94 ^{td} ±0.13
C18:1 n-9	15.69 ±0.78	14.77 ±0.62	24.54 ±1.29	22.87 ±1.07	35.52 ±2.43	29.87 ^{td} ±2.08
C20:1 n-9	1.07 ±0.15	0.97 ±0.08	0.70 ±0.04	0.72 ±0.03	0.56 ±0.06	0.75 ±0.11
C20:3 n-9	0.80 ±0.02	0.83 ±0.02	0.57 ±0.02	0.54 ±0.01	0.46 ±0.04	0.51 ±0.05
Σ n-9	18.48 ±0.75	17.42 ±0.60	28.45 ±1.14	26.92 ±0.94	37.22 ±2.35	32.06 ±1.95
C16:1 n-7	1.22 ±0.11	1.11 ±0.13	1.72 ±0.09	1.57 ±0.11	4.72 ±0.84	3.86 ±0.79
C18:1 n-7	3.35 ±0.10	3.22 ±0.07	2.44 ±0.07	2.30 ±0.07	3.45 ±0.13	3.38 ±0.11
C20:1 n-7	0.32 ±0.09	0.26 ±0.07	0.18 ±0.08	0.20 ±0.07	0.18 ±0.03	0.22 ±0.05
Σ n-7	4.88 ±0.16	4.59 ±0.19	4.35 ±0.19	4.08 ±0.20	8.35 ±0.90	7.47 ±0.78
C18:2 n-6	5.18 ±0.14	5.23 ±0.17	5.20 ±0.51	4.73 ±0.31	11.01 ±0.80	9.43 ±0.60
C18:3 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.14 ±0.03	0.13 ±0.03	0.23 ±0.08	0.30 ±0.10
C20:2 n-6	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>	<i>Tr</i>
C20:3 n-6	0.73 ±0.06	0.78 ±0.03	0.43 ±0.02	0.47 ±0.01	0.27 ±0.04	0.35 ±0.05
C20:4 n-6	20.35 ±0.40	20.66 ±0.56	12.77 ±0.58	12.88 ±0.51	7.35 ±1.16	9.90 ±1.59
C22:4 n-6	2.33 ±0.10	2.02* ±0.06	2.79 ±0.17	2.57 ±0.13	0.94 ±0.15	1.03 ±0.16
C22:5 n-6	0.48 ±0.03	0.38 ^{td} ±0.04	0.45 ±0.03	0.34* ±0.02	0.19 ±0.03	0.22 ±0.03
Σ n-6	29.07 ±0.56	29.06 ±0.56	21.91 ±0.31	21.24 ±0.38	19.99 ±1.01	21.22 ±1.36
C18:3 n-3	0.35 ±0.06	0.28 ±0.05	0.33 ±0.04	0.27 ±0.04	0.70 ±0.06	0.80 ±0.23
C20:5 n-3	0.17 ±0.01	0.31*** ±0.02	0.29 ±0.03	0.40** ±0.02	0.08 ±0.02	0.14 ^{td} ±0.03
C22:5 n-3	1.08 ±0.04	1.79*** ±0.06	1.04 ±0.05	1.78*** ±0.06	0.36 ±0.06	0.63* ±0.10
C22:6 n-3	2.20 ±0.08	2.67** ±0.13	2.16 ±0.12	2.55* ±0.09	0.79 ±0.13	1.33 ^{td} ±0.27
Σ n-3	3.80 ±0.16	5.06*** ±0.16	3.86 ±0.14	5.05*** ±0.11	1.93 ±0.17	2.90* ±0.36

For legend and statistical analysis. see the top of Appendix B - page 1.

Appendix B – Table 5: Pancreas, epididymal adipose tissue (TAE) and skin fatty acid composition of total lipids

% of total fatty acids	Pancreas		TAE		Skin	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	0.34 ±0.20	0.31 ±0.14	0.36 ±0.05	0.38 ±0.05	1.10 ±0.18	1.21 ±0.12
C14:0	0.96 ±0.28	0.99 ±0.29	1.58 ±0.03	1.60 ±0.06	2.29 ±0.13	2.33 ±0.12
C16:0	24.51 ±0.93	24.57 ±1.37	23.23 ±0.63	22.85 ±0.47	20.97 ±0.26	20.93 ±0.37
C18:0	9.20 ±2.99	8.39 ±2.79	2.63 ±0.08	2.63 ±0.10	3.54 ±0.10	3.61 ±0.12
C20:0	0.37 ±0.34	0.26 ±0.13	0.08 ±0.01	0.06 ±0.01	0.13 ±0.01	0.13 ±0.01
C24:0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σsaturated	35.38 ±3.31	34.51 ±3.60	27.88 ±0.61	27.52 ±0.49	28.3 ±0.30	28.48 ±0.39
C16:1 n-9	0.54 ±0.11	0.55 ±0.13	0.54 ±0.01	0.54 ±0.02	0.47 ±0.01	0.47 ±0.01
C18:1 n-9	27.08 ±12.41	30.43 ±11.81	52.82 ±0.35	53.44 ±0.65	49.32 ±0.59	49.21 ±0.57
C20:1 n-9	0.68 ±0.32	0.55 ±0.13	0.33 ±0.02	0.32 ±0.02	0.40 ±0.01	0.40 ±0.01
C20:3 n-9	0.55 ±0.20	0.47 ±0.21	0.18 ±0.04	0.14 ±0.04	0.21 ±0.01	0.20 ±0.01
Σ n-9	28.86 ±12.05	32.00 ±11.65	53.87 ±0.38	54.43 ±0.65	50.48 ±0.58	50.36 ±0.58
C16:1 n-7	2.35 ±1.44	2.50 ±1.10	5.42 ±0.21	5.08 ±0.41	2.74 ±0.24	2.65 ±0.26
C18:1 n-7	2.95 ±0.25	2.89 ±0.21	2.96 ±0.10	2.85 ±0.06	2.74 ±0.07	2.71 ±0.06
C20:1 n-7	0.22 ±0.21	0.14 ±0.11	0.07 ±0.01	0.06 ±0.01	0.13 ±0.02	0.15 ±0.01
Σ n-7	5.52 ±1.15	5.53 ±1.06	8.45 ±0.24	8.00 ±0.46	5.61 ±0.28	5.51 ±0.31
C18:2 n-6	11.24 ±1.27	11.56 ±1.50	8.22 ±0.32	8.51 ±0.35	12.58 ±0.41	12.68 ±0.46
C18:3 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.06 ±0.01	0.04 ±0.01	0.11 ±0.01	0.09 ±0.01
C20:2 n-6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C20:3 n-6	0.35 ±0.21	0.29 ±0.15	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.07 ±0.01	0.07 ±0.01
C20:4 n-6	13.86 ±6.54	11.38 ±5.41	0.33 ±0.11	0.23 ±0.07	1.33 ±0.06	1.24 ±0.05
C22:4 n-6	0.51 ±0.22	0.36 ±0.17	0.05 ±0.02	0.03 ±0.02	0.11 ±0.01	0.10 ±0.01
C22:5 n-6	0.36 ±0.16	0.22 ±0.13	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Σ n-6	26.33 ±8.18	23.81 ±7.21	8.66 ±0.43	8.81 ±0.32	14.20 ±0.44	14.19 ±0.51
C18:3 n-3	0.59 ±0.37	0.33 ±0.16	1.04 ±0.04	1.07 ±0.02	1.15 ±0.02	1.16 ±0.01
C20:5 n-3	1.01 ±0.46	1.43 ^{td} ±0.64	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
C22:5 n-3	0.47 ±0.23	0.82 ^{td} ±0.26	<i>Tr</i>	0.06* ±0.02	0.09 ±0.01	0.14* ±0.01
C22:6 n-3	1.84 ±0.95	1.96 ±1.03	0.09 ±0.04	0.07 ±0.03	0.16 ±0.01	0.18 ±0.01
Σ n-3	3.91 ±1.77	4.14^{td} ±1.85	1.15 ±0.07	1.24 ±0.05	1.41 ±0.03	1.47^{td} ±0.02

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix B - page 1.

Appendix B – Table 6: Sub-cutaneous adipose tissue (SCAT). muscle and testis fatty acid composition of total lipids

% of total fatty acids	SCAT		Muscle		Testis	
	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA	Ctrl	DPA
C12:0	1.26 ±0.15	1.21 ±0.16	0.19 ±0.02	0.22 ±0.05	0.13 ±0.03	0.11 ±0.03
C14:0	2.52 ±0.15	2.52 ±0.17	0.71 ±0.05	0.76 ±0.09	0.58 ±0.03	0.63 ±0.05
C16:0	22.02 ±0.39	22.41 ±0.31	20.81 ±0.64	20.92 ±0.22	32.12 ±0.39	31.98 ±0.38
C18:0	2.66 ±0.05	2.59 ±0.08	11.73 ±0.29	11.8 ±0.57	7.78 ±0.31	7.55 ±0.18
C20:0	Tr	Tr	0.11 ±0.03	0.09 ±0.03	Tr	Tr
C24:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σsaturated	28.45 ±0.31	28.73 ±0.48	33.54 ±0.63	33.79 ±0.45	40.6 ±0.58	40.27 ±0.34
C16:1 n-9	0.46 ±0.01	0.46 ±0.01	0.57 ±0.03	0.57 ±0.03	0.44 ±0.02	0.45 ±0.03
C18:1 n-9	50.06 ±0.56	49.99 ±0.71	21.54 ±1.21	21.94 ±1.80	15.6 ±0.76	16.25 ±0.67
C20:1 n-9	0.33 ±0.01	0.32 ±0.01	0.34 ±0.04	0.3 ±0.03	0.39 ±0.11	0.5 ±0.10
C20:3 n-9	0.18 ±0.01	0.16 ±0.01	Tr	Tr	nd	nd
Σ n-9	51.03 ±0.56	50.93 ±0.71	22.45 ±1.23	22.81 ±1.81	16.43 ±0.83	17.2 ±0.71
C16:1 n-7	3.79 ±0.33	4.13 ±0.23	1.38 ±0.11	1.23 ±0.07	0.91 ±0.10	0.91 ±0.10
C18:1 n-7	2.57 ±0.09	2.66 ±0.07	3.16 ±0.09	3.06 ±0.08	2.34 ±0.06	2.18* ±0.04
C20:1 n-7	0.07 ±0.01	0.05 ±0.01	0.11 ±0.02	0.09 ±0.02	nd	nd
Σ n-7	6.43 ±0.41	6.85 ±0.28	4.65 ±0.19	4.38 ±0.11	3.25 ±0.16	3.08 ±0.11
C18:2 n-6	12.42 ±0.74	11.93 ±0.52	15.84 ±0.40	15.73 ±0.31	4.21 ±0.18	4.4 ±0.15
C18:3 n-6	0.1 ±0.01	0.09 ±0.01	0.13 ±0.03	0.11 ±0.02	nd	nd
C20:2 n-6	Tr	Tr	0.42 ±0.02	0.39 ±0.02	Tr	Tr
C20:3 n-6	nd	nd	0.46 ±0.02	0.45 ±0.03	0.51 ±0.02	0.54 ±0.02
C20:4 n-6	0.27 ±0.03	0.21 ^{td} ±0.01	11.92 ±0.47	11.43 ±0.73	16.21 ±0.29	16.16 ±0.30
C22:4 n-6	nd	nd	0.49 ±0.04	0.45 ±0.02	1.42 ±0.03	1.44 ±0.03
C22:5 n-6	nd	nd	0.56 ±0.07	0.63 ±0.11	13.45 ±0.42	12.95 ±0.32
Σ n-6	12.79 ±0.75	12.24 ±0.54	29.81 ±0.87	29.2 ±0.93	37.29 ±0.55	36.93 ±0.49
C18:3 n-3	1.29 ±0.06	1.25 ±0.02	0.35 ±0.05	0.32 ±0.05	0.17 ±0.05	0.27 ±0.08
C20:5 n-3	nd	nd	0.22 ±0.01	0.26 ±0.02	0.24 ±0.04	0.15 ^{td} ±0.02
C22:5 n-3	nd	nd	1.45 ±0.13	1.73 ±0.20	nd	nd
C22:6 n-3	nd	nd	7.52 ±0.28	7.5 ±0.51	2.01 ±0.07	2.1 ±0.05
Σ n-3	1.29 ±0.06	1.25 ±0.02	9.56 ±0.34	9.83 ±0.62	2.43 ±0.05	2.51 ±0.05
C24:4 n-6	nd	nd	nd	nd	0.73 ±0.03	0.73 ±0.03
C24:5 n-6	nd	nd	nd	nd	0.76 ±0.04	0.71 ±0.04
Others	nd	nd	nd	nd	1.49 ±0.06	1.44 ±0.03

For legend and statistical analysis. see the top of Appendix B - page 1.

Appendix C

Appendix C – Table 1: Liver fatty acids composition of total lipids

Appendix C – Table 2: Heart fatty acids composition of total lipids

Appendix C – Table 3: Lung fatty acids composition of total lipids

Appendix C – Table 4: Spleen fatty acids composition of total lipids

Appendix C – Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids

Appendix C – Table 6: Brain fatty acids composition of phospholipids

Legend for all Tables:

The mass percentages of the identified fatty acids in tissues of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL); not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (VO+DPA and DL+DPA) for 6 weeks are presented as mean \pm SEM (n=8/group, Experiment 2). Fatty acids with a proportion <0.1% are noted as trace (Tr). DPA supplementation effect (DPA) compared both not supplemented groups with both supplemented groups, lipid mixture effect (LM) compared both VO groups with both DL groups, by 2-ways ANOVA considering the interaction between both effects (DPA*LM) (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Different superscript characters indicate significant differences for multiple comparisons (Tukey post-hoc, p <0.05).

Appendix C– Table 1: Liver fatty acids composition of total lipids

% FA	VO		VO+DPA		DL		DL+DPA		DPA	LM	DPA*LM
C14:0	0.53 ^a	±0.05	0.59 ^a	±0.11	0.88 ^b	±0.06	0.89 ^b	±0.11		***	
C15:0	0.30 ^a	±0.04	0.35 ^{ab}	±0.04	0.41 ^b	±0.03	0.39 ^{ab}	±0.05		*	
C16:0	21.73	±0.26	23.19	±0.45	22.37	±0.29	22.43	±0.64			
C18:0	14.33	±0.64	13.13	±0.75	12.32	±0.49	12.88	±0.87			
Σ saturated	36.89	±0.47	37.26	±0.39	35.97	±0.46	36.59	±0.67			
C16:1 n-9	0.37	±0.02	0.46	±0.05	0.40	±0.02	0.49	±0.10			
C18:1 n-9	27.54 ^{ab}	±0.95	27.22 ^a	±1.48	24.83 ^{ab}	±1.00	23.79 ^b	±1.51		*	
Σ n-9	27.91	±0.97	27.68	±1.53	25.23	±1.01	24.29	±1.57		*	
C16:1 n-7	1.32 ^a	±0.15	1.83 ^{ab}	±0.24	2.65 ^c	±0.25	2.31 ^{bc}	±0.41		**	
C18:1 n-7	3.03 ^a	±0.07	3.24 ^{ab}	±0.27	4.09 ^c	±0.18	3.62 ^{bc}	±0.25		***	
Σ n-7	4.35^a	±0.22	5.07^{ab}	±0.46	6.74^c	±0.41	5.93^{bc}	±0.64		***	
C18:2 n-6	7.58 ^a	±0.35	6.83 ^b	±0.27	9.38 ^c	±0.27	10.25 ^d	±0.26	*	***	**
C18:3 n-6	0.12 ^a	±0.02	0.12 ^a	±0.02	0.19 ^b	±0.02	0.14 ^{ab}	±0.02		*	
C20:2 n-6	0.11	±0.01	0.10	±0.01	0.11	±0.02	0.12	±0.02			
C20:3 n-6	0.49 ^a	±0.04	0.50 ^a	±0.06	0.65 ^{ab}	±0.09	0.70 ^b	±0.07		*	
C20:4 n-6	14.96	±0.63	14.26	±0.92	14.06	±0.54	12.84	±1.00			
C22:4 n-6	0.26 ^a	±0.02	0.21 ^{ab}	±0.02	0.19 ^b	±0.01	0.18 ^b	±0.02		*	
C22:5 n-6	0.22 ^a	±0.02	0.19 ^a	±0.02	0.19 ^a	±0.01	0.11 ^b	±0.01	**		
Σ n-6	23.75	±0.58	22.2	±1.10	24.77	±0.73	24.34	±1.13			
C18:3 n-3	0.48 ^a	±0.07	0.50 ^a	±0.07	0.63 ^{ab}	±0.06	0.69 ^b	±0.05		**	
C20:5 n-3	0.14 ^a	±0.01	0.16 ^a	±0.02	0.33 ^b	±0.04	0.67 ^c	±0.07	***	**	***
C22:5 n-3	0.37 ^a	±0.02	0.44 ^a	±0.02	0.47 ^a	±0.02	0.96 ^b	±0.07	***	*	***
C22:6 n-3	6.11	±0.29	6.69	±0.52	5.86	±0.21	6.53	±0.53			
Σ n-3	7.10^a	±0.28	7.78^{ab}	±0.54	7.29^a	±0.22	8.85^b	±0.55	*		

For table legend, see page 1.

Appendix C – Table 2: Heart fatty acids composition of total lipids

% FA	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM	DPA*LM
C14:0	0.20 ^{ab} ±0.02	0.18 ^a ±0.01	0.27 ^b ±0.01	0.27 ^b ±0.03		**	
C15:0	Tr	Tr	0.13 ±0.02	0.15 ±0.02		***	
C16:0	11.85 ^a ±0.27	11.82 ^a ±0.17	11.19 ^b ±0.13	11.66 ^{ab} ±0.14		*	
C18:0	20.44 ±0.33	19.97 ±0.22	19.86 ±0.22	19.97 ±0.17			
Σ saturated	32.49 ±0.51	31.97 ±0.22	31.46 ±0.14	32.05 ±0.13		*	
C16:1 n-9	0.25 ±0.07	0.19 ±0.02	0.17 ±0.01	0.21 ±0.04			
C18:1 n-9	10.31 ^a ±0.55	10.10 ^{ab} ±0.48	8.83 ^b ±0.30	8.85 ^b ±0.42		**	
C20:1 n-9	0.21 ±0.01	0.21 ±0.01	0.22 ±0.01	0.19 ±0.02			
C20:3 n-9	0.41 ^{ab} ±0.03	0.48 ^a ±0.05	0.38 ^{ab} ±0.03	0.36 ^b ±0.05			
Σ n-9	11.18^a ±0.54	10.99^a ±0.46	9.61^b ±0.30	9.61^b ±0.43		*	
C16:1 n-7	0.71 ±0.12	0.45 ±0.03	0.60 ±0.05	0.64 ±0.07			*
C18:1 n-7	4.63 ±0.16	4.51 ±0.12	4.69 ±0.13	4.48 ±0.08			
C20:1 n-7	0.16 ^a ±0.03	0.31 ^b ±0.05	0.27 ^{ab} ±0.04	0.30 ^b ±0.06	*		
Σ n-7	5.49 ±0.23	5.26 ±0.13	5.56 ±0.15	5.42 ±0.15			
C18:2 n-6	12.99 ^{ab} ±0.31	12.63 ^a ±0.36	15.02 ^c ±0.34	13.82 ^b ±0.18	**	***	*
C20:2 n-6	0.14 ±0.02	0.13 ±0.02	0.16 ±0.01	0.13 ±0.02			
C20:3 n-6	0.51 ^a ±0.03	0.53 ^a ±0.02	0.73 ^b ±0.02	0.65 ^b ±0.04		***	
C20:4 n-6	21.61 ±0.34	21.02 ±0.27	20.90 ±0.33	20.67 ±0.39			
C22:4 n-6	0.89 ^a ±0.04	0.72 ^b ±0.07	0.91 ^a ±0.03	0.72 ^b ±0.05	**		
C22:5 n-6	1.03 ^a ±0.07	0.84 ^b ±0.05	0.86 ^{ab} ±0.06	0.69 ^b ±0.04	**	**	
Σ n-6	37.18^a ±0.47	35.87^c ±0.42	38.58^b ±0.43	36.68^{ac} ±0.42	***	*	
C18:3 n-3	0.25 ±0.03	0.34 ±0.07	0.35 ±0.04	0.33 ±0.06			
C20:5 n-3	0.10 ^a ±0.02	0.13 ^{ab} ±0.01	0.19 ^c ±0.01	0.16 ^{bc} ±0.02		***	*
C22:5 n-3	1.38 ^a ±0.15	2.36 ^c ±0.08	1.83 ^b ±0.08	2.51 ^c ±0.26	***	*	
C22:6 n-3	11.93 ^a ±0.47	13.09 ^b ±0.24	12.43 ^{ab} ±0.40	13.24 ^b ±0.29	*		
Σ n-3	13.66^a ±0.50	15.92^{bc} ±0.26	14.79^{ab} ±0.47	16.24^c ±0.52	***		

For table legend, see page 1.

Appendix C – Table 3: Lung fatty acids composition of total lipids

% FA	VO		VO+DPA		DL		DL+DPA		DPA	LM	DPA*LM
C14:0	1.02 ^a	±0.03	0.92 ^a	±0.03	1.74 ^b	±0.09	1.69 ^b	±0.17	***		
C15:0	0.19 ^a	±0.01	0.20 ^a	±0.01	0.51 ^b	±0.02	0.47 ^b	±0.02	***		
C16:0	28.19 ^a	±0.31	30.18 ^b	±0.53	29.06 ^{ab}	±0.33	29.15 ^{ab}	±0.40			*
C18:0	10.53 ^a	±0.31	11.57 ^b	±0.38	12.36 ^b	±0.16	12.31 ^b	±0.31	***		
C20:0	0.16 ^a	±0.02	0.19 ^a	±0.01	0.24 ^b	±0.01	0.24 ^b	±0.01	***		
Σ saturated	40.10^a	±0.31	43.06^b	±0.71	43.90^b	±0.36	43.85^b	±0.59	***		**
C16:1n-9	2.36 ^a	±0.10	2.88 ^b	±0.17	2.52 ^{ab}	±0.08	2.45 ^a	±0.10			*
C18:1n-9	29.61 ^a	±1.50	23.91 ^b	±1.88	18.90 ^c	±0.46	19.61 ^c	±0.83	***		*
C20:1n-9	0.66	±0.05	0.70	±0.05	0.64	±0.02	0.63	±0.03			
C20:3n-9	0.34 ^a	±0.04	0.47 ^b	±0.05	0.35 ^a	±0.02	0.41 ^{ab}	±0.04	*		
C22:1n-9	0.16 ^a	±0.02	0.30 ^b	±0.04	0.45 ^c	±0.05	0.44 ^c	±0.04		***	*
Σ n-9	33.13^a	±1.32	28.25^b	±1.61	22.87^c	±0.40	23.53^c	±0.77	***		*
C16:1n-7	1.96 ^{ab}	±0.15	1.76 ^a	±0.06	2.30 ^{ab}	±0.11	2.55 ^b	±0.28		**	
C18:1n-7	3.00	±0.06	2.85	±0.07	3.09	±0.09	3.11	±0.08		*	
C20:1n-7	0.19	±0.03	0.23	±0.04	0.26	±0.02	0.25	±0.02			
Σ n-7	5.15^{ab}	±0.21	4.84^a	±0.13	5.65^{bc}	±0.19	5.90^c	±0.34		**	
C18:2n-6	5.21 ^a	±0.17	4.33 ^b	±0.27	4.95 ^{ab}	±0.21	5.20 ^a	±0.33			*
C18:3n-6	0.04 ^a	±0.01	0.07 ^{ab}	±0.01	0.09 ^b	±0.01	0.08 ^{ab}	±0.01		**	*
C20:3n-6	0.31 ^a	±0.03	0.40 ^a	±0.04	0.61 ^b	±0.05	0.56 ^b	±0.04	***		
C20:4n-6	10.77 ^a	±0.60	12.43 ^{ab}	±0.69	14.27 ^b	±0.30	13.23 ^b	±0.55	***		*
C22:4n-6	2.30 ^a	±0.25	2.48 ^a	±0.23	3.11 ^b	±0.11	2.74 ^{ab}	±0.14	**		
C22:5n-6	0.23	±0.03	0.27	±0.04	0.27	±0.02	0.24	±0.02			
Σ n-6	18.87^a	±0.79	19.97^a	±0.77	23.31^b	±0.39	22.04^b	±0.45	***		*
C18:3n-3	0.34	±0.03	0.26	±0.04	0.32	±0.03	0.32	±0.05			*
C20:5n-3	0.30 ^a	±0.04	0.34 ^{ab}	±0.04	0.42 ^b	±0.03	0.37 ^{ab}	±0.03		*	
C22:5n-3	0.61 ^a	±0.06	1.26 ^b	±0.12	1.38 ^b	±0.04	1.80 ^c	±0.11	***	***	
C22:6n-3	1.51 ^a	±0.19	2.02 ^b	±0.18	2.16 ^b	±0.07	2.19 ^b	±0.09	*	**	*
Σ n-3	2.76^a	±0.29	3.88^b	±0.34	4.27^{bc}	±0.09	4.68^c	±0.16	**	***	*

For table legend, see page 1.

Appendix C – Table 4: Spleen fatty acids composition of total lipids

% FA	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM	DPA*LM
C14:0	0.43 ^a ±0.02	0.65 ^b ±0.08	0.97 ^c ±0.08	0.92 ^c ±0.09		***	
C16:0	25.37 ±0.34	24.80 ±0.41	25.40 ±0.37	25.27 ±0.53			
C18:0	14.96 ^{ab} ±0.48	12.96 ^b ±0.95	15.07 ^{ab} ±0.44	15.85 ^a ±0.44			*
C20:0	0.34 ^a ±0.14	0.11 ^b ±0.01	0.12 ^b ±0.01	0.15 ^{ab} ±0.02		*	
Σ saturated	41.11^{ab} ±0.88	38.52^b ±1.24	41.56^a ±0.45	42.18^a ±0.43			
C16:1n-9	0.42 ^{ab} ±0.01	0.44 ^a ±0.01	0.37 ^c ±0.02	0.39 ^{bc} ±0.02		**	
C18:1n-9	19.92 ^{ab} ±1.20	24.83 ^a ±2.96	17.39 ^b ±0.83	17.17 ^b ±0.90		**	
C20:1n-9	0.75 ±0.14	0.89 ±0.04	0.78 ±0.06	0.92 ±0.10			
C20:3n-9	0.58 ^a ±0.04	0.50 ^{ab} ±0.04	0.38 ^b ±0.04	0.41 ^b ±0.04		**	
C22:1n-9	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.09 ±0.01			
Σ n-9	22.08^a ±1.16	27.12^b ±2.88	19.73^a ±0.81	19.65^a ±0.85		**	
C16:1n-7	1.10 ±0.09	1.62 ±0.21	1.53 ±0.15	1.45 ±0.16			
C18:1n-7	3.91 ±0.25	3.51 ±0.09	3.96 ±0.15	3.92 ±0.18			
C20:1n-7	0.17 ^a ±0.03	0.10 ^b ±0.01	0.14 ^{ab} ±0.01	0.19 ^a ±0.02			**
Σ n-7	5.18 ±0.28	5.24 ±0.15	5.63 ±0.25	5.56 ±0.25			
C18:2n-6	4.19 ^a ±0.91	5.87 ^b ±0.35	6.35 ^b ±0.13	6.52 ^b ±0.24		**	
C20:2n-6	0.35 ^a ±0.04	0.24 ^b ±0.02	0.33 ^a ±0.01	0.33 ^a ±0.02			*
C20:3n-6	0.59 ^a ±0.11	0.62 ^a ±0.06	0.90 ^b ±0.05	0.95 ^b ±0.06		***	
C20:4n-6	20.74 ^a ±0.74	16.86 ^b ±1.61	19.60 ^{ab} ±0.65	18.66 ^{ab} ±1.16		*	
C22:4n-6	2.29 ^a ±0.11	1.68 ^c ±0.17	2.11 ^{ab} ±0.08	1.86 ^{bc} ±0.13		**	
C22:5n-6	0.29 ^a ±0.02	0.23 ^b ±0.03	0.24 ^{ab} ±0.01	0.20 ^b ±0.02		*	*
Σ n-6	28.46^{ab} ±0.70	25.50^a ±1.54	29.53^b ±0.69	28.52^{ab} ±1.14		*	
C18:3n-3	0.27 ±0.05	0.64 ±0.22	0.33 ±0.02	0.49 ±0.12		*	
C20:5n-3	0.18 ^{ab} ±0.03	0.13 ^a ±0.02	0.19 ^{ab} ±0.02	0.22 ^b ±0.03			
C22:5n-3	0.72 ^a ±0.03	1.00 ^b ±0.12	1.09 ^b ±0.06	1.39 ^c ±0.08		**	***
C22:6n-3	2.02 ±0.10	1.95 ±0.20	1.93 ±0.11	1.98 ±0.15			
Σ n-3	3.18^a ±0.14	3.62^{ab} ±0.35	3.55^{ab} ±0.17	4.08^b ±0.21		*	

For table legend, see page 1.

Appendix C – Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids

% FA	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM	DPA*LM
C14:0	0.67 ^{ab} ±0.05	0.56 ^a ±0.08	0.82 ^b ±0.07	0.72 ^{ab} ±0.05		*	
C16:0	21.12 ^a ±0.35	21.19 ^a ±0.22	22.58 ^b ±0.51	20.92 ^a ±0.26	**	**	*
C18:0	17.09 ±0.22	16.47 ±0.29	16.84 ±0.46	16.90 ±0.62			
Σ saturated	38.88^{ab} ±0.58	38.22^a ±0.27	40.24^b ±0.68	38.55^{ab} ±0.80			
C16:1 n-9	0.40 ^a ±0.03	0.36 ^a ±0.04	0.82 ^b ±0.17	0.39 ^a ±0.07	**	**	*
C18:1 n-9	16.6 ^{ab} ±0.58	16.64 ^{ab} ±0.86	17.47 ^a ±0.98	14.75 ^b ±0.88	*		
Σ n-9	17.00^{ab} ±0.59	17.00^{ab} ±0.89	18.29^a ±0.98	15.14^b ±0.86	*		
C16:1 n-7	0.68 ^a ±0.05	0.63 ^a ±0.10	1.16 ^b ±0.20	0.75 ^a ±0.07	*	**	
C18:1 n-7	2.76 ±0.15	2.63 ±0.10	2.66 ±0.21	2.70 ±0.04			
Σ n-7	3.44 ±0.15	3.26 ±0.17	3.82 ±0.36	3.45 ±0.09			
C18:2 n-6	6.30 ^a ±0.17	6.38 ^a ±0.13	8.83 ^b ±0.71	8.15 ^b ±0.85		***	
C20:2 n-6	0.25 ±0.04	0.35 ±0.10	0.34 ±0.09	0.27 ±0.04			
C20:3 n-6	0.50 ^{ab} ±0.04	0.55 ^b ±0.03	0.43 ^a ±0.05	0.69 ^c ±0.04	***		*
C20:4 n-6	26.76 ^a ±0.69	26.30 ^a ±0.96	21.17 ^b ±1.07	25.76 ^a ±0.78	**	***	**
C22:4 n-6	1.02 ±0.10	0.92 ±0.09	0.81 ±0.08	0.92 ±0.08			
C22:5 n-6	0.46 ±0.02	0.45 ±0.02	0.40 ±0.05	0.38 ±0.02			
Σ n-6	35.29^a ±0.76	34.93^a ±0.97	31.99^b ±0.86	36.17^a ±0.34	***	**	**
C18:3 n-3	0.59 ^a ±0.11	0.68 ^{ab} ±0.23	1.06 ^b ±0.09	0.42 ^a ±0.07	**	*	*
C20:5 n-3	0.35 ^a ±0.06	0.48 ^{ab} ±0.11	0.47 ^{ab} ±0.04	0.63 ^b ±0.10			
C22:5 n-3	0.80 ^a ±0.05	1.20 ^c ±0.03	1.05 ^b ±0.05	1.46 ^d ±0.07	***	***	
C22:6 n-3	3.66 ^{ab} ±0.20	4.23 ^a ±0.17	3.38 ^b ±0.14	4.18 ^a ±0.37	**		
Σ n-3	5.39^a ±0.26	6.58^b ±0.29	5.96^a ±0.23	6.70^b ±0.43	**		

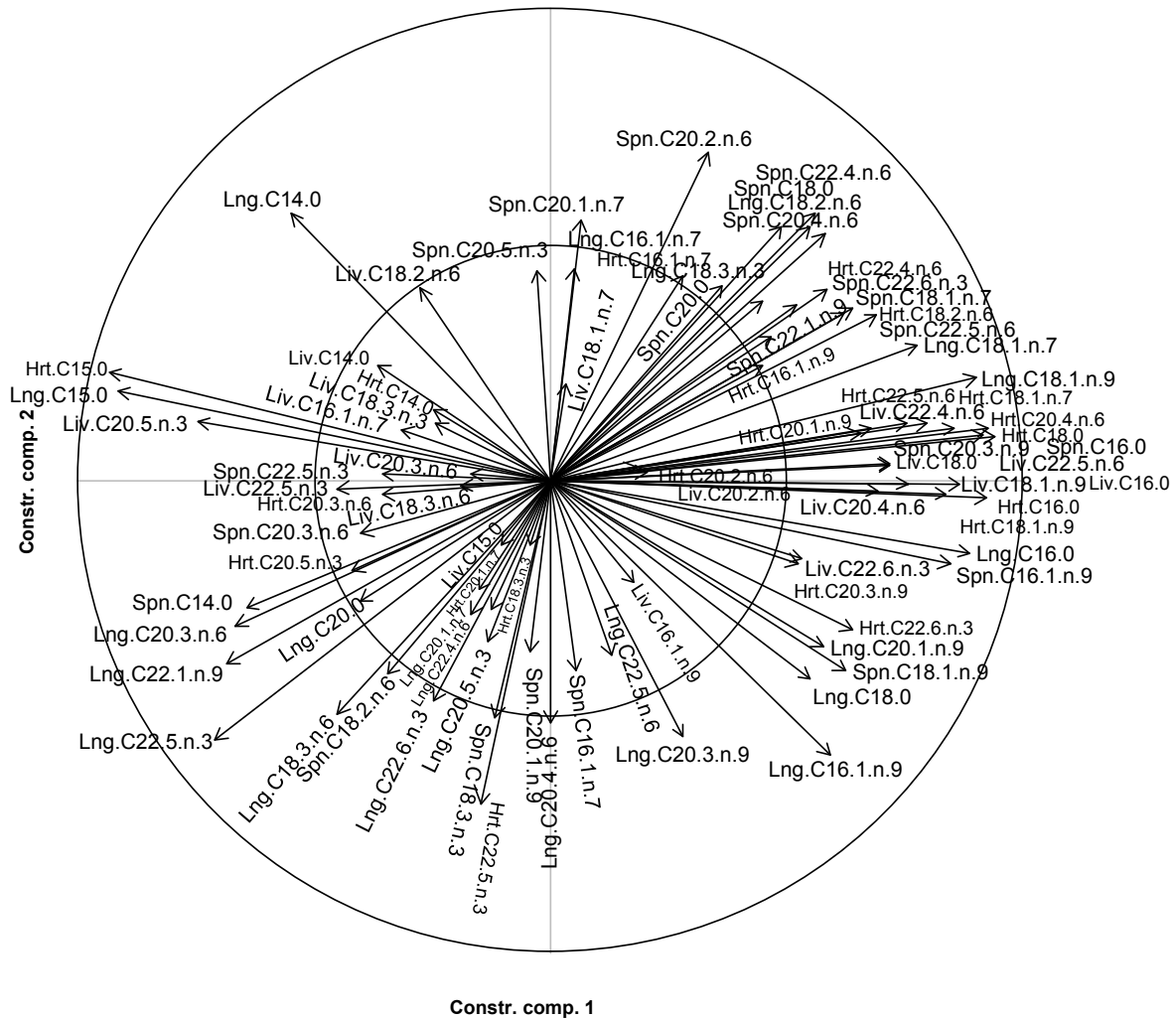
For table legend, see page 1.

Appendix C – Table 6: Brain fatty acids composition of phospholipids

% FA	VO	VO+DPA	DL	DL+DPA	DPA	LM	DPA*LM
C14:0	0.12 ^{ab} ±0.01	0.11 ^a ±0.01	0.17 ^b ±0.04	0.13 ^{ab} ±0.01			
C16:0	20.85 ^a ±0.94	20.96 ^a ±0.47	18.56 ^b ±0.7	19.21 ^{ab} ±0.97		*	
C18:0	20.56 ^a ±0.51	20.42 ^a ±0.66	19.5 ^b ±0.55	20.72 ^{ab} ±0.69		**	
C20:0	0.21 ^a ±0.01	0.21 ^a ±0.01	0.27 ^b ±0.02	0.23 ^{ab} ±0.01		*	
C22:0	0.38 ±0.02	0.39 ±0.04	0.48 ±0.02	0.42 ±0.04			
Σ saturated	42.13^a ±0.63	42.08^a ±0.62	38.97^b ±1.13	40.70^{ab} ±1.02			*
C16:1 n-9	0.18 ±0.04	0.15 ±0.01	0.16 ±0.02	0.15 ±0.02			
C18:1 n-9	17.42 ^a ±0.18	17.55 ^{ab} ±0.59	18.04 ^b ±0.66	17.84 ^{ab} ±0.50		*	
C20:1 n-9	1.03 ^a ±0.07	1.04 ^a ±0.08	1.38 ^b ±0.08	1.16 ^a ±0.05		**	
Σ n-9	18.63 ±0.20	18.73 ±0.56	19.58 ±0.69	19.15 ±0.51			
C16:1 n-7	0.37 ±0.01	0.39 ±0.01	0.41 ±0.04	0.38 ±0.02			
C18:1 n-7	3.99 ±0.12	3.88 ±0.22	4.17 ±0.18	4.29 ±0.17			
C20:1 n-7	0.39 ^a ±0.03	0.37 ^a ±0.03	0.49 ^b ±0.02	0.43 ^{ab} ±0.02		**	
C22:1 n-7	0.13 ^a ±0.01	0.13 ^a ±0.01	0.17 ^b ±0.01	0.14 ^a ±0.02		*	
Σ n-7	4.87 ±0.12	4.76 ±0.20	5.24 ±0.17	5.24 ±0.18			
C18:2 n-6	0.58 ^a ±0.04	0.60 ^b ±0.04	0.71 ^b ±0.03	0.68 ^b ±0.03		**	
C20:2 n-6	0.13 ±0.05	0.09 ±0.01	0.11 ±0.01	0.10 ±0.01			
C20:3 n-6	0.36 ^a ±0.02	0.36 ^a ±0.01	0.46 ^b ±0.02	0.41 ^{ab} ±0.02		***	
C20:4 n-6	11.75 ±0.43	11.87 ±0.68	11.82 ±0.27	11.48 ±0.68			
C22:4 n-6	3.53 ±0.12	3.48 ±0.13	3.51 ±0.09	3.22 ±0.19			
C22:5 n-6	0.65 ^a ±0.02	0.52 ^b ±0.02	0.51 ^b ±0.02	0.48 ^b ±0.02	***	***	*
Σ n-6	17.01 ±0.53	16.92 ±0.76	17.13 ±0.30	16.37 ±0.79			
C22:5 n-3	0.13 ^a ±0.01	0.13 ^a ±0.01	0.17 ^b ±0.01	0.14 ^{ab} ±0.01	*	**	
C22:6 n-3	17.23 ^a ±0.32	17.37 ^{ab} ±0.26	18.92 ^c ±0.60	18.39 ^{bc} ±0.62		**	
Σ n-3	17.36^a ±0.32	17.51^a ±0.27	19.08^b ±0.60	18.53^{ab} ±0.63		**	

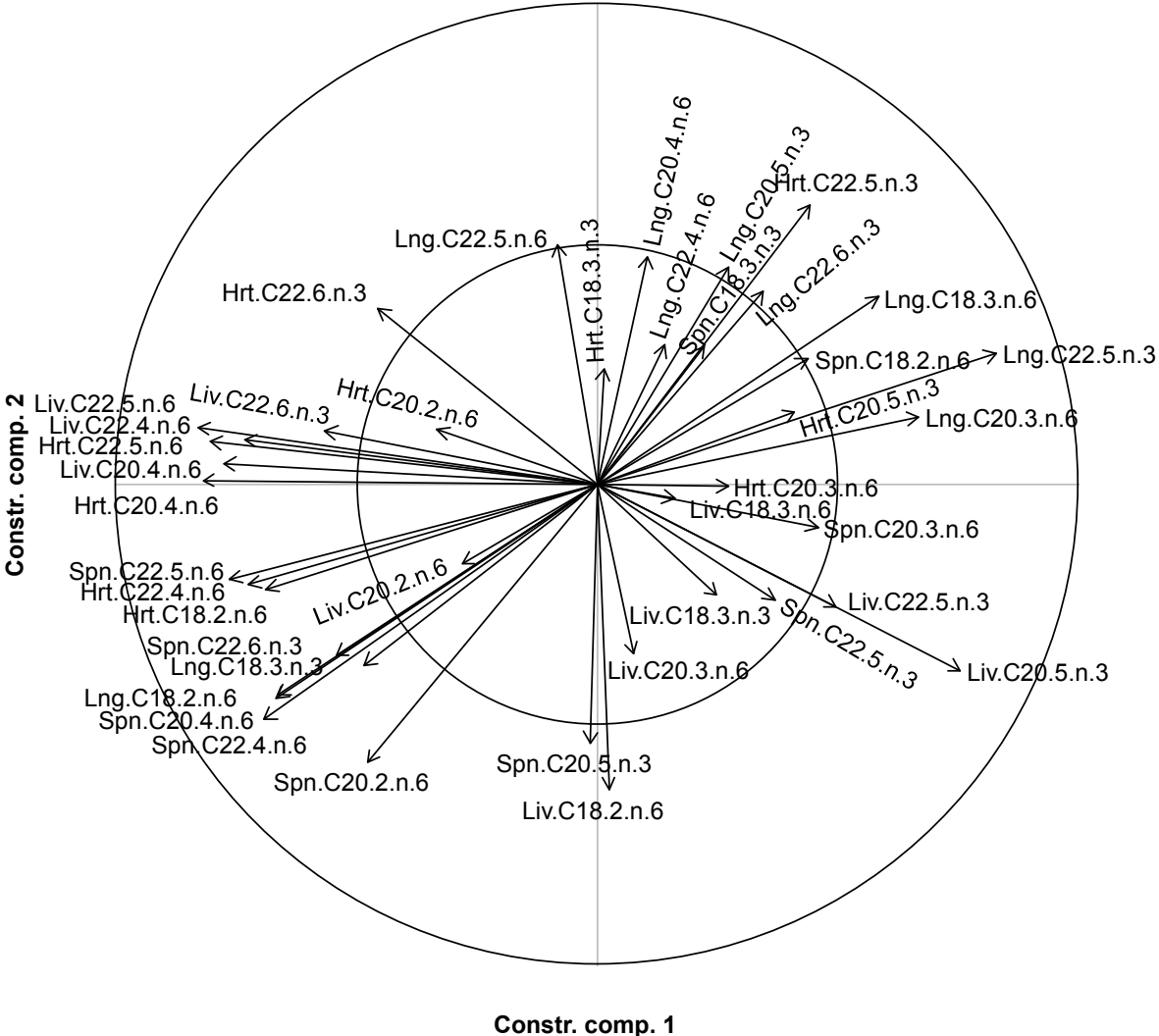
For table legend, see page 1.

Appendix D – Figure 1: Loadings plot of Figure3 A



Redundancy analysis of fatty acids (FA) composition of the liver, heart, lung, and spleen of all identified FA of rats fed the vegetable oils blend diet or the vegetable oil and dairy lipid blend diet not supplemented or supplemented with 0.5% DPA from weaning for 6 weeks (n=8/group, Experiment 2).

Appendix D – Figure 2: Loadings plot of Figure 3 B.



Redundancy analysis of fatty acids (FA) composition of the liver, heart, lung, and spleen of all identified long-chain polyunsaturated fatty acids of rats fed the vegetable oils blend diet or the vegetable oil and dairy lipid blend diet not supplemented or supplemented with 0.5% DPA (n=8/group, Experiment 2).

ANNEXE III:
Supplementary Material de l'article 02

**Comparative effects of n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA
and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty
acid tissue composition in rats**

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Appendix A

Appendix A – Table 1: Plasma assays

Plasma assays	Ctrl	EPA	DPA	DHA
Free-cholesterol (<i>mg/dL</i>)	14.1 ±0.7	14.0 ±2.1	12.2 ±0.8	16.0 ±1.9
Malondialdehyde ($\mu\text{mol/L}$) ²	0.23 ±0.02	0.25 ±0.04	0.26 ±0.03	0.32 ±0.04
TNF- α (<i>pg/mL</i>)	0.51 ±0.01	0.51 ±0.01	0.51 ±0.01	0.51 ±0.01
IL-2 (<i>pg/mL</i>)	0.43 ±0.01	0.44 ±0.01	0.43 ±0.01	0.44 ±0.01
IL-6 (<i>pg/mL</i>)	1.79 ±0.01	1.78 ±0.01	1.78 ±0.01	1.77 ±0.01
Glucose (<i>g/L</i>)	1.59 ±0.22	1.31 ±0.24	1.63 ±0.25	1.71 ±0.26
Plasma creatinin (<i>mg/dL</i>)	6.3 ±0.2	6.4 ±0.2	6.7 ±0.3	6.3 ±0.2
Urine creatinin (<i>mg/dL</i>)	145 ±35	91 ±14	113 ±29	117 ±24
Hemoglobin (<i>mg/dL</i>)	11.5 ±0.3	11.6 ±0.4	12.0 ±0.3	11.4 ±0.3

Values are mean \pm SEM of plasma assays of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) or docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. No significant differences for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$) were found.

Appendix B

Appendix B – Table 1: Pearson correlation coefficient tests of total fatty acids proportions represented in Figure 3 (A-B).

The first constrained component negatively discriminated the control group from the three supplemented-diets. The second constrained component positively discriminated the DHA group from the three others.

RDA Pearson correlation coefficient and test between FA and individuals						
First constrained component				Second constrained component		
Tissue -Fatty acid	Corr	P.value		Tissue-Fatty acid	Corr	P.value
Liv.C20:5.n-3	0,865	3,05E-08	***	Lng C22:6 n-3	0,739	2.27E-04 ***
Spn.C20:5.n-3	0,834	1,68E-07	***	Brn C18:1 n-7	0,654	4.21E-03 **
Lng.C22:1.n-9	0,811	5,24E-07	***	Hrt C18:1 n-7	0,61	7.07E-03 **
RBC.C20:5.n-3	0,796	1,23E-06	***	Hrt C22:6 n-3	0,584	9.14E-03 **
Hrt.C20:5.n-3	0,768	6,14E-06	***	Spleno C22:6 n-3	0,583	9.14E-03 **
Lng.C22:5.n-3	0,754	1,18E-05	***	Spn C14:0	0,574	9.97E-03 **
Spleno.C22:5.n-3	0,735	2,51E-05	***	Hrt C16:0	0,556	1.47E-02 *
Brn.C22:5.n-3	0,722	4,29E-05	***	Spn C18:1 n-9	0,549	1.60E-02 *
Spn.C22:5.n-3	0,702	8,46E-05	***	Spleno C20:4 n-6	0,533	2.08E-02 *
Liv.C22:5.n-3	0,653	4,82E-04	***	Brn C22:6 n-3	0,529	2.08E-02 *
Spleno.C20:5.n-3	0,602	2,06E-03	**	Lng C16:0	0,506	3.27E-02 *
Spleno.C22:6.n-3	0,520	1,43E-02	*	Spn C22:6 n-3	0,502	3.27E-02 *
Brn.C20:3.n-6	0,501	2,06E-02	*	Liv C18:1 n-9	0,501	3.27E-02 *
Hrt.C16:1.n-9	0,482	2,51E-02	*	Kdy C18:0	0,49	3.54E-02 *
Spn.C20:3.n-6	0,464	3,35E-02	*	Spn C16:0	0,484	3.81E-02 *
Hrt.C22:5.n-3	0,460	3,48E-02	*	Spn C16:1 n-7	0,463	4.74E-02 *
Spn.C20:1.n-7	0,429	5,89E-02	.	Liv C16:1 n-7	0,453	5.60E-02 .
RBC.C22:5.n-3	0,378	1,14E-01	.	Brn C12:0	0,441	6.09E-02 .
Spn.C20:1.n-9	0,373	1,20E-01	.	Brn C22:1 n-9	0,441	6.09E-02 .
Spn.C22:6.n-3	0,352	1,56E-01	.	Brn C24:5 n-3	0,441	6.09E-02 .
RBC.C20:3.n-6	0,335	1,91E-01	.	Liv C16:1 n-9	0,433	6.65E-02 .
Liv.C22:6.n-3	0,315	2,34E-01	.	Kdy C18:2 n-6	0,427	6.95E-02 .
Spleno.C20:3.n-6	0,305	2,59E-01	.	RBC C22:6 n-3	0,427	6.95E-02 .
Spn.C16:1.n-9	0,294	2,74E-01	.	Lng C16:1 n-7	0,422	7.37E-02 .
Brn.C16:1.n-9	0,287	2,87E-01	.	Kdy C20:2 n-6	0,417	7.85E-02 .
Brn.C22:0	0,286	2,87E-01	.	Hrt C18:0	0,403	9.41E-02 .
RBC.C22:6.n-3	0,281	3,01E-01	.	Brn C20:1 n-7	0,4	9.63E-02 .
Spn.C18:2.n-6	0,276	3,07E-01	.	Lng C18:1 n-7	0,393	1.02E-01
Spn.C18:3.n-3	0,269	3,21E-01	.	Liv C16:0	0,393	1.02E-01
Spleno.C18:2.n-6	0,260	3,33E-01	.	Brn C20:1 n-9	0,391	1.03E-01
Spn.C22:1.n-9	0,245	3,61E-01	.	Spleno C20:3 n-6	0,386	1.09E-01
RBC.C14:0	0,241	3,66E-01	.	Hrt C18:1 n-9	0,381	1.17E-01

First constrained component			Second constrained component		
Tissue -Fatty acid	Corr	P.value	Tissue-Fatty acid	Corr	P.value
Brn.C20:2.n-6	0,238	3,74E-01	Brn C22:0	0,376	1.21E-01
Spleno.C20:4.n-6	0,231	3,94E-01	Brn C20:2 n-6	0,361	1.48E-01
Brn.C20:3.n-9	0,219	4,20E-01	Kdy C20:4 n-6	0,358	1.49E-01
Liv.C20:3.n-6	0,216	4,25E-01	Kdy C20:3 n-6	0,349	1.59E-01
Brn.C20:4.n-6	-0,418	6,50E-02	Lng C20:5 n-3	-0,259	3.49E-01
Spleno.C20:2.n-6	-0,418	6,50E-02	Hrt C16:1 n-9	-0,262	3.43E-01
RBC.C22:5.n-6	-0,420	6,50E-02	Liv C18:0	-0,264	3.43E-01
Spn.C16:0	-0,423	6,41E-02	Kdy C16:1 n-7	-0,265	3.43E-01
Brn.C22:5.n-6	-0,433	5,62E-02	Kdy C18:1 n-7	-0,271	3.37E-01
Liv.C20:4.n-6	-0,473	2,85E-02	Spn C16:1 n-9	-0,291	2.82E-01
Brn.C12:0	-0,481	2,51E-02	Liv C22:5 n-6	-0,318	2.10E-01
Brn.C22:1.n-9	-0,481	2,51E-02	Liv C20:4 n-6	-0,332	1.85E-01
Brn.C24:5.n-3	-0,481	2,51E-02	Liv C22:4 n-6	-0,335	1.83E-01
Brn.C16:0	-0,485	2,51E-02	Spn C20:5 n-3	-0,337	1.82E-01
Brn.C18:0	-0,486	2,51E-02	Liv C20:1 n-9	-0,348	1.59E-01
RBC.C20:4.n-6	-0,494	2,28E-02	Hrt C20:5 n-3	-0,352	1.58E-01
Spleno.C16:0	-0,503	2,04E-02	Kdy C18:3 n-3	-0,357	1.50E-01
Kdy.C18:1.n-7	-0,521	1,43E-02	Spn C20:3 n-6	-0,36	1.48E-01
Liv.C22:4.n-6	-0,565	5,16E-03	Lng C22:5 n-6	-0,407	8.95E-02
Lng.C18:1.n-7	-0,580	3,50E-03	Spn C20:3 n-9	-0,433	6.65E-02
Kdy.C16:0	-0,581	3,50E-03	Spleno C14:0	-0,45	5.65E-02
Spn.C22:5.n-6	-0,602	2,06E-03	Spn C22: n-6	-0,465	4.74E-02
Kdy.C22:4.n-6	-0,631	9,05E-04	Hrt C22:5 n-6	-0,468	4.64E-02
Spn.C20:4.n-6	-0,636	8,08E-04	Lng C22:5 n-3	-0,48	3.81E-02
Hrt.C20:4.n-6	-0,678	2,04E-04	Spn C22:5 n-6	-0,482	3.81E-02
Spn.C22:4.n-6	-0,681	1,92E-04	RBC C22:5 n-3	-0,493	3.50E-02
Hrt.C22:5.n-6	-0,706	7,71E-05	Spn C20:1 n-9	-0,497	3.40E-02
Lng.C20:4.n-6	-0,719	4,70E-05	Spn C20:1 n-7	-0,53	2.08E-02
Lng.C22:5.n-6	-0,741	2,10E-05	Liv C22:5 n-3	-0,581	9.14E-03
Liv.C22:5.n-6	-0,826	2,03E-07	Spn C22:5 n-3	-0,596	8.94E-03
Hrt.C22:4.n-6	-0,828	2,03E-07	Hrt C22:5 n-3	-0,615	7.07E-03
Lng.C22:4.n-6	-0,848	7,73E-08	Spn C20:2 n-6	-0,627	6.91E-03

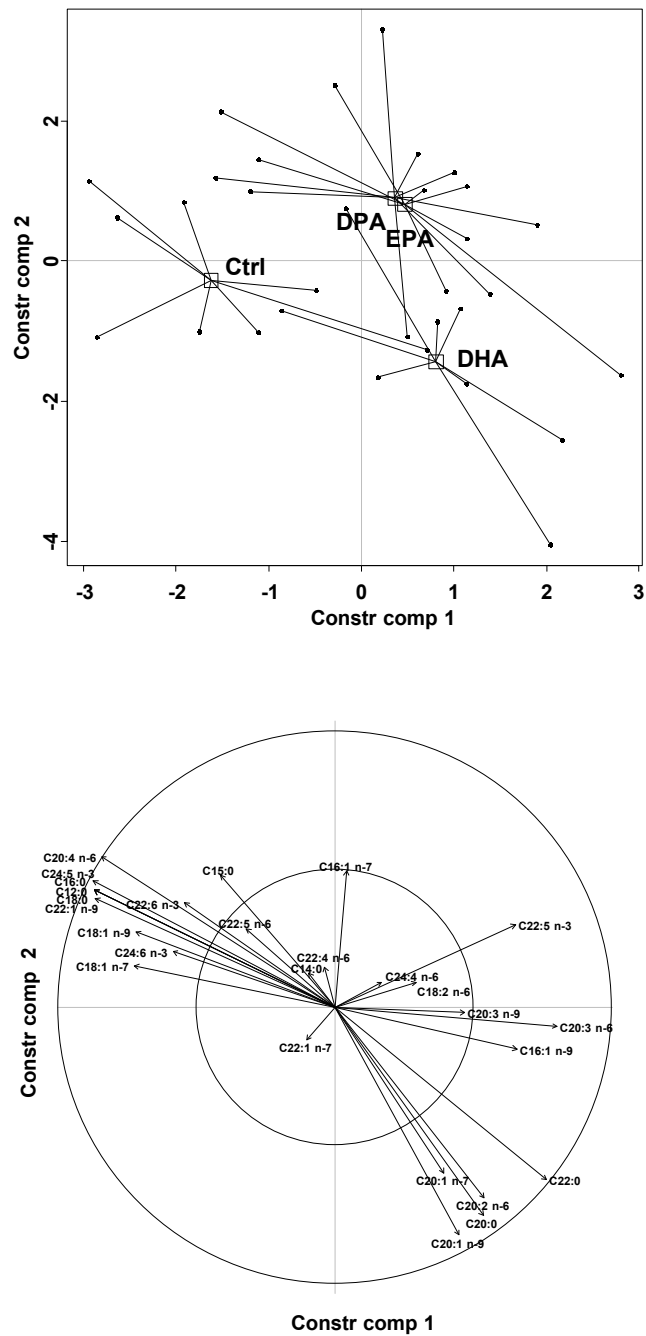
Appendix B – Table 2: Pearson correlation coefficient tests of polyunsaturated fatty acids proportions represented in Figure 3 (C-D).

The first constrained component negatively discriminated the control group from the three supplemented-diets. The second constrained component positively discriminated the DHA group from the three others. Only the most correlated variables were presented.

RDA Pearson correlation coefficient and test between FA and individuals						
First constrained component				Second constrained component		
Tissue -Fatty acid	Corr	P.value		Tissue-Fatty acid	Corr	P.value
Spn.C20:5.n-3	0.876	1.31E-09	***	Lng C22:6 n-3	0.81	1.20E-06 ***
Liv.C20:5.n-3	0.872	1.56E-09	***	Hrt C22:6 n-3	0.65	1.59E-03 **
RBC.C20:5.n-3	0.813	2.10E-07	***	Spn C22:6 n-3	0.61	3.42E-03 **
Spleno.C22:5.n-3	0.807	2.73E-07	***	Brn C22:6 n-3	0.60	3.58E-03 **
Hrt.C20:5.n-3	0.791	6.40E-07	***	Spleno C22:6 n-3	0.56	7.46E-03 **
Lng.C22:5.n-3	0.765	2.48E-06	***	Spleno C20:4 n-6	0.53	1.43E-02 *
Spn.C22:5.n-3	0.733	1.06E-05	***	RBC C22:6 n-3	0.51	1.74E-02 *
Liv.C22:5.n-3	0.682	8.57E-05	***	Kdy C18:2 n-6	0.51	1.74E-02 *
Spleno.C20:5.n-3	0.657	1.96E-04	***	Brn C24:5 n-3	0.48	2.59E-02 *
Brn.C22:5.n-3	0.619	6.04E-04	***	Spleno C20:3 n-6	0.44	5.03E-02 .
Spleno.C22:6.n-3	0.561	2.62E-03	**	Kdy C20:2n-6	0.44	5.47E-02 .
Spn.C20:3.n-6	0.450	2.56E-02	*	Hrt C20:3n-6	0.43	5.47E-02 .
Hrt.C22:5.n-3	0.449	2.56E-02	*	Hrt C18:2n-6	0.40	8.57E-02 .
RBC.C22:5.n-3	0.408	5.01E-02	.	Brn C20:4 n-6	0.39	9.51E-02 .
Spleno.C20:3.n-6	0.300	1.92E-01		Kdy C20:3 n-6	0.37	1.22E-01
Brn.C20:3.n-6	0.287	2.15E-01		Brn C20:2 n-6	0.36	1.30E-01
Spn.C22:6.n-3	0.276	2.38E-01		Spleno C18:2 n-6	0.35	1.42E-01
RBC.C22:6.n-3	0.257	2.67E-01		Spn C18:2 n-6	0.35	1.45E-01
RBC.C20:3.n-6	0.244	3.00E-01		Lng C20:3 n-6	0.34	1.45E-01
Spleno.C20:4.n-6	0.216	3.79E-01		Kdy C20:4 n-6	0.34	1.56E-01
Liv.C22:6.n-3	0.190	4.36E-01		Brn C20:3 n-6	0.32	1.92E-01
Spleno.C18:2.n-6	0.155	5.31E-01		Brn C22:4 n-6	0.29	2.57E-01
Spn.C18:2.n-6	0.146	5.46E-01		Hrt C20:2 n-6	0.29	2.57E-01
Brn.C20:2.n-6	0.145	5.46E-01		Spleno C22:4 n-6	0.27	2.90E-01
Spn.C18:3.n-3	0.140	5.57E-01		RBC C18:2 n-6	0.26	3.11E-01
Spn.C20:2.n-6	0.113	6.26E-01		RBC C20:3 n-6	0.26	3.11E-01
Liv.C20:3.n-6	0.104	6.52E-01		Liv C22:6 n-3	0.25	3.31E-01
Brn.C18:2.n-6	0.071	7.69E-01		Brn C24:4 n-6	0.23	3.63E-01
Lng.C22:6.n-3	0.060	7.85E-01		Liv C18:3 n-6	0.22	3.81E-01
Lng.C20:3.n-6	0.048	8.06E-01		Hrt C18:3 n-3	0.22	3.81E-01
Liv.C18:2.n-6	-0.033	8.58E-01		Lng C18:2 n-6	0.20	4.21E-01
RBC.C18:2.n-6	-0.051	8.02E-01		Kdy C22:6 n-3	0.20	4.21E-01
Kdy.C22:5.n-3	-0.055	7.96E-01		Spleno C20:2 n-6	0.18	5.03E-01
Hrt.C22:6.n-3	-0.063	7.81E-01		RBC C20:4 n-6	0.17	5.24E-01
Lng.C18:2.n-6	-0.068	7.70E-01		Brn C18:2 n-6	0.16	5.44E-01

First constrained component			Second constrained component		
Tissue -Fatty acid	Corr	P.value	Tissue-Fatty acid	Corr	P.value
Spleno.C22:4.n-6	-0.080	7.39E-01	Kdy C22:4 n-6	0.14	6.22E-01
Kdy.C20:5.n-3	-0.101	6.56E-01	Liv C18:2 n-6	0.13	6.42E-01
Kdy.C20:4.n-6	-0.119	6.09E-01	Brn C24:6 n-3	0.13	6.45E-01
RBC.C20:2.n-6	-0.120	6.09E-01	Liv C18:3 n-3	0.11	6.95E-01
Hrt.C20:2.n-6	-0.131	5.79E-01	Lng C20:4 n-6	0.11	6.95E-01
Liv.C18:3.n-3	-0.138	5.57E-01	Kdy C20:5 n-3	0.10	7.10E-01
Lng.C18:3.n-6	-0.151	5.38E-01	Lng C18:3 n-6	0.09	7.34E-01
Kdy.C20:3.n-6	-0.162	5.12E-01	Spn C18:3 n-3	0.08	7.63E-01
Lng.C18:3.n-3	-0.166	5.03E-01	RBC C22:5 n-6	0.08	7.69E-01
Hrt.C20:3.n-6	-0.181	4.53E-01	Liv C20:3 n-6	0.07	7.91E-01
Hrt.C18:3.n-3	-0.182	4.53E-01	RBC C18:3 n-3	0.03	9.12E-01
RBC.C22:4.n-6	-0.195	4.24E-01	Liv C20:5 n-3	0.02	9.50E-01
Brn.C24:4.n-6	-0.198	4.21E-01	Kdy C22:5 n-3	0.01	9.62E-01
Kdy.C20:2.n-6	-0.203	4.11E-01	RBC C20:2 n-6	0.01	9.71E-01
RBC.C18:3.n-3	-0.208	4.00E-01	Brn C22:5 n-3	-0.01	9.71E-01
Brn.C22:6.n-3	-0.224	3.60E-01	Spleno C22:5 n-3	-0.02	9.58E-01
Spleno.C22:5.n-6	-0.261	2.63E-01	RBC C20:5 n-3	-0.06	8.11E-01
Kdy.C18:3.n-3	-0.267	2.50E-01	Spn C20:4 n-6	-0.06	8.04E-01
Kdy.C18:2.n-6	-0.272	2.42E-01	Lng C22:4 n-6	-0.09	7.39E-01
Brn.C22:4.n-6	-0.299	1.92E-01	Hrt C20:4 n-6	-0.09	7.27E-01
Hrt.C18:2.n-6	-0.327	1.40E-01	Brn C22:5 n-6	-0.12	6.58E-01
Brn.C24:6.n-3	-0.330	1.38E-01	Spleno C20:5 n-3	-0.12	6.56E-01
Liv.C18:3.n-6	-0.350	1.09E-01	Lng C18:3 n-3	-0.13	6.42E-01
Lng.C20:5.n-3	-0.376	7.66E-02	RBC C22:4 n-6	-0.16	5.59E-01
Kdy.C22:6.n-3	-0.387	6.72E-02	Lng C20:5 n-3	-0.17	5.24E-01
Spleno.C20:2.n-6	-0.392	6.33E-02	Spn C20:3 n-6	-0.18	4.97E-01
RBC.C22:5.n-6	-0.454	2.46E-02	Hrt C22:4 n-6	-0.22	3.81E-01
RBC.C20:4.n-6	-0.507	8.58E-03	Liv C20:4 n-6	-0.23	3.67E-01
Brn.C24:5.n-3	-0.530	5.32E-03	Kdy C18:3 n-3	-0.23	3.63E-01
Brn.C20:4.n-6	-0.537	4.66E-03	Hrt C20:5 n-3	-0.24	3.57E-01
Brn.C22:5.n-6	-0.568	2.29E-03	Liv C22:4 n-6	-0.25	3.29E-01
Liv.C20:4.n-6	-0.587	1.41E-03	Spn C20:5 n-3	-0.28	2.71E-01
Kdy.C22:4.n-6	-0.608	7.93E-04	Liv C22:5 n-6	-0.29	2.54E-01
Spn.C22:5.n-6	-0.629	4.53E-04	Spleno C22:5 n-6	-0.31	2.11E-01
Liv.C22:4.n-6	-0.639	3.40E-04	Spn C20:2 n-6	-0.37	1.14E-01
Spn.C20:4.n-6	-0.680	8.57E-05	Spn C22:4 n-6	-0.39	9.51E-02
Spn.C22:4.n-6	-0.707	3.17E-05	Lng C22:5 n-6	-0.42	6.65E-02
Lng.C20:4.n-6	-0.738	8.74E-06	Lng C22:5 n-3	-0.49	2.55E-02
Hrt.C22:5.n-6	-0.753	4.35E-06	Spn C22:5 n-6	-0.51	1.74E-02
Hrt.C20:4.n-6	-0.780	1.11E-06	Hrt C22:5 n-6	-0.53	1.37E-02
Lng.C22:5.n-6	-0.797	4.64E-07	RBC C22:5 n-3	-0.58	5.17E-03
Liv.C22:5.n-6	-0.860	4.39E-09	Liv C22:5 n-3	-0.58	5.17E-03
Hrt.C22:4.n-6	-0.881	1.13E-09	Spn C22:5 n-3	-0.62	2.70E-03
Lng.C22:4.n-6	-0.887	1.12E-09	Hrt C22:5 n-3	-0.71	1.84E-04

Appendix C



Appendix C - Figure 1. Redundancy analysis of the fatty acid composition of the brain of rats supplemented with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA) (●) or not supplemented (Ctrl) (○) for 6 weeks. Scatter plot (A) showed individuals scores for total fatty acids included in the models, expressing 27.0% of the total constrained variance. The label of each group of rats represents the barycenter of individual's dispersion. A permutation test was used to consider the significance of the model ($\alpha=0.05$) and no effect of the diets was found ($p=0.136$) indicating that the diets did not affect the overall fatty acid composition of the brain. Loadings plot (B) showed correlation coefficient between FA data of each tissue and individual scores for all fatty acids included in the model.

Appendix D

Legend for all Tables of the Appendix D:

Fatty acid tissue compositions of rats supplemented or not with 1% eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA) or not supplemented (Ctrl) for 6 weeks. Values are mean \pm SEM. Different superscript letters indicate significant differences between groups for multiple comparisons following ANOVA (Duncan, $p < 0.05$). The tissues are presented in the same order than their appearance in the article.

Appendix D – Table 1: Liver total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 2: Heart total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 3: Lung total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 4: Spleen total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 5: Kidney total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 6: Red blood cells total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 7: Brain total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 8: Splenocytes total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 9: Peripheral blood mononucleated cells total lipid fatty acid composition.

Appendix D – Table 1: Liver total lipid fatty acid composition.

	Ctrl		EPA		DPA		DHA	
C14:0	0.88	±0.06	0.84	±0.07	0.88	±0.11	0.92	±0.13
C15:0	0.41	±0.03	0.31	±0.03	0.39	±0.05	0.35	±0.04
C16:0	22.34	±0.30	22.89	±0.76	22.30	±0.66	23.02	±0.27
C18:0	12.31	±0.50	12.63	±0.77	12.80	±0.87	11.57	±0.67
Σ saturateds	35.93	±0.48	36.66	±0.82	36.38	±0.71	35.87	±0.51
C16:1 n-9	0.40	±0.02	0.43	±0.03	0.49	±0.09	0.49	±0.03
C18:1 n-9	24.81	±1.01	24.54	±1.02	23.65	±1.50	26.11	±1.29
C20:1 n-9	0.32 ^{ab}	±0.06	0.34 ^a	±0.03	0.26 ^{ab}	±0.03	0.19 ^b	±0.02
C20:3 n-9	0.30	±0.03	0.28	±0.02	0.26	±0.03	0.24	±0.02
Σ n-9	25.82	±0.98	25.58	±1.02	24.66	±1.52	27.04	±1.31
C16:1 n-7	2.64	±0.25	2.30	±0.45	2.30	±0.41	3.16	±0.31
C18:1 n-7	4.08	±0.17	3.65	±0.30	3.60	±0.25	3.94	±0.06
Σ n-7	6.73	±0.40	5.94	±0.73	5.90	±0.64	7.10	±0.32
C18:2 n-6	9.37	±0.27	10.12	±0.63	10.18	±0.25	9.67	±0.42
C18:3 n-6	0.19	±0.02	0.16	±0.02	0.13	±0.02	0.16	±0.01
C20:3 n-6	0.65	±0.09	0.71	±0.05	0.69	±0.07	0.72	±0.08
C20:4 n-6	14.05 ^a	±0.54	11.76 ^{ab}	±0.73	12.77 ^{ab}	±1.00	10.77 ^b	±0.68
C22:4 n-6	0.19 ^a	±0.01	0.15 ^b	±0.01	0.16 ^b	±0.01	0.13 ^b	±0.01
C22:5 n-6	0.19 ^a	±0.01	0.08 ^b	±0.01	0.11 ^b	±0.01	0.08 ^b	±0.01
Σ n-6	24.63^a	±0.72	22.98^{ab}	±1.20	24.04^{ab}	±1.09	21.53^b	±0.74
C18:3 n-3	0.63	±0.06	0.55	±0.04	0.69	±0.05	0.63	±0.09
C20:5 n-3	0.33 ^a	±0.04	0.88 ^c	±0.09	0.67 ^b	±0.07	0.62 ^b	±0.05
C22:5 n-3	0.47 ^a	±0.02	0.89 ^b	±0.06	0.95 ^b	±0.07	0.49 ^a	±0.02
C22:6 n-3	5.46 ^a	±0.17	6.51 ^{ab}	±0.30	6.72 ^b	±0.52	6.72 ^b	±0.49
Σ n-3	6.89^a	±0.20	8.83^b	±0.33	9.03^b	±0.53	8.46^b	±0.49

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 2: Heart total lipid fatty acid composition.

	Ctrl		EPA		DPA		DHA	
C14:0	0.27	±0.01	0.26	±0.01	0.27	±0.02	0.29	±0.01
C15:0	0.13	±0.02	0.16	±0.02	0.14	±0.01	0.16	±0.01
C16:0	11.21 ^a	±0.13	11.71 ^{ab}	±0.45	11.79 ^{ab}	±0.15	12.44 ^b	±0.46
C18:0	19.89	±0.23	19.96	±0.24	19.55	±0.12	20.01	±0.32
C20:0	0.11	±0.01	0.12	±0.01	0.11	±0.01	0.11	±0.01
Σ saturateds	31.62	±0.14	32.21	±0.63	31.86	±0.12	33.01	±0.77
C16:1 n-9	0.17 ^a	±0.01	0.22 ^b	±0.02	0.22 ^b	±0.02	0.19 ^{ab}	±0.01
C18:1 n-9	8.85	±0.29	9.03	±0.35	8.58	±0.16	9.25	±0.38
C20:1 n-9	0.22	±0.01	0.21	±0.02	0.18	±0.01	0.23	±0.02
C20:3 n-9	0.38	±0.03	0.39	±0.04	0.29	±0.05	0.38	±0.03
Σ n-9	9.62	±0.30	9.85	±0.37	9.27	±0.14	10.04	±0.40
C16:1 n-7	0.60	±0.05	0.61	±0.04	0.66	±0.06	0.68	±0.05
C18:1 n-7	4.70 ^{ab}	±0.13	4.36 ^b	±0.17	4.49 ^{ab}	±0.07	4.92 ^a	±0.18
Σ n-7	5.30^{ab}	±0.16	4.97^b	±0.19	5.15^{ab}	±0.11	5.60^a	±0.21
C18:2 n-6	15.04	±0.34	15.55	±0.47	14.36	±0.22	15.21	±0.31
C20:2 n-6	0.16	±0.01	0.19	±0.03	0.15	±0.03	0.18	±0.01
C20:3 n-6	0.73	±0.02	0.74	±0.04	0.72	±0.03	0.78	±0.03
C20:4 n-6	20.94 ^a	±0.33	18.86 ^b	±0.57	19.01 ^b	±0.26	17.6 ^c	±0.42
C22:4 n-6	0.91 ^a	±0.03	0.54 ^b	±0.02	0.60 ^b	±0.02	0.52 ^b	±0.03
C22:5 n-6	0.86 ^a	±0.06	0.31 ^c	±0.03	0.53 ^b	±0.03	0.24 ^c	±0.02
Σ n-6	38.64^a	±0.43	36.18^b	±0.78	35.35^b	±0.28	34.53^b	±0.61
C18:3 n-3	0.35	±0.04	0.33	±0.03	0.27	±0.03	0.34	±0.03
C20:5 n-3	0.19 ^a	±0.01	0.48 ^c	±0.03	0.32 ^b	±0.03	0.25 ^a	±0.02
C22:5 n-3	1.83 ^a	±0.08	3.13 ^b	±0.31	4.39 ^c	±0.22	1.48 ^a	±0.07
C22:6 n-3	12.45 ^a	±0.40	12.85 ^a	±0.33	13.39 ^{ab}	±0.36	14.75 ^b	±0.75
Σ n-3	14.82^a	±0.48	16.78^b	±0.45	18.37^c	±0.20	16.82^b	±0.81

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 3: Lung total lipid fatty acid composition.

	Ctrl	EPA	DPA	DHA
C14:0	1.75 ±0.09	1.69 ±0.08	1.64 ±0.05	1.67 ±0.05
C15:0	0.52 ±0.02	0.50 ±0.02	0.53 ±0.03	0.52 ±0.03
C16:0	29.90 ±0.89	29.29 ±0.69	29.74 ±0.45	29.98 ±0.67
C18:0	12.33 ±0.17	12.38 ±0.22	12.69 ±0.09	12.48 ±0.24
C20:0	0.23 ±0.01	0.23 ±0.01	0.23 ±0.01	0.23 ±0.01
Σ saturated	44.74 ±0.90	44.09 ±0.59	44.83 ±0.42	44.88 ±0.63
C16:1 n-9	2.49 ±0.08	2.37 ±0.10	2.68 ±0.11	2.61 ±0.10
C18:1 n-9	19.60 ±0.85	19.78 ±0.73	18.62 ±0.38	18.50 ±0.29
C20:1 n-9	0.63 ±0.03	0.59 ±0.05	0.63 ±0.03	0.66 ±0.03
C20:3 n-9	0.33 ±0.03	0.30 ±0.03	0.36 ±0.03	0.33 ±0.02
C22:1 n-9	0.42 ^c ±0.06	1.01 ^a ±0.08	0.80 ^b ±0.07	0.69 ^b ±0.03
Σ n-9	23.47 ±0.74	24.06 ±0.57	23.09 ±0.32	22.78 ±0.34
C16:1 n-7	2.27 ±0.11	2.32 ±0.15	2.08 ±0.04	2.35 ±0.07
C18:1 n-7	3.10 ^a ±0.09	2.87 ^b ±0.08	2.82 ^b ±0.06	2.99 ^{ab} ±0.05
C20:1 n-7	0.24 ±0.03	0.21 ±0.04	0.30 ±0.05	0.22 ±0.03
Σ n-7	5.62 ±0.19	5.40 ±0.20	5.20 ±0.11	5.55 ±0.10
C18:2 n-6	4.89 ±0.22	5.42 ±0.22	4.97 ±0.11	5.00 ±0.16
C18:3 n-6	0.09 ±0.02	0.09 ±0.01	0.06 ±0.01	0.08 ±0.01
C20:3 n-6	0.58 ±0.06	0.64 ±0.05	0.63 ±0.03	0.73 ±0.08
C20:4 n-6	13.56 ^a ±0.37	12.51 ^b ±0.43	12.88 ^b ±0.31	12.79 ^b ±0.32
C22:4 n-6	2.89 ^a ±0.24	2.04 ^b ±0.15	2.27 ^b ±0.11	2.18 ^b ±0.07
C22:5 n-6	0.25 ^a ±0.03	0.12 ^b ±0.01	0.16 ^b ±0.02	0.12 ^b ±0.01
Σ n-6	22.25 ±1.13	20.83 ±0.60	20.99 ±0.41	20.90 ±0.41
C18:3 n-3	0.30 ±0.03	0.27 ±0.04	0.32 ±0.04	0.27 ±0.03
C20:5 n-3	0.39 ±0.04	0.37 ±0.04	0.40 ±0.03	0.36 ±0.02
C22:5 n-3	1.26 ^a ±0.13	2.70 ^b ±0.17	2.87 ^b ±0.15	1.64 ^a ±0.06
C22:6 n-3	1.97 ^a ±0.20	2.29 ^b ±0.13	2.31 ^b ±0.13	3.61 ^{1.83c} ±0.17
Σ n-3	3.93^b ±0.36	5.63^a ±0.28	5.89^a ±0.31	5.87^a ±0.21

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 4: Spleen total lipid fatty acid composition.

	Ctrl	EPA	DPA	DHA
C14:0	0.98 ±0.09	0.84 ±0.06	1.02 ±0.07	1.19 ±0.12
C16:0	25.58 ±0.37	25.32 ±0.39	25.36 ±0.32	25.99 ±0.22
C18:0	15.18 ±0.44	15.43 ±0.30	15.13 ±0.53	14.75 ±0.65
C20:0	0.12 ±0.01	0.16 ±0.04	0.13 ±0.02	0.15 ±0.04
Σ saturated	41.86 ±0.44	41.76 ±0.44	41.65 ±0.56	42.09 ±0.64
C16:1 n-9	0.37 ±0.02	0.42 ±0.03	0.41 ±0.02	0.37 ±0.01
C18:1 n-9	17.51 ±0.84	16.39 ±0.46	17.49 ±1.06	18.80 ±1.18
C20:1 n-9	0.79 ±0.06	1.08 ±0.13	0.92 ±0.09	0.95 ±0.19
C20:3 n-9	0.39 ±0.04	0.44 ±0.05	0.36 ±0.03	0.33 ±0.02
C22:1 n-9	0.10 ±0.01	0.12 ±0.01	0.16 ±0.04	0.26 ±0.12
Σ n-9	19.16 ±0.80	18.44 ±0.49	19.35 ±0.92	20.70 ±1.14
C16:1 n-7	1.55 ±0.15	1.43 ±0.15	1.71 ±0.17	1.92 ±0.20
C18:1 n-7	3.98 ±0.16	3.74 ±0.12	3.71 ±0.13	3.62 ±0.10
C20:1 n-7	0.14 ±0.01	0.20 ±0.02	0.16 ±0.01	0.17 ±0.03
Σ n-7	5.67 ±0.25	5.37 ±0.17	5.59 ±0.26	5.71 ±0.25
C18:2 n-6	6.39 ^a ±0.13	7.06 ^b ±0.17	7.01 ^b ±0.21	6.85 ^{ab} ±0.17
C20:2 n-6	0.33 ^a ±0.01	0.39 ^b ±0.02	0.35 ^{ab} ±0.02	0.31 ^a ±0.02
C20:3 n-6	0.90 ^a ±0.05	1.14 ^b ±0.06	1.04 ^{ab} ±0.06	0.96 ^b ±0.05
C20:4 n-6	19.74 ^a ±0.65	17.95 ^b ±0.27	17.40 ^b ±0.44	16.97 ^b ±0.78
C22:4 n-6	2.12 ^a ±0.08	1.60 ^b ±0.06	1.56 ^b ±0.08	1.33 ^c ±0.09
C22:5 n-6	0.24 ^a ±0.01	0.15 ^c ±0.01	0.19 ^b ±0.02	0.12 ^b ±0.01
Σ n-6	29.74^a ±0.70	28.28^{ab} ±0.43	27.55^b ±0.44	26.54^b ±0.82
C18:3 n-3	0.33 ±0.03	0.41 ±0.08	0.40 ±0.03	0.48 ±0.11
C20:5 n-3	0.19 ^a ±0.03	0.80 ^c ±0.08	0.60 ^b ±0.09	0.33 ^a ±0.02
C22:5 n-3	1.10 ^a ±0.06	2.56 ^b ±0.14	2.57 ^b ±0.20	1.15 ^a ±0.06
C22:6 n-3	1.95 ^a ±0.11	2.38 ^b ±0.13	2.29 ^b ±0.16	3.00 ^c ±0.15
Σ n-3	3.58^a ±0.18	6.15^c ±0.29	5.86^c ±0.38	4.96^b ±0.18

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 5: Kidney total lipid fatty acid composition.

	Ctrl	EPA	DPA	DHA
C14:0	1.03 ±0.12	1.06 ±0.09	1.02 ±0.12	0.85 ±0.09
C15:0	0.29 ±0.01	0.29 ±0.01	0.27 ±0.01	0.27 ±0.01
C16:0	24.55 ±0.46	24.29 ±0.45	24.36 ±0.32	24.22 ±0.31
C18:0	15.92 ±0.51	15.72 ±0.46	15.77 ±0.48	16.33 ±0.37
C20:0	0.06 ±0.01	0.07 ±0.01	0.05 ±0.00	0.06 ±0.00
Σ saturated	41.86 ±0.28	41.42 ±0.29	41.47 ±0.27	41.73 ±0.23
C16-1 n-9	0.43 ±0.03	0.45 ±0.03	0.41 ±0.03	0.46 ±0.03
C18-1 n-9	16.69 ±1.03	17.26 ±0.99	16.69 ±1.25	14.92 ±0.87
C20-1 n-9	0.14 ^a ±0.01	0.14 ^a ±0.01	0.12 ^a ±0.01	0.11 ^a ±0.01
C20:3 n-9	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.09 ±0.01	0.10 ±0.00
Σ n-9	17.35 ±1.04	17.95 ±0.98	17.31 ±1.24	15.58 ±0.88
C16-1 n-7	1.76 ±0.26	1.64 ±0.21	1.83 ±0.27	1.35 ±0.09
C18-1 n-7	3.43 ±0.12	3.15 ±0.11	3.30 ±0.14	3.23 ±0.08
Σ n-7	5.19 ±0.37	4.79 ±0.30	5.13 ±0.40	4.58 ±0.15
C18:2 n-6	9.29 ^a ±0.26	10.8 ^b ±0.33	10.54 ^b ±0.31	10.62 ^b ±0.13
C20:2 n-6	0.06 ±0.00	0.05 ±0.00	0.06 ±0.00	0.06 ±0.00
C20:3 n-6	0.57 ±0.04	0.64 ±0.04	0.62 ±0.05	0.66 ±0.03
C20-4 n-6	23.04 ±1.22	20.77 ±0.95	21.52 ±0.93	22.95 ±0.73
C22:4 n-6	0.40 ^a ±0.02	0.32 ^b ±0.02	0.30 ^b ±0.02	0.34 ^b ±0.02
Σ n-6	33.34 ±1.36	32.58 ±1.16	33.05 ±1.27	34.62 ±0.81
C18-3 n-3	0.30 ±0.03	0.32 ±0.02	0.28 ±0.03	0.29 ±0.03
C20-5 n-3	0.26 ^a ±0.02	0.80 ^c ±0.06	0.71 ^b ±0.07	0.70 ^b ±0.02
C22:5 n-3	0.20 ^a ±0.01	0.39 ^b ±0.02	0.38 ^b ±0.02	0.24 ^a ±0.01
C22-6 n-3	1.49 ^a ±0.07	1.75 ^b ±0.10	1.69 ^b ±0.07	2.25 ^c ±0.08
Σ n-3	2.26^a ±0.08	3.26^c ±0.16	3.04^b ±0.12	3.48^c ±0.09
mg AG/g tissu	7.21 ±1.20	7.71 ±1.45	8.12 ±1.56	8.35 ±1.36

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 6: Red blood cells total lipid fatty acid composition.

	Ctrl		EPA		DPA		DHA	
C14:0	0.82 ^a	±0.08	0.94 ^a	±0.15	1.48 ^b	±0.22	1.03 ^{ab}	±0.22
C16:0	22.40	±0.49	22.97	±0.59	22.73	±0.47	22.27	±0.49
C18:0	16.70	±0.45	17.28	±0.58	17.54	±0.59	16.35	±0.66
C20:0	0.37	±0.04	0.28	±0.06	0.34	±0.06	0.45	±0.14
Σ saturated	40.29	±0.65	41.47	±0.71	42.09	±0.97	40.09	±0.99
C16:1 n-9	0.71	±0.11	0.63	±0.10	0.81	±0.11	0.85	±0.19
C18:1 n-9	17.33	±0.97	16.19	±0.87	16.99	±0.69	16.31	±0.81
C20:1 n-9	0.54	±0.11	0.31	±0.05	0.34	±0.02	0.77	±0.30
C20:3 n-9	0.43	±0.08	0.32	±0.08	0.54	±0.21	0.67	±0.26
Σ n-9	19.02	±0.93	17.46	±0.85	18.67	±0.56	18.6	±0.79
C16:1 n-7	1.00	±0.09	0.83	±0.09	0.86	±0.09	1.18	±0.19
C18:1 n-7	2.64	±0.21	2.94	±0.32	2.67	±0.28	2.35	±0.10
Σ n-7	3.64	±0.26	3.77	±0.30	3.53	±0.31	3.53	±0.17
C18:2 n-6	8.22	±0.27	9.00	±0.57	7.90	±0.31	8.61	±0.89
C20:2 n-6	0.34	±0.09	0.33	±0.11	0.43	±0.16	0.75	±0.33
C20:3 n-6	0.43	±0.05	0.54	±0.06	0.48	±0.02	0.54	±0.06
C20:4 n-6	21.55	±0.76	18.73	±0.97	18.32	±1.03	19.21	±1.43
C22:4 n-6	0.67	±0.03	0.74	±0.10	0.66	±0.04	0.58	±0.07
C22:5 n-6	0.40	±0.05	0.29	±0.08	0.31	±0.03	0.32	±0.08
Σ n-6	31.6^a	±0.83	29.63^{ab}	±0.68	28.1^b	±1.03	30.02^{ab}	±1.40
C18:3 n-3	1.05 ^{ab}	±0.09	0.71 ^b	±0.12	1.36 ^{ab}	±0.26	1.62 ^a	±0.47
C20:5 n-3	0.46 ^a	±0.04	1.36 ^c	±0.16	1.03 ^{bc}	±0.18	0.80 ^{ab}	±0.06
C22:5 n-3	1.04 ^a	±0.05	1.61 ^b	±0.11	1.53 ^b	±0.06	0.94 ^a	±0.06
C22:6 n-3	2.90 ^a	±0.09	3.99 ^b	±0.41	3.68 ^b	±0.24	4.40 ^b	±0.29
Σ n-3	5.45^a	±0.17	7.67^b	±0.60	7.60^b	±0.45	7.75^b	±0.32

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 7: Brain total lipid fatty acid composition.

	Ctrl		EPA		DPA		DHA	
C14:0	0.23	±0.04	0.24	±0.02	0.22	±0.01	0.26	±0.04
C15:0	0.12	±0.01	0.13	±0.02	0.14	±0.03	0.10	±0.00
C16:0	20.74 ^a	±0.47	20.35 ^{ab}	±0.55	19.87 ^{ab}	±0.43	19.32 ^b	±0.29
C18:0	20.93	±0.26	20.68	±0.26	20.61	±0.26	20.42	±0.18
C20:0	0.27	±0.03	0.26	±0.02	0.26	±0.02	0.28	±0.02
C22:0	0.25	±0.02	0.29	±0.03	0.28	±0.02	0.32	±0.02
Σ saturated	42.55	±0.69	41.95	±0.72	41.38	±0.61	40.7	±0.45
C16:1 n-9	0.16	±0.02	0.17	±0.01	0.18	±0.01	0.19	±0.01
C18:1 n-9	17.93	±0.28	17.97	±0.22	18.11	±0.32	18.05	±0.34
C20:1 n-9	1.21	±0.06	1.25	±0.07	1.23	±0.06	1.35	±0.08
C20:3 n-9	0.10	±0.01	0.12	±0.01	0.11	±0.01	0.11	±0.00
Σ n-9	19.4	±0.27	19.52	±0.25	19.64	±0.29	19.7	±0.35
C16:1 n-7	0.46 ^a	±0.02	0.48 ^{ab}	±0.02	0.53 ^b	±0.02	0.49 ^{ab}	±0.01
C18:1 n-7	3.99 ^{ab}	±0.08	3.94 ^b	±0.04	4.03 ^{ab}	±0.03	4.14 ^a	±0.05
C20:1 n-7	0.37	±0.02	0.39	±0.02	0.39	±0.02	0.42	±0.02
C22:1 n-7	0.21	±0.07	0.15	±0.01	0.13	±0.01	0.15	±0.01
Σ n-7	5.03	±0.12	4.96	±0.09	5.09	±0.06	5.19	±0.08
C18:2 n-6	0.96	±0.11	1.07	±0.08	1.03	±0.12	1.02	±0.05
C20:2 n-6	0.20	±0.04	0.20	±0.04	0.24	±0.03	0.33	±0.07
C20:3 n-6	0.40	±0.03	0.48	±0.03	0.50	±0.03	0.49	±0.02
C20:4 n-6	11.45 ^{ab}	±0.24	11.23 ^a	±0.16	11.45 ^b	±0.17	11.34 ^b	±0.16
C22:4 n-6	3.41	±0.18	3.31	±0.12	3.49	±0.16	3.41	±0.09
C22:5 n-6	0.50 ^a	±0.04	0.41 ^b	±0.02	0.44 ^{ab}	±0.02	0.38 ^b	±0.02
C24:4 n-6	0.21	±0.02	0.21	±0.01	0.21	±0.02	0.21	±0.01
Σ n-6	17.14	±0.55	16.9	±0.38	17.35	±0.43	17.19	±0.32
C22:5 n-3	0.15 ^a	±0.01	0.24 ^c	±0.02	0.23 ^{bc}	±0.01	0.19 ^b	±0.01
C22:6 n-3	15.67 ^a	±0.34	16.39 ^{ab}	±0.29	16.27 ^{ab}	±0.31	16.97 ^b	±0.34
Σ n-3	15.88^a	±0.34	16.68^{ab}	±0.30	16.54^{ab}	±0.32	17.21^b	±0.34

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 8: Splenocytes total lipid fatty acid composition.

	Ctrl	EPA	DPA	DHA
C14:0	1.52 ±0.14	1.32 ±0.09	1.37 ±0.11	1.07 ±0.08
C16:0	28.77 ±0.54	27.75 ±0.47	27.69 ±0.55	27.02 ±0.51
C18:0	26.32 ±1.48	25.59 ±1.39	25.05 ±0.67	22.81 ±0.78
Σ saturated	56.61 ±2.03	54.67 ±1.64	54.11 ±1.21	50.90 ±1.19
C16:1 n-9	0.75 ±0.11	0.67 ±0.06	0.72 ±0.06	0.63 ±0.08
C18:1 n-9	17.25 ±1.90	15.23 ±0.55	16.75 ±0.73	16.31 ±0.67
Σ n-9	18.00 ±1.88	15.90 ±0.59	17.47 ±0.70	16.94 ±0.67
C16:1 n-7	1.21 ±0.25	0.95 ±0.09	1.20 ±0.15	1.25 ±0.19
C18:1 n-7	3.37 ±0.10	3.65 ±0.21	3.96 ±0.32	3.83 ±0.17
Σ n-7	4.58 ±0.29	4.59 ±0.22	5.16 ±0.45	5.07 ±0.29
C18:2 n-6	5.38 ±0.59	6.02 ±0.32	5.81 ±0.10	6.47 ±0.39
C20:2 n-6	0.69 ±0.16	0.50 ±0.04	0.46 ±0.03	0.53 ±0.03
C20:3 n-6	1.11 ±0.18	1.33 ±0.11	1.08 ±0.05	1.34 ±0.08
C20:4 n-6	10.34 ^a ±0.91	11.78 ^{ab} ±0.62	11.27 ^{ab} ±0.67	13.67 ^b ±0.87
C22:4 n-6	1.35 ±0.14	1.47 ±0.10	1.14 ±0.15	1.57 ±0.13
C22:5 n-6	0.29 ^{ab} ±0.04	0.24 ^a ±0.04	0.34 ^b ±0.07	0.19 ^a ±0.03
Σ n-6	19.16^a ±0.83	21.33^{ab} ±0.96	20.10^a ±0.87	23.77^b ±1.32
C20:5 n-3	0.31 ^a ±0.14	0.71 ^b ±0.15	0.50 ^{ab} ±0.12	0.35 ^{ab} ±0.03
C22:5 n-3	0.59 ^a ±0.05	1.55 ^c ±0.18	1.36 ^{bc} ±0.14	1.10 ^b ±0.11
C22:6 n-3	0.76 ^a ±0.08	1.24 ^b ±0.08	1.30 ^b ±0.16	1.88 ^c ±0.16
Σ n-3	1.65^a ±0.22	3.51^b ±0.35	3.16^b ±0.39	3.32^b ±0.23

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

Appendix D – Table 9: Peripheral blood mononucleated cells total lipid fatty acid composition.

	Ctrl	EPA	DPA	DHA
C14:0	1.12 ±0.08	1.34 ±0.08	1.58 ±0.22	1.40 ±0.12
C15:0	0.48 ±0.12	0.45 ±0.08	0.43 ±0.05	0.48 ±0.03
C16:0	30.02 ±0.48	31.03 ±0.49	31.76 ±1.38	31.43 ±0.89
C18:0	26.36 ±1.58	28.53 ±1.42	29.71 ±2.22	29.49 ±1.40
Σ saturated	57.99 ±1.85	61.34 ±1.82	63.48 ±3.79	62.81 ±2.35
C18-1 n-9	17.97 ±1.35	17.78 ±2.22	17.06 ±1.75	15.05 ±1.04
Σ n-9	17.97 ±1.35	17.78 ±2.22	17.06 ±1.75	15.05 ±1.04
C16-1 n-7	1.10 ^a ±0.15	0.83 ^{ab} ±0.16	0.88 ^{ab} ±0.12	0.60 ^b ±0.10
C18-1 n-7	2.21 ±0.11	1.98 ±0.08	1.69 ±0.34	1.97 ±0.16
Σ n-7	3.31 ±0.24	2.80 ±0.20	2.57 ±0.41	2.57 ±0.23
C18:2 n-6	6.69 ±0.97	5.48 ±0.55	4.77 ±0.68	5.40 ±0.51
C20:3 n-6	0.38 ±0.04	0.42 ±0.07	0.31 ±0.07	0.43 ±0.07
C20:4 n-6	10.56 ±0.56	8.84 ±1.17	8.55 ±0.99	10.39 ±1.15
C22:4 n-6	1.41 ^a ±0.11	1.00 ^b ±0.10	1.00 ^b ±0.11	1.26 ^{ab} ±0.13
C22:5 n-6	0.13 ±0.03	0.26 ±0.08	0.25 ±0.07	0.12 ±0.02
Σ n-6	19.18^a ±1.03	15.99^b ±1.32	14.87^b ±1.78	17.59^{ab} ±1.73
C18-3 n-3	0.49 ±0.07	0.41 ±0.05	0.40 ±0.11	0.48 ±0.03
C20-5 n-3	0.16 ^a ±0.03	0.43 ^b ±0.09	0.29 ^{ab} ±0.06	0.26 ^a ±0.03
C22:5 n-3	0.35 ^a ±0.03	0.66 ^b ±0.10	0.62 ^b ±0.10	0.44 ^{ab} ±0.05
C22-6 n-3	0.55 ^a ±0.03	0.66 ^{ab} ±0.09	0.71 ^{ab} ±0.07	0.80 ^b ±0.06
Σ n-3	1.55^a ±0.09	2.16^b ±0.25	2.02^b ±0.23	1.98^b ±0.13

For legend and statistical analysis, see the top of Appendix D - page 1.

ANNEXE IV-A:

Version éditée et Supplementary Material de l'article 03

**Incorporation of dairy lipids in the diet increased long-chain
Oméga-3 fatty acids status in post-weaning rats.**





Incorporation of Dairy Lipids in the Diet Increased Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Status in Post-weaning Rats

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Annaëlle Sinquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹ and Philippe Legrand^{1*}

¹ Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest - INRA USC1378, Rennes, France, ² Lactalis, R&D, Retiers, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Luigi Iuliano,
Sapienza Università di Roma, Italy

Reviewed by:

G. Hege Thoresen,
University of Oslo, Norway
Daniele Vergara,
University of Salento, Italy

*Correspondence:

Philippe Legrand
philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Lipidology,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

Received: 11 January 2018

Accepted: 30 April 2018

Published: 23 May 2018

Citation:

Drouin G, Catheline D, Sinquin A, Baudry C, Le Ruyet P, Rioux V and Legrand P (2018) Incorporation of Dairy Lipids in the Diet Increased Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Status in Post-weaning Rats. *Front. Nutr.* 5:42. doi: 10.3389/fnut.2018.00042

In human nutrition, optimized the status of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) and especially docosahexaenoic acid (DHA) during growth appears to be one of the most important goal. We investigated the potential impact of a partial incorporation of dairy lipids (DL) in the diet to increase the n-3 LCPUFA content in tissues, compared to a mixture of vegetable oils. Rats were fed with vegetable oil diet or DL diet, supplemented or not supplemented with DHA, from weaning for 6 weeks. All diets provided the same quantity of 2.3% of total fatty acids of precursor α -linolenic acid. LCPUFA levels in brain, retina, liver, heart, red blood cells and epididymal adipose tissue, Δ -6 desaturase activity and mRNA expression in liver, and plasma cholesterol were measured. Rats fed a DL diet increased their DHA content in brain and retina compared with rats fed a vegetable oil diet and reached the same level than rats directly supplemented with DHA. The status of n-3 docosapentaenoic acid increased with DL diet in heart, red blood cells and liver. The n-3 docosapentaenoic acid specifically discriminated DL diets in the heart. DL diet increased α -linolenic acid content in liver and epididymal adipose tissue, provided specific fatty acids as short- and medium-chain fatty acids and myristic acid, and increased plasma cholesterol. We hypothesized that dairy lipids may increase the n-3 LCPUFA enrichment in tissues by preserving precursor α -linolenic acid from β -mitochondrial oxidation, associated with the presence of short- and medium-chain fatty acids in DL diets. In conclusion, a partial incorporation of dairy lipids in the diet with an adequate α -linolenic acid content improved the n-3 LCPUFA status, especially DHA in brain and retina.

Keywords: dairy lipids, DHA, brain, DPA, infant formula, omega-3

INTRODUCTION

It is well known that n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) are essential fatty acids (FA) and required for humans throughout life (1–4). Inside the n-3 family, docosahexaenoic acid (DHA) is the most important n-3 LCPUFA in the tissues, especially in the brain and retina (5). Precisely in infants, it has been shown that DHA is essential for brain development and

functions (1, 3, 6), as the major component of neural membrane phospholipids (2), and promotes neuroplasticity (7) and learning (8). DHA is also necessary for a good visual development (9, 10) and could prevent cardiovascular diseases (11) and neurodegenerative disorders in adults (12).

The n-3 LCPUFA, as DHA, n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) and eicosapentaenoic acid (EPA) can be directly obtained from fish oils and seafood or provided by the conversion from their essential vegetal precursor α -linolenic acid (ALA) (1). The conversion from ALA occurs through a sequence of desaturations and elongations including two enzymes considered as limiting steps: the Δ -6 desaturase and the elongase-2 (13). ALA must also be provided by the diet (14), and the intake of ALA and others n-3 LCPUFA intakes are far lower than the dietary recommendations in Europe (15, 16). Therefore, the conversion rate from ALA to n-3 LCPUFA is not sufficient to provide DHA in adequate amounts in humans (17, 18), as well as in rodents (19). Moreover, several studies showed that DHA content in tissues does not respond linearly to dietary ALA intake (18) and that ALA supplementation results in an increase in EPA and n-3 DPA but not in DHA (20).

The maximal cerebral accumulation of DHA occurs during the first years of life (21). The intake of DHA is provided by breast milk in infants, which contains between 0.2 and 0.4% DHA (22), and which corresponds to the optimum for infant nutrition, as recommended by the WHO for the first 6 months of life. After this period, the milk supply continues, often from commercial infant formulas, whose lipid part is most often composed of a mixture of vegetable oils. More and more infant formulas are supplemented with DHA, as it will be mandatory in a few years in Europe (23). Nevertheless, the direct addition of preformed DHA may be difficult for economic and sustainability reasons, since sources of DHA are still limited (24, 25). For these reasons, it seems crucial to find the optimal nutritional conditions to increase ALA conversion pathway toward derivatives and to the incorporation of DHA in tissues and specifically in the brain and in the retina. The optimization of infant formulas is needed during the period of growth where brain DHA requirements are high.

Some studies showed that infants receiving formulas containing dairy lipids had an intermediate status in n-3 LCPUFA between breastfed infants and infants fed formulas containing a mixture of vegetable oils (26). Moreover, in rodents, the partial incorporation of dairy lipids in diets could improve conversion pathway from ALA to n-3 LCPUFA. However, these studies in rodents were often performed in specific conditions with a deficiency of ALA before the administration of the diet (27, 28), or with different quantities of ALA in diets (7). Dairy lipids also provide numerous species of specific lipids, including

cholesterol, and offer a composition closer to breastmilk than a blend of vegetable oils (29).

Providing a higher n-3 LCPUFA amount during growth is essential for optimal development. The purpose of this study was to evaluate the impact of a partial replacement of vegetable oils by dairy lipids, supplemented or not with DHA, on n-3 LCPUFA metabolism in different tissues. This experiment was performed in post-weaning rats fed the same amount of ALA and without any n-3 FA deficiency before the experimental diets. We also investigated the capacity of dairy lipids to provide diversified FA and cholesterol in comparison to vegetable oils.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Products

Solvents and chemicals were obtained from Thermo Scientific (Elancourt, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) or from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Butterfat and oleic sunflower oil were provided by Lactalis group (Retiers, France). High n-3 LCPUFA fish oil (Omegavie[®] DHA 80 EE Qualitysilver[®]) was graciously provided by Polaris (Quimper, France).

Ethyl Docosahexaenoate (DHA-EE) Purification

The DHA-EE > 99% was obtained from a high n-3 LCPUFA fish oil (Omegavie[®] DHA 80 EE Qualitysilver[®]). The purification was performed by liquid chromatography with a puriFlash[®] 4250 system (Interchim, Montluçon, France) with a Chromabond[®] flash column (RS 330 C₁₈ ec, porosity 45 μ m, diameter 60 mm, length 200 mm, Macherey Nagel, Hoerd, France) followed by a Puriflash flash column (PF-15C₁₈ HP-F0330, porosity 15 μ m, diameter 60 mm, length 226 mm, Interchim). An elution was performed at room temperature in an isocratic mode of methanol/water (95/5, v/v) with a constant flow of 120 mL/min. Each fraction of the first injection was collected every 30 s and was evaporated with a vacuum evaporator, then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). For the following injections, we pooled fractions which had DHA-EE > 97% purity in the first injection. This fraction was injected under the same conditions in a preparative Interchrom column (Uptisphere strategy C₁₈-HQ, porosity 5 μ m, diameter 50 mm, length 250 mm, Interchim) with an isocratic mode of methanol/water (98/2, v/v). All fractions corresponding to the DHA-EE peak has been collected and pooled to obtain DHA-EE >99% purity. DHA-EE possible peroxidation was controlled performing TBARS assay on DHA-EE oil at the beginning of the experimentation and on diets at the end of the experimentation (30, 31). Malondialdehyde (TBARS) was not detected in DHA-EE oil or in diets.

Diets

Four different lipid blends (**Table 1**) were prepared from a combination of commercially available natural oil sources (Leclerc, Rennes, France). Lipid blends were composed of a blend of vegetable oils (VO) or of a blend of 50% vegetable oils and 50%

Abbreviations: ALA, n-3 α -linolenic acid; DHA, n-3 docosahexaenoic acid; DL, blend of vegetable oils and dairy lipids; n-3 DPA, n-3 docosapentaenoic acid; EAT, epididymal adipose tissue; EPA, n-3 eicosapentaenoic acid; FA, fatty acid(s); Fads2, fatty acids desaturase 2 gene; HDL, high-density lipoprotein(s); LA, n-6 linoleic acid; LCPUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid(s); PCA, principal component analysis; RBC, red blood cells; RDA, redundancy analysis; SMCFA, short- and medium-chain fatty acids; VO, blend of vegetable oils.

TABLE 1 | Oil mixtures and fatty acid composition of the lipid blends composing the four experimental diets.

Diets	VO	VO + DHA	DL	DL + DHA
LIPID SOURCES COMPOSING THE LIPID BLENDS (g/100 g)				
Butterfat			50	50
Palm oil	35	35		
High oleic sunflower	42	42	22	22
Sunflower oil			7	7
Colza oil	23	23	21	21
DHA-EE ^a		0.5		0.5
FATTY ACID (FA) COMPOSITION OF THE LIPID BLENDS (%)				
Saturated FA	21.0	20.9	37.5	37.3
SMCFA ^b			4.8	4.8
Branched-chain FA ^c			0.9	0.9
C14:0	0.3	0.3	5.5	5.5
C16:0	17.2	17.1	17.1	17.0
C18:0	3.1	3.1	6.7	6.7
Odd FA			0.6	0.6
Monounsaturated FA	65.3	65.0	48.0	47.8
C16:1 n-7	0.1	0.1	0.9	0.9
C18:1 n-7	1.7	1.7	1.6	1.6
C18:1 n-9	63.3	63.0	43.1	42.9
Others	0.2	0.2	2.4	2.4
Polyunsaturated FA	13.7	14.1	14.5	14.9
C18:2 n-6 (LA)	11.3	11.2	11.5	11.4
C18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.3	2.3	2.3
C22:6 n-3 EE (DHA)		0.5		0.5
Others			0.7	0.7
LA/ALA ratio	5.3	5.0	5.0	5.0

All diets contained for 1 kg of diet: 100.0 g of fat (21% of total energy), 220.0 g of HCl-casein, 1.5 g of DL-methionine, 402.3 g of cornstarch, 201.2 g of sucrose, 20.0 g of cellulose, 45.0 g of mineral mix 102 and 10.0 g of vitamin mix 102.

^aEthyl esters purified by preparative liquid chromatography.

^bShort- and medium-chain fatty acids (C4:0 to C10:0).

^ciso-C16:0, iso- and ante-C17:0.

dairy lipids (DL) (w/w), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Dairy lipids provided from butterfat. Lipid blends were made with particular attention to ALA and linoleic acid (LA) levels, with a LA/ALA ratio around 5, as nutritionally recommended in humans in France (32). The FA composition of the lipid blends and the oils used in the semi-synthetic diets were designed according to the fatty acid compositions of European infant formulas commercially available. The specific FA present exclusively in dairy lipids, like short- and medium-chain fatty acids (SMCFA), branched-chained and odd FA, were compensated for oleic acid provided by high oleic sunflower oil (Table 1) (33, 34). FA composition of lipid blends was analyzed by GCMS after Folch extraction and derivation as described above in 2.5 (35). The FA composition of VO and DL diets were respectively the same in both experiments.

All the diets contained 10% (w/w, 21% of total energy) of lipid blend and 90% (w/w) of a lipid-free base. The lipid-free base was

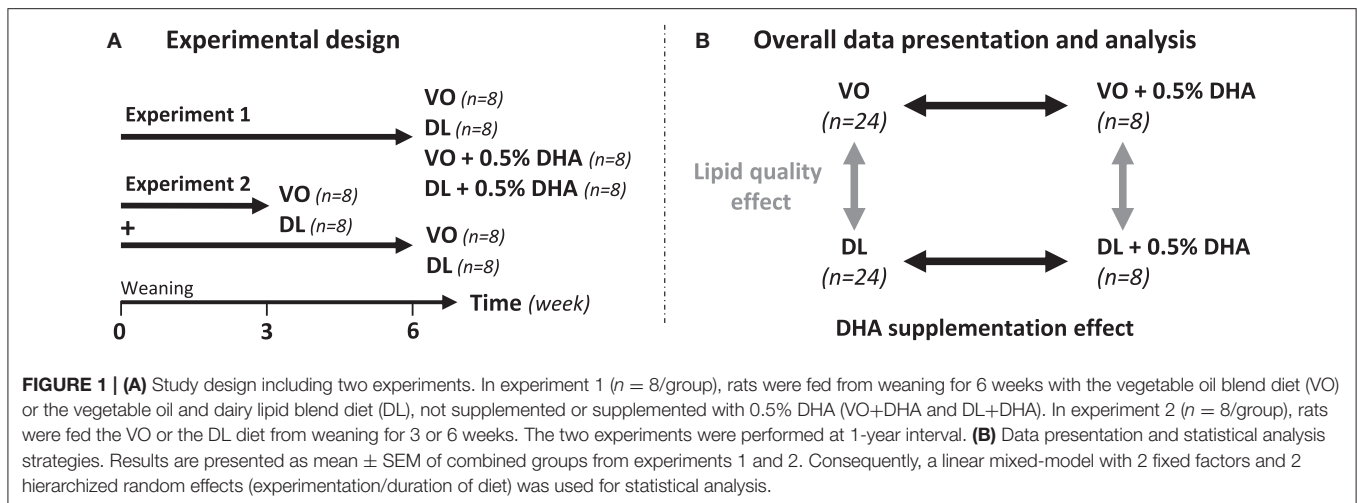
prepared at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). The lipid-free base contained: 220.0 g of HCl-casein, 1.5 g of DL-methionine, 402.3 g of cornstarch, 201.2 g of sucrose, 20.0 g of cellulose, 45.0 g of mineral mix 102 and 10.0 g of vitamin mix 102 for 1 kg of diet. Then, 100.0 g of fat/kg of diet of the lipid blend were added in our laboratory.

To prepare the rat foods, the lipid-free base and the lipid blend were mixed then sifted twice, 13% water was added (w/w) then the mixture was homogenized and shaped as croquettes. The rat foods were sealed in an airtight package and frozen at -20°C because they were prepared at the beginning of the study. During the experiments, rat foods were thawed at $+4^{\circ}\text{C}$ 24 h before being given to animals. Malondialdehyde concentration was measured in the diets to detect a potential peroxidation of DHA as described above in section Ethyl Docosahexaenoate (DHA-EE) Purification. Malondialdehyde was not detected in diets, neither at the beginning nor at the end of the study. The diets were isoenergetic and isolipidic. Total sterols were measured in DL and VL blends using the Liebermann in order to quantify the cholesterol intake of animals as described previously (36).

Animals

This study is composed of two experiments performed at 1-year interval (Figure 1A). In the experiment 1, 32 rats ($n = 8/\text{group}$) were fed VO or DL diets not supplemented, or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA) from weaning for 6 weeks. In the experiment 2, 32 rats ($n = 8/\text{group}$) were fed VO or DL diets, not supplemented with DHA from weaning for 3 or 6 weeks. After doing a power calculation based on the brain DHA content difference between the VO and DL groups of the experiment 1, the experiment 2 was realized in order to increase the number of individuals included in the VO and DL groups to increase the power of the study. For both experiments, Sprague Dawley rats (mean body weight 60 ± 1 g, 3 weeks old at the beginning of the experiment) were randomly assigned into the 4 groups and were housed 4 animals by cage on a 12 h light-dark cycle and maintained at $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with free access to water and food. Body weight, food and water intakes were measured 3 times a week.

At the end of the experiment, fasted rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodic pentobarbital (140 mg/kg of body weight) (Euthasol Vet, France). Blood samples were collected by cardiac punctures into heparin-treated vacutainers (Dominique Dutscher, Brumath, France) and plasma was separated from blood cells by centrifugation (3,000 g, 20 min, amb T°) and stored at -80°C . After removing the peripheral blood mononucleated cells layer, red blood cells (RBC) were mixed, weighed and stored at $+4^{\circ}\text{C}$ (37). Whole eyes were removed and stored in 4% formol-PBS at 4°C during 1 week before the dissection of the retina. Tissues were removed, washed with PBS, weighted and separated in two parts: around 200 mg of the left lobe of liver, left ventricle of heart and part of the brain from frontal cortex to striatum were stored at -20°C in 4 mL of dimethoxymethane/methanol (4:1, v/v); 50 mg of liver was homogenized with an Ultra-Turrax in RNA-extraction mixture



and stored at -80°C ; the rest of the organs were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (38, 39).

All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for Animal Care and Use (2003/35/CEE). The experimental procedures (n $^{\circ}$ APAFIS#1389-2015080411586889 v4 and n $^{\circ}$ APAFIS#5139-201605121200996 v1) were approved by the French Animal Care Committee (Rennes, approval number A3523838) and the Ministry of Higher Education and Research and Innovation, in compliance with recommendations of the 2013–118 directive for animal experimentation.

Lipid Extraction and Fatty Acid Composition

Lipids were extracted twice from tissues with 20 volumes dimethoxymethane: methanol (4:1, v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax (40, 41). RBC lipids membranes were extracted twice with hexane/isopropanol (3/2, v/v) after acidification with HCl 3M, as previously described (42). Brain phospholipids were separated from total lipids on preparative thin-layer chromatography (TLC) using silica gel H (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) plates impregnated with a mixture of hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/1, v/v/v). Total lipids and phospholipids were saponified by 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol at 70°C for 30 min and then methylated with 1 mL of BF_3 (14% in methanol) at 70°C for 30 min. Fatty acid methyl esters were extracted twice with pentane, washed twice with NaCl 0.9% and were taken up in hexane. Fatty acid methyl esters from brain phospholipids were purified by another step of TLC with a mixture of hexane/diethyl ether (80:20, v/v), extracted a first time by a mixture of methanol/hexane/NaCl 0.9% (3:4:3, v/v/v), then extracted a second time with 4 volumes of hexane and washed with NaCl 0.9% (43).

GCMS analysis was performed using an Agilent Technologies 7890A (Bios Analytic, Santa Clara, CA, RRID:SCR_015742) with a bonded silica capillary column (BPX 70, 60 m \times 0.25 mm; SGE, Melbourne, Australia) containing a polar stationary phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (0.25 μm film thickness).

Helium was used as carrier gas (average velocity 36 cm/s). The column temperature program started at 150°C and gradually increased at $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250°C , and held at 250°C for 10 min. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 5975C inert MSD with triple axis detector. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in the full scan mode with a mass range of m/z 50–550 atomic mass units (amu), using the MSD Chemstation software E.02.02.14.31 (RRID:SCR_015742). Identification of the FA methyl esters was based upon retention times obtained for a homemade pool of FA methyl ester commercial standards with a purity $>99\%$ (Sigma) when available. The National Institute of Standards and Technology database (version 2.0, RRID:SCR_006440) was also sometimes used to identify unknown FA. All identified FA with a signal/noise > 10 were considered in the analysis of the proportions, FA identified with a signal/noise between 3 and 10 were marked as a trace.

Biochemical Parameters of the Plasma

Total cholesterol (cholesterol CHOL, Randox Laboratories, Crumlin, UK, RRID:SCR_005525) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) (HDL-CHOL, Randox Laboratories) were assayed with commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions on heparinized plasma in triplicate. HDL cholesterol levels were measured after precipitation of apolipoprotein-B containing lipoproteins using phosphotungstic acid. Non-HDL cholesterol was calculated by the difference between total cholesterol and HDL-cholesterol.

Δ -6 Desaturase Activity Assay

The liver was homogenized in a phosphate buffer containing 0.25 M sucrose to recover the post-mitochondrial supernatant, as previously described (36).

Enzymatic activity was determined using a 1-mL assay mixture containing 100 μL of supernatant (100 μg proteins), 150

mmol/L phosphate buffer (pH 7.16), 6 mmol/L NADH, 6 mmol/L $MgCl_2$, 7.2 mmol/L ATP and 0.54 mmol/L CoA. The incubation was carried out in duplicate at 37°C for 20 min, after addition of 60 nmol of [$1-^{14}C$]-ALA (60 μ mol/L, 10 mCi/mmol, ARC, Saint Louis, MO, USA). The reactions were stopped by adding 1 mL of 2 M KOH in ethanol. After 30 min at 70°C, the FA were liberated by acidification, extracted with diethyl ether, converted to FA naphthacyl esters and separated on HPLC (Alliance 2695 integrated system, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as previously described (44). Peaks corresponding to radiolabeled FA substrate and product of each desaturase assay were collected and subjected to liquid scintillation counting (PerkinElmer 2810, Waltham, MA, USA). The enzyme activity was determined and expressed as pmol of substrate converted to product per min per mg of protein. Protein in the supernatant used for the desaturase assays was determined by Lowry method (45).

RNA Isolation and Real-Time qPCR

Total RNA were isolated from 50 mg of the liver with Nucleospin[®] RNA commercial kit (Machery Nagel) according to the manufacturer's instructions. RNA purity and concentration were verified by colorimetric A260/A280 ratio and A260/A230 ratio with a nano-spectrophotometer (DS11 spectrophotometer, DeNovix, Wilmington, DE, USA), all calculated ratio exceeded 2.0 and 2.2, respectively. Total RNA were retrotranscribed by using the High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, Fisher, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions.

Transcript of fatty acid desaturase 2 gene (*Fads2*) coding for the Δ -6 desaturase enzyme was quantified by Real-time qPCR in optical 96-well plates on a CFX 96 real-time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) with the TaqMan 2X Universal PCR MasterMix (Applied Biosystem) containing 50 ng of cDNA, 500 nM of each forward and reverse primers and 10 μ L of MasterMix. Primers and 5'-FAM/TAMRA-3' Taqman probes specific to *Fads2* gene (forward primer 5'-TCCACAAGGACCCCGACATA-3'; reverse primer 5'-TTGTAGGGCAGATATTTTCAGCTTCTT-3') and TaqMan probe (5'-FAM-TTGAGAGTGGCAGCCCTCGAGTA-TAMRA3') were designed (Eurogentec, Angers, France). Amplification was performed over 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The 18S expression was quantified as an endogenous control using the 18S RNA Control kit Yakima-Yellow Eclipse Dark Quencher (Eurogentec) and relative gene expression was determined from the threshold cycle (Ct) using the $\Delta\Delta$ Ct method (46).

Statistical Analysis

We combined the results of experiments 1 and 2 in order to present and analyze the data (Figure 1B). FA composition of tissues, plasma assays, and organs weight were statistically analyzed with a linear mixed-model with 2 fixed factors (lipid quality, DHA supplementation) and 2 hierarchized random effects (experimentation/duration of diet). The major aim was to compare the potential effect between lipid quality effect (VO and VO+DHA vs. DL and DL+DHA) and DHA supplementation

effect (VO and DL vs. VO+DHA and DL+DHA) on tissues FA composition. Consequently, the diet duration effect was included as a random effect, as no interaction was found between lipid quality effect and diet duration effect. Body weight and food consumption were analyzed with the same linear mixed-model for repeated measures. Multiple comparisons between groups were performed by Tukey-Kramer procedure adjusted with false discovery rate method (fdr). Prior to analysis, the model was assessed by verifying the normality of the model and the normality of the residuals graphically, homoscedasticity was supposed true. When normality of model was not validated, groups were compared by non-parametric ANOVA using Kruskal-Wallis test followed with Dunn's *post-hoc* test (PCR and enzymatic activity results). For all procedures, $p < 0.05$ was considered as significant. All data were reported as mean \pm SEM.

To identify fatty acid biomarkers across groups, multivariate analysis was used in this study on FA composition of rats fed for 6 weeks. First, principal component analysis (PCA) was performed to study the model overview. Secondly, redundancy analysis (RDA), a variant of partial least square analysis (PLS-DA), was used (47). RDA was performed to assess differences in FA metabolic profiles, considering as constraints the lipid quality effect, the DHA supplementation effect and the interaction between these two factors. The analysis was assessed separately for each tissue. As FA compositions were presented as the percentage of total detected FA, and that the FA proportion took place in a large range of values (0.10–56.74), the data were transformed by centering log-ratio (*clr*), then by centering-scaling (48). A permutation test was used to consider the significance of these three terms (49). This test was followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with fdr method to assess the significance of the 4 diets. FA explaining most of the variability between lipid quality effect (LQ, DL and DL+DHA vs. VO and VO+DHA) or DHA supplementation effect (S, VO and DL vs. VO+DHA and DL+DHA) were chosen by considering the test of Pearson correlation coefficient between FA data and individual scores, and a Pearson correlation coefficient $R^2 > 0.5$ (50). FA were discussed using the directions in the two-dimensional vector spaces which discriminate these effects (LQ and S), as previously described (27).

Statistical analysis were realized using R software v3.4.2 (RRID:SCR_001905) and R packages *nlme* v3.1.131 (RRID:SCR_015655), *RVAideMemoire* v0.9.68 (RRID:SCR_015657), *chemometrics* (v0.1) and *vegan* v2.4.4 (RRID:SCR_011950).

RESULTS

Body Weight and Food Intake

At the end of the experimentation, body weight gains and organ weights did not differ significantly between groups, except for brain weight which was higher in rats fed the diet partially enriched with dairy lipids (DL) in comparison to rats fed the vegetable oils blend diet (VO) (+11% *w/w*, $p < 0.01$) (see Supplementary Material 1, Table 1). Means of cumulated food,

water consumption, and organ weight did not differ amongst the groups (see Supplementary Material 1, Figure 1).

Dairy Lipids Differently Increased n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFA) in Tissues

The main objective of this study was to address the impact of DL diets on n-3 LCPUFA content in tissues, compared to VO diets in post-weaning rats fed the same amount of precursors α -linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA). Our study focused on six tissues: brain, retina, heart, liver, red blood cells (RBC) and epididymal adipose tissue (EAT). The complete fatty acids composition of tissues are presented in Supplementary Material 2, Tables 1–5.

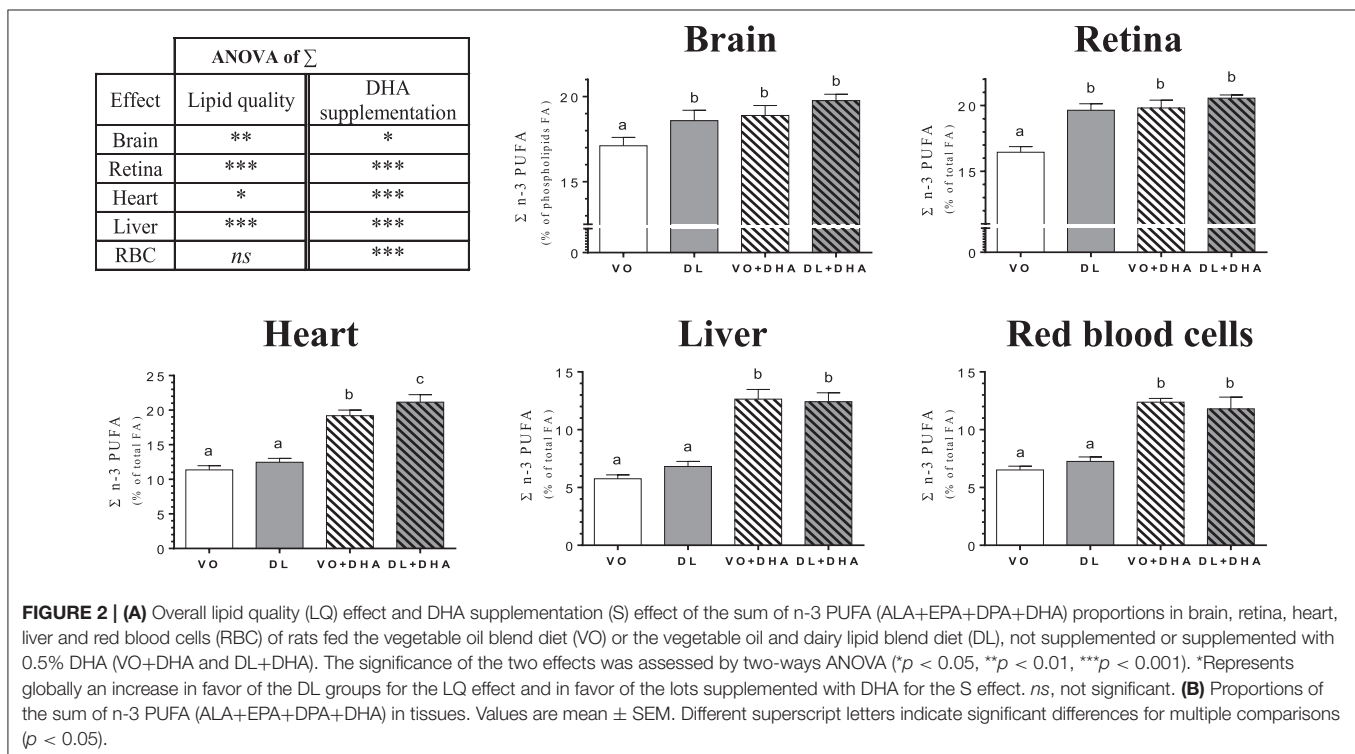
Concerning the overall lipid quality and DHA supplementation effects on total n-3 PUFA tissue contents as the sum of n-3 LCPUFA (EPA+n-3 DPA+DHA) and n-3 LCPUFA precursor (ALA) (Figure 2), rats fed DL diets had higher total n-3 PUFA contents in brain, retina, heart and liver but not in RBC (Figure 2A). The direct supplementation with DHA increased total n-3 PUFA content in all studied tissues. More precisely (Figure 2B), total n-3 PUFA content was higher in brain and retina in the DL group, in comparison to the VO group and this increase reached the same level than in both groups directly supplemented with DHA. In the heart, the total n-3 PUFA content was higher for the DL+DHA group than for the VO+DHA group.

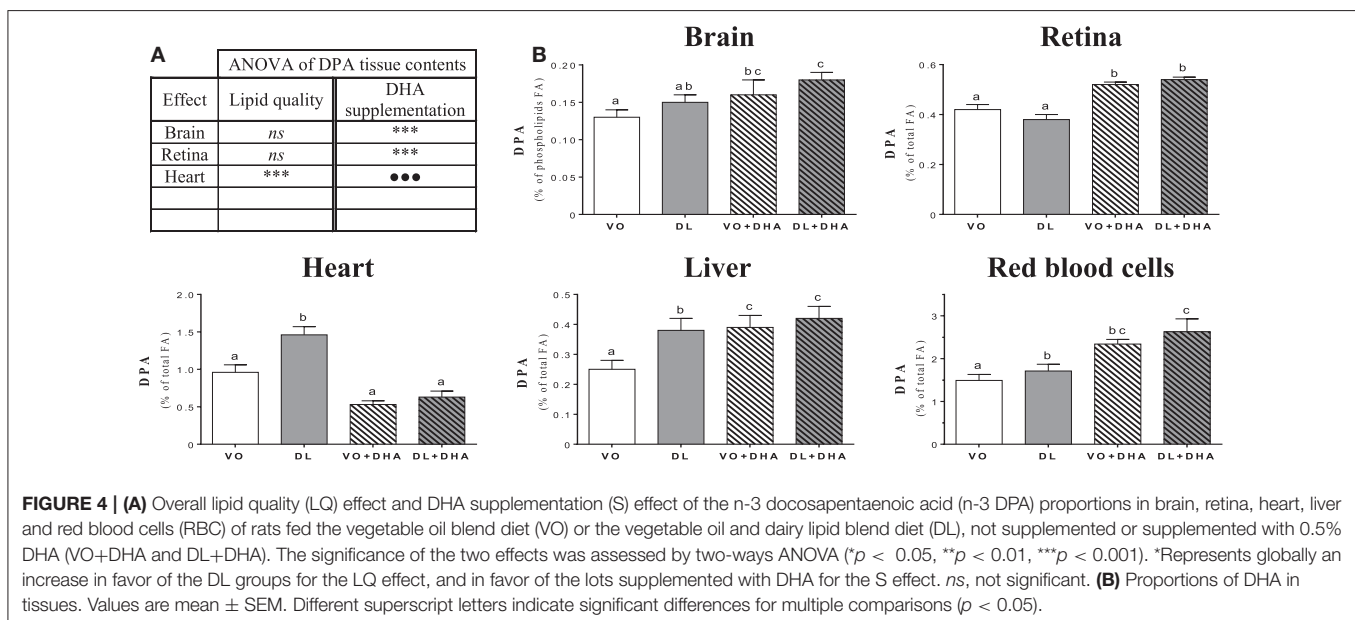
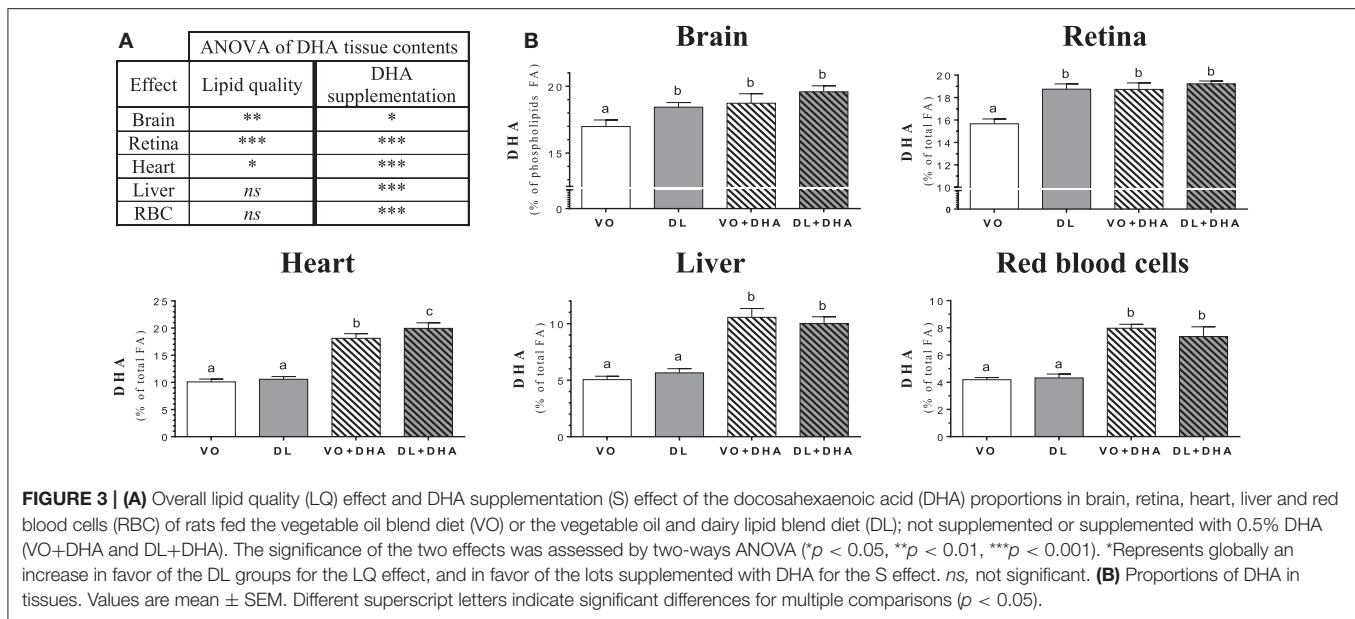
Concerning DHA tissue contents (Figure 3), if we first consider the overall effects (Figure 3A), rats fed DL diets had

higher DHA contents in brain, retina and heart but not in liver and RBC. The direct supplementation with DHA, increased DHA content in all studied tissues. More precisely (Figure 3B), the DHA content was similarly affected by the diets than the total n-3 LCPUFA status, as DHA was the major n-3 LCPUFA found in tissues. The DHA content was higher in brain and retina in the DL group, in comparison to the VO group and this increase reached the same DHA level than in both groups directly supplemented with DHA. In the heart, the total n-3 LCPUFA content was higher for the DL+DHA group than for the VO+DHA group.

Concerning n-3 DPA contents (Figure 4), if we first consider the overall effects (Figure 4A), rats fed DL diets had higher n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) contents in heart, liver and RBC but not in brain and retina conversely than found for DHA. Moreover, n-3 DPA content increased with DHA supplementation in all tissues except in the heart. More precisely (Figure 4B), the n-3 DPA content was higher in the heart, liver and RBC of DL-fed rats compared to the VO group but remained lower than in rats supplemented with DHA in liver and RBC. We underline a point of interest demonstrated by redundancy analysis approach: the n-3 DPA was the FA, which positively discriminated the most DL groups compared to VO groups (see Supplementary Material 3).

Concerning eicosapentaenoic acid (EPA), its content was also higher with DL diets in retina and liver compared to VO group but not in other tissues (see Supplementary Material 2, Tables 1–5). In the liver, the retroconversion of DHA toward EPA was estimated at 72.4% with no difference between DHA-supplemented groups.





By contrast with the interesting effect of DL diets on n-3 LCPUFA, no clear effect was observed on n-6 LCPUFA, except in retina where DL diets increased all n-6 polyunsaturated FA, except for the n-6 DPA (Table 2). The DHA supplementation decreased all the n-6 LCPUFA contents in all studied tissues.

Dairy Lipids Saved LCPUFA Precursors α -Linolenic Acid (ALA) and Linoleic Acid (LA)

We have also considered the effects of the different diets on the n-3 LCPUFA precursor ALA and n-6 LCPUFA precursor LA (Figure 5). First, if we consider the overall effects (Figure 5A),

we showed that DL diets increased both ALA and LA amounts in all studied tissues, except in brain and retina. Specifically, in the retina, DL diets decreased the LA proportion while increasing the ALA proportion. In the brain, only the proportion of LA was increased with DL diets, and ALA was not detected (Supplementary Material 2, Table 1). The DHA supplemented diets increased LA in the liver, RBC and EAT, and ALA in liver only.

If we compare now each group (Figure 5B), the ALA content was higher in the liver in rats fed DL compared to the VO group, reaching the same level than the VO+DHA group. Moreover, ALA levels were higher in the DL+DHA group than in other groups. We showed that the sum of ALA+LA was higher in

TABLE 2 | The n-6 polyunsaturated fatty acids composition in tissues of rats fed the four diets.

	Fatty acids (%)	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA	
						LQ	S
Brain	ARA	11.04 ^{ab} ± 0.31	11.87 ^b ± 0.30	9.84 ^a ± 0.40	10.38 ^{ab} ± 0.39	.	•
	AdA	3.04 ^a ± 0.17	3.04 ^a ± 0.16	1.76 ^b ± 0.09	1.85 ^b ± 0.10	.	•••
	n-6 DPA	0.54 ^a ± 0.06	0.50 ^a ± 0.05	0.14 ^b ± 0.02	0.14 ^b ± 0.02	.	•••
	∑ n-6	15.73 ^a ± 0.44	16.57 ^a ± 0.42	12.92 ^b ± 0.38	13.76 ^{ab} ± 0.40	.	••
Retina	ARA	7.72 ^a ± 0.27	9.09 ^b ± 0.13	7.58 ^a ± 0.14	7.71 ^a ± 0.11	***	•••
	AdA	1.31 ^a ± 0.04	1.61 ^b ± 0.10	0.97 ^c ± 0.04	1.04 ^c ± 0.05	**	•••
	n-6 DPA	0.28 ^a ± 0.02	0.30 ^a ± 0.01	tr	0.10 ^b ± 0.01	***	•••
	∑ n-6	12.36 ^{ab} ± 0.35	13.07 ^a ± 0.09	11.25 ^c ± 0.13	11.68 ^{bc} ± 0.20	*	•••
Heart	ARA	22.62 ^a ± 0.26	21.32 ^a ± 0.47	13.83 ^b ± 0.35	13.71 ^b ± 0.24	.	•••
	AdA	0.65 ^a ± 0.06	0.80 ^a ± 0.06	0.08 ^b ± 0.02	0.09 ^b ± 0.02	.	•••
	n-6 DPA	0.78 ^a ± 0.08	0.73 ^a ± 0.05	tr	tr	.	•••
	∑ n-6	37.18 ^a ± 0.29	37.58 ^b ± 0.51	27.91 ^c ± 0.53	28.40 ^c ± 0.45	*	•••
Liver	ARA	13.43 ^a ± 0.82	13.48 ^a ± 0.56	9.07 ^b ± 0.67	8.01 ^b ± 0.86	.	•••
	AdA	0.15 ^a ± 0.02	0.17 ^a ± 0.02	0.06 ^b ± 0.01	0.06 ^b ± 0.01	.	••
	n-6 DPA	0.15 ^a ± 0.02	0.16 ^a ± 0.02	0.02 ^b ± 0.01	0.01 ^b ± 0.01	.	•••
	∑ n-6	21.5 ± 1.05	23.23 ± 0.81	18.93 ± 0.92	19.14 ± 1.18	.	•
RBC	ARA	25.57 ^a ± 0.70	24.38 ^b ± 0.88	17.69 ^c ± 0.40	17.82 ^c ± 1.07	.	•••
	AdA	1.24 ^a ± 0.08	1.24 ^a ± 0.09	0.42 ^b ± 0.05	0.60 ^b ± 0.11	.	•••
	n-6 DPA	0.59 ^a ± 0.05	0.52 ^a ± 0.04	0.10 ^b ± 0.04	0.23 ^b ± 0.06	.	•••
	∑ n-6	34.39 ^a ± 0.71	34.14 ^a ± 0.71	26.63 ^b ± 0.39	27.73 ^b ± 0.86	.	•••

Total fatty acid proportions of linoleic acid (LA, C18:2 n-6), arachidonic acid (ARA, C20:4 n-6), adrenic acid (AdA, C22:4 n-6), n-6 docosapentaenoic acid (n-6 DPA, C22:5 n-6) and total n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids (∑ n-6), in tissues of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). For the brain, the fatty acid composition from phospholipids is presented. Values are mean ± SEM.

Indicates an increase and • a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) ($p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and • 0.1 < $p < 0.05$).

DL group compared to the VO group in liver, heart, and RBC, reaching the same level than VO+DHA group. In contrast, the retina was the only tissue where the sum ALA+LA decreased in DL group. DL+DHA group exhibited a higher sum of ALA+LA than other groups in the liver, RBC and EAT. For all groups in all tissues, LA contents and the sum ALA+LA showed the same effects.

Finally, in the liver, the Δ -6 desaturase specific activity as well as the FA desaturase 2 mRNA relative expression (*Fads2*) did not change whatever the groups (Supplementary Material 4, Figure 1).

Dairy Lipids Enriched Fatty Acid Composition of Tissues

DL diets contained 50% (w/w) of dairy lipids from butterfat, which provides specific FA absent in vegetable oils: 4.8% short- and medium-chain fatty acids (SMCFA) (C4:0 to C12:0), 5.5% of myristic acid (C14:0) and 2.1% of branched-chain FA (BFA), odd FA (C15:0) (Table 1).

The FA composition of the epididymal adipose tissue (EAT) was used as a marker of the long-term storage of FA provided by the diets (Table 3). As expected, the specific FA present in dairy lipids increased in DL and DL+DHA groups compared to VO and VO+DHA groups. More precisely, the content in C12:0 and C15:0 increased in EAT with DL diets. The content

in C10:0, C14:1 n-5, C16:0 iso, C17:0 iso, and C17:0 ante-iso were quantifiable in both DL groups and only detected as trace in VO and VO+DHA groups.

In addition, myristic acid was present in all diets but mainly in DL diets, so myristic acid was higher in EAT of DL groups compared to VO groups. A similar observation was made in the liver, as in EAT for myristic acid and C15:0 (see Supplementary Material 2, Table 3).

Dairy Lipids Increased Plasma Cholesterol

DL diets contained 6.6 mg of cholesterol/100 g of diet, whereas cholesterol was absent in VO diets. The DHA supplementation led to an overall decrease in total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol. However, no significant effect was found in total cholesterol/HDL cholesterol ratio (Table 4). Plasmatic total cholesterol and non-HDL cholesterol were higher only in DL group compared to the three other groups. The supplementation of DL diet with DHA maintained the total cholesterol amount at the same level than both VO and VO+DHA groups.

DISCUSSION

This study addressed the capacity of a partial incorporation of dairy lipids (DL) in diets to modulate the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) status in tissues,

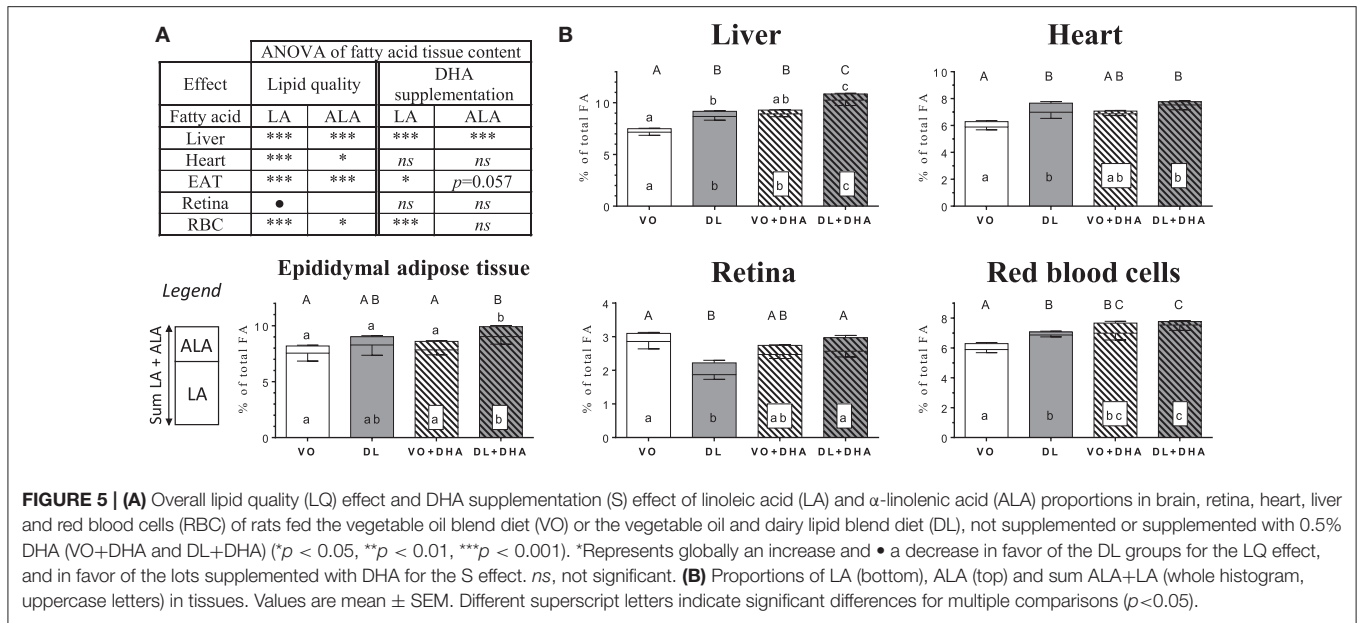


TABLE 3 | Total fatty acids composition of epididymal adipose tissue of rats fed the four diets.

Total fatty acids (%)	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA	
					LQ	S
C10:0	tr	0.20 ^b \pm 0.02	tr	0.22 ^b \pm 0.03	***	
C12:0	0.18 ^a \pm 0.06	0.61 ^b \pm 0.06	0.15 ^a \pm 0.04	0.68 ^b \pm 0.08	***	
C14:0	1.21 ^a \pm 0.13	3.53 ^b \pm 0.17	1.19 ^a \pm 0.13	3.70 ^b \pm 0.17	***	
C15:0	0.12 ^a \pm 0.02	0.39 ^b \pm 0.05	0.12 ^a \pm 0.01	0.41 ^b \pm 0.03	***	
C16:0	22.57 \pm 1.78	24.54 \pm 1.70	23.71 \pm 1.26	25.51 \pm 1.30	**	.
C18:0	1.79 ^a \pm 0.17	2.46 ^b \pm 0.29	2.28 ^b \pm 0.30	3.24 ^c \pm 0.26	***	***
Σ SFA	25.81 ^a \pm 2.00	31.35 ^b \pm 1.57	27.39 ^a \pm 1.58	33.35 ^b \pm 1.31	***	**
C16:1 n-9	0.50 ^{ab} \pm 0.06	0.51 ^b \pm 0.04	0.44 ^a \pm 0.04	0.44 ^a \pm 0.04		•••
C18:1 n-9	56.74 ^a \pm 2.38	46.93 ^b \pm 1.81	55.98 ^a \pm 1.66	46.47 ^b \pm 1.33	•••	•••
C20:1 n-9	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	.	.
Σ n-9	57.38 ^a \pm 2.37	47.56 ^b \pm 1.77	56.55 ^a \pm 1.66	47.02 ^b \pm 1.33	•••	•••
C16:1 n-7	4.17 ^a \pm 0.76	5.92 ^b \pm 1.10	3.78 ^a \pm 0.68	4.60 ^a \pm 0.64	***	••
C18:1 n-7	4.21 ^a \pm 0.57	4.98 ^b \pm 0.42	3.26 ^{ac} \pm 0.28	3.74 ^c \pm 0.31	***	•••
Σ n-7	8.38 ^a \pm 1.22	10.90 \pm 1.48	7.03 ^{ab} \pm 0.73	8.34 ^a \pm 0.87	***	•••
C18:2 n-6 (LA)	7.55 ^a \pm 0.71	8.29 ^{ab} \pm 0.92	7.85 ^a \pm 0.44	9.04 ^b \pm 0.68	***	*
C20:4 n-6 (ARA)	tr	tr	tr	tr		
Σ n-6	7.61 ^a \pm 0.74	8.33 ^{ab} \pm 0.93	7.88 ^a \pm 0.43	9.08 ^b \pm 0.69	***	.
C18:3 n-3 (ALA)	0.64 ^a \pm 0.07	0.74 ^a \pm 0.09	0.75 ^a \pm 0.07	0.88 ^b \pm 0.10	***	***
C22:6 n-3 (DHA)	tr	tr	0.21 ^b \pm 0.11	0.21 ^b \pm 0.10		***
Σ n-3	0.64 ^a \pm 0.07	0.75 ^a \pm 0.10	0.96 ^b \pm 0.14	1.09 ^b \pm 0.18	*	***
C14:1 n-5	tr	0.29 ^c \pm 0.03	tr	0.36 ^b \pm 0.02	***	.
C16:0 iso	tr	0.11 ^b \pm 0.01	tr	0.10 ^b \pm 0.02	***	
C17:0 iso	tr	0.14 ^b \pm 0.03	tr	0.13 ^b \pm 0.04	***	
C17:0 ante	tr	0.13 ^b \pm 0.02	tr	0.14 ^b \pm 0.02	***	
Σ others	tr	1.11 ^b \pm 0.07	tr	1.12 ^b \pm 0.08	***	

Rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Values are mean \pm SEM.

*Indicates an increase and • a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, .0.1 < *p* < 0.05).

TABLE 4 | Plasma concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol.

mg cholesterol/dL of plasma	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
Total	79.85 ± 4.1 ^a	94.56 ± 4.13 ^b	70.94 ± 2.20 ^{ac}	65.60 ± 3.43 ^c	*	***	*
HDL	52.80 ± 3.10 ^a	52.76 ± 3.00 ^a	44.87 ± 1.70 ^{ab}	37.90 ± 3.02 ^b	ns	***	ns
Non-HDL	27.06 ± 2.29 ^a	41.80 ± 2.81 ^b	26.07 ± 1.51 ^a	27.73 ± 1.59 ^a	***	●●	*
Total/HDL	1.54 ± 0.06 ^a	1.83 ± 0.07 ^c	1.59 ± 0.04 ^{ab}	1.77 ± 0.08 ^{bc}	***	ns	ns

Rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL), not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). Values are mean ± SEM.

Indicates an increase and ● a decrease in favor of the DL groups for the lipid quality effect (LQ) and in favor of the groups supplemented with DHA for the DHA supplementation effect (S) ($p < 0.05$, *** $p < 0.001$). ns: not significant.

comparatively to a vegetable oils blend based diet (VO). Both diets were not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (DL+DHA and VO+DHA).

The main finding of our study is that DL diet increased DHA levels in brain and retina at the same levels than DHA-supplemented diets. Moreover, both DL and DL+DHA diets increased also α -linolenic acid (ALA) amount in the liver and increased linoleic acid (LA) amount in all studied tissues. The effect observed here on DHA status is consistent with several studies, obtained in different specific conditions. Precisely, dairy lipids increased the brain DHA status compared to palm oil (27) in a model of ALA deficiency fed diets containing 1.5 or 2.3% ALA of total FA (w/w). Under equivalent conditions of ALA deficiency (28), the same authors confirmed that the amount of DHA in the brain increased in rats fed butter blend diet containing 2.3% ALA compared to 1.5%, but showed no additional increase of DHA with rats fed pure rapeseed diet containing 8.3% ALA. This latter consideration led us to choose the 2.3% ALA value for our present experimental diets. Another study recently showed that dairy lipid-enriched diet also increased DHA status in the brain of young and adult mice, beginning the diets on the first day of gestation until offspring's adulthood and with a different LA/ALA ratio than in our study (7). Finally, the increase of brain DHA status presented here is significant but smaller than in other studies, and was observed in brain phospholipids (not in brain total FA, data not shown). There was no deficiency before the experiment under our conditions, all rats were fed experimental diets from weaning with the same proportion of 2.3% ALA in diets. Then, both lipid bases of the diets had the same LA/ALA ratio of 5, closed to recommendations in humans (32), to overcome the known effects of the LA/ALA ratio on the LCPUFA metabolism (28, 42, 51, 52).

A first mechanistic hypothesis to explain the increase of DHA in brain and retina is that the DL diet could act on the n-3 LCPUFA conversion pathway. Indeed, it has been reported that the expression of *Elovl2* and *Fads2* genes, coding, respectively, for the elongase-2 and the Δ -6 desaturase enzymes, were increased with high butter blend diets in ALA (2.3%) compared to vegetable oils blend diets, lower in ALA (1.3%) (27). In our study, no effect of the diet was found on the Δ -6 desaturase activity and expression, with the limitation of measurements performed at the

fasting state. This result is not surprising as we used conditions where the conversion pathway was highly activated. Moreover, another possibility to explain the increase of n-3 LCPUFA with DL diets is the specific presence of myristic acid (C14:0) in DL diet. It has been reported that this FA increased dose-dependently and specifically the activity of Δ -6 and Δ -5 desaturases in primary rat hepatocytes (53). And we previously demonstrated in our laboratory that C14:0 can improve the n-3 LCPUFA content (36, 54, 55). In another way, the Δ -6 desaturase has a better affinity for ALA than for LA (56), and could also explain that only n-3 LCPUFA and not n-6 LCPUFA increased in our study. However, it has been shown that the content of LCPUFA in tissue is less influenced by the regulation of the desaturase and elongase genes, than by the substrate level (51).

A second possibility to explain the increase in the n-3 LCPUFA content is the presence of saturated FA in DL diets, and especially short- and medium-chain FA (SMCFA, ≤ 12 carbons). The high mitochondrial β -oxidation of SMCFA could partially spare ALA and LA from β -oxidation and could orient ALA toward the n-3 LCPUFA conversion pathway instead of the β -oxidation pathway (2, 57). Indeed, as the oxidation of FA is well correlated with the number of carbon and the number of double bonds (58), ALA and LA are also good substrates for the β -oxidation, as well as oleic acid (59), and the oxidation rate of FA is reported as follows: SMCFA \gg ALA $>$ oleic acid $>$ LA (60). Consequently, in our study, the consumption of SMCFA with DL diets could prevent part of the β -oxidation of LCPUFA precursors ALA and LA (61).

A third hypothesis to partly explain the increase in n-3 LCPUFA in tissues with DL diets is the lower level of oleic acid in DL diets than in VO diets. Indeed, oleic acid is also a substrate of Δ -6 desaturase and could compete with ALA and LA. In our study, oleic acid was higher in VO diets. However, the possible competition of oleic acid for the Δ -6 desaturase appears unlikely, since no lower content of n-6 LCPUFA was observed with VO diets (62).

The second major finding of our study is that n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) levels increased in heart, liver, and RBC with DL diet, by contrast with brain and retina where DHA status increased. The n-3 DPA is one intermediate compound in the n-3 LCPUFA conversion pathway. Compared to EPA, n-3 DPA is downstream in the n-3 LCPUFA conversion pathway, so it could be a better precursor of DHA

in tissues. In the present study, brain n-3 DPA content appears to remain relatively stable within the different diets. Moreover, only direct DHA supplementation resulted in a significant slight increase in n-3 DPA in the brain, possibly originating from the retroconversion of DHA to EPA, which is quickly converted into n-3 DPA or released from the brain into the bloodstream. Some authors hypothesized that n-3 DPA present in RBC could be a good predictor for brain DHA, showing a correlation ($R^2 = 0.478$) between the n-3 DPA present in the RBC and the brain DHA (27). We found a similar correlation in the present study ($R^2 = 0.464$) by using data from VO and DL groups in the model (data not shown), but this predictor hypothesis remains unclear in the absence of metabolic plausibility. Finally, the mechanisms of transport, use and conversion, specific to n-3 DPA are still poorly known and require further research, even if some studies report that n-3 DPA may react more like DHA than EPA for these aspects (2, 63).

The metabolism of n-3 DPA is poorly studied yet, due to its lack of commercial availability at high level of purity to realize *in vivo* studies. However, recent *in vitro* and *in vivo* studies showed that n-3 DPA could have some specific physiological effect, and particularly to prevent cardiovascular diseases by decreasing cholesterol, triglycerides synthesis and inflammation (2, 11, 63–65). Interestingly, our results showed that for both DL diets, n-3 DPA is the most discriminated FA in the heart. The potential synergic effect of n-3 DPA combined with DL on cardiovascular prevention may be investigated in future studies. Moreover, some recent cohort studies suggest that n-3 DPA could be the more potent n-3 LCPUFA to prevent some pathologies like metabolic syndrome, depression or lung dysfunction (4, 66, 67). For further *in vivo* studies, we need to obtain highly purified n-3 DPA, as already proposed by some laboratories (68).

Concerning cholesterol, some studies showed that dairy lipid-enriched diets could affect the amount of cholesterol in some tissues (69, 70). As a result, we showed in this study that plasma cholesterol increased only with DL group, and this is interesting as cholesterol is important during growth and was not provided by VO diets. Moreover, our results showed interestingly that plasma cholesterol was maintained at similar levels as the VO non-supplemented diet when DL diet was supplemented with DHA, while it was not significantly decreased when the VO diet was supplemented with DHA. Moreover, plasma cholesterol decreased with DL+DHA group compared to DL group, and at the same level than VO+DHA group. This observation is important because infant formula including DHA will be mandatory in a few years in Europe (23).

REFERENCES

- Brenna JT, Carlson SE. Docosahexaenoic acid and human brain development: evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *J Hum Evol.* (2014) 77:99–106. doi: 10.1016/j.jhevol.2014.02.017
- Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci.* (2015) 7: 52. doi: 10.3389/fnagi.2015.00052
- Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2005) 45:205–9. doi: 10.1080/10408690590956378
- Guo X, Li X, Shi M, Li D. n-3 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome risk: a meta-analysis. *Nutrients* (2017) 9:703. doi: 10.3390/nu9070703
- Calder PC. Docosahexaenoic acid. *Ann Nutr Metab.* (2016) 69:8–21. doi: 10.1159/000448262

Obviously, the comparison between rats and humans remains a question and a limit of the putative extrapolation of the results of the present study (71). However, in the present work, we could compare the age of our male rats fed from weaning to 9 weeks of age with an interval of 6 months to 14 years old in humans (72), a period where the consumption of dairy products occurs.

In conclusion, our results showed that n-3 LCPUFA content was positively influenced by dairy lipids and differently according to the tissues. DL diet increased DHA in brain and retina at the same levels than groups supplemented with DHA; and increased n-3 DPA in heart, RBC and liver. This accretion of n-3 LCPUFA suggests interesting roles of specific FA or other components of dairy lipids.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Under the supervision of PL and DC, GD completed these studies as part of his Ph.D. thesis. GD, PL, CB, PLR, DC, and VR contributed to the conception and design of the project. GD, AS, and DC performed experimentation. GD conducted the literature search, the acquisition and analysis of data, and wrote the first version of the manuscript. PL, VR, DC, CB, and PLR contributed to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final work.

FUNDING

This work received financial support from Lactalis Group (France).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Océane Sence and Coline Devillechabrolle for their technical assistance. The authors are indebted to Xavier Blanc (UPAE, INRA Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the lipid-free base necessary for the realization of the diets. We are grateful to Maxime Hervé for his assistance in the multivariate statistical analysis. We would also like to thank Josephine Aronica for proofreading the English editing and academic writing of the paper.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2018.00042/full#supplementary-material>

6. Innis S. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr.* (2007) **137**:855–9. doi: 10.1093/jn/137.4.855
7. Dinel AL, Rey C, Bonhomme C, Le Ruyet P, Joffre C, Layé S. Dairy fat blend improves brain DHA and neuroplasticity and regulates corticosterone in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2016) **109**:29–38. doi: 10.1016/j.plefa.2016.03.013
8. Kuratko CN, Barrett EC, Nelson EB, Salem N Jr. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: a review. *Nutrients* (2013) **5**:2777–810. doi: 10.3390/nu5072777
9. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* (2001) **36**:885–95. doi: 10.1007/s11745-001-0798-1
10. Qawsmi A, Landeros-Weisenberger A, Bloch MH. Meta-analysis of LCPUFA supplementation of infant formula and visual acuity. *Pediatrics* (2013) **131**:e262–72. doi: 10.1542/peds.2012-0517
11. Guo X, Sinclair AJ, Kaur G, Li D. Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2017). doi: 10.1016/j.plefa.2017.09.011. [Epub ahead of print].
12. Zhang W, Li P, Hu X, Zhang F, Chen J, Gao Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci.* (2011) **17**:2653–70. doi: 10.2741/3878
13. Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ. Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. *PLoS ONE* (2011) **6**:e29662. doi: 10.1371/journal.pone.0029662
14. Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SE, Rawlings RR. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr.* (2011) **93**:950–62. doi: 10.3945/ajcn.110.006643
15. Legrand P, Morise A, Kalonji E. Update of French nutritional recommendations for fatty acids. *World Rev Nutr Diet* (2011) **102**:137–43. doi: 10.1159/000327800
16. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2000) **63**:119–21. doi: 10.1054/plef.2000.0176
17. Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* (2005) **45**:17. doi: 10.1051/rnd:2005047
18. Brenna JT, Salem N Jr, Sinclair AJ, Cunnane SC. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2009) **80**:85–91. doi: 10.1016/j.plefa.2009.01.004
19. Morise A, Combe N, Boué C, Legrand P, Catheline D, Delplanque B, et al. Dose effect of α -linolenic acid on PUFA conversion, bioavailability, and storage in the hamster. *Lipids* (2004) **39**:325–34. doi: 10.1007/s11745-004-1236-0
20. Gibson RA, Neumann MA, Lien EL, Boyd KA, Tu WC. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2013) **88**:139–46. doi: 10.1016/j.plefa.2012.04.003
21. Gibson RA, Muhlhauser B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr.* (2011) **7**:17–26. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x
22. Guesnet P, Alessandri J-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – implications for dietary recommendations. *Biochimie* (2011) **93**:7–12. doi: 10.1016/j.biochi.2010.05.005
23. European Commission. Commission delegated regulation (EU) 2016/127. *Off J Eur Union* (2016) **L25**:1–29. Available online at: http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/L_285/L_28520031101en00330037.pdf
24. Jenkins DJA, Sievenpiper JL, Pauly D, Sumaila UR, Kendall CWC, Mowat FM. Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? *CMAJ* (2009) **180**:633–7. doi: 10.1503/cmaj.081274
25. Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol.* (2009) **6**:753–8. doi: 10.1038/nrcardio.2009.188
26. Courage ML, McCloy UR, Herzberg GR, Andrews WL, Simmons BS, McDonald AC, et al. Visual acuity development and fatty acid composition of erythrocytes in full-term infants fed breast milk, commercial formula, or evaporated milk. *J Dev Behav Pediatr.* (1998) **19**:9–17. doi: 10.1097/00004703-199802000-00002
27. Du Q, Martin J-C, Agnani G, Pages N, Leruyet P, Carayon P, et al. Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats. *J Nutr Biochem.* (2012) **23**:1573–82. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.10.011
28. Delplanque B, Du Q, Agnani G, Le Ruyet P, Martin JCC. A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2013) **88**:115–20. doi: 10.1016/j.plefa.2012.07.004
29. Delplanque B. Lipides et cerveau. *Oléagineux Corps gras Lipides* (2007) **14**:146–7. doi: 10.1051/ocl.2007.9999
30. Albert BB, Cameron-Smith D, Hofman PL, Cutfield WS. Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *Biomed Res Int.* (2013) **2013**:464921. doi: 10.1155/2013/464921
31. Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromatogr.* (2015) **29**:41–6. doi: 10.1002/bmc.3361
32. ANSES. *Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras.* (2011). Available online at: <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>
33. Trautwein EA, Rieckhoff D, Kunath-Rau A, Erbersdobler HF. Replacing saturated fat with PUFA-rich (Sunflower Oil) or MUFA-rich (rapeseed, olive and high-oleic sunflower oil) fats resulted in comparable hypocholesterolemic effects in cholesterol-fed hamsters. *Ann Nutr Metab.* (1999) **43**:159–72. doi: 10.1159/000012782
34. Truswell AS, Choudhury N. Monounsaturated oils do not all have the same effect on plasma cholesterol. *Eur J Clin Nutr.* (1998) **52**:312–5. doi: 10.1038/sj.ejcn.1600566
35. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* (1957) **226**:497–509.
36. Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev.* (2005) **45**:599–612. doi: 10.1051/rnd:2005048
37. Metherel AH, Henao JJA, Stark KD. EPA and DHA levels in whole blood decrease more rapidly when stored at -20°C as compared with room temperature, 4 and -75°C . *Lipids* (2013) **48**:1079–91. doi: 10.1007/s11745-013-3827-x
38. Ametaj BN, Bobe G, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J Agric Food Chem.* (2003) **51**:2105–10. doi: 10.1021/jf0259011
39. Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H, Bourre JM. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res.* (2000) **41**:465–72.
40. Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavalie M, et al. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem.* (2010) **21**:180–7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.10.008
41. Delsal JL. New method of extraction of serum lipids by methylal. Application to micro-estimation of total cholesterol, phospho-aminolipins and proteins. *Bull Soc Chim Biol.* (1944) **26**:99–105.
42. Ezanno H, Beauchamp E, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: a small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver. *Eur J Lipid Sci Technol.* (2015) **117**:281–90. doi: 10.1002/ejlt.201400304
43. Wolff RL, Bayard CC, Fabien RJ. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters. *J Am Oil Chem Soc.* (1995) **72**:1471–83. doi: 10.1007/BF02577840

44. Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. High performance liquid chromatography of fatty acids as naphthacyl derivatives. *Analisis* (1999) 27:186–93. doi: 10.1051/analisis:1999165
45. Randall RJ, Lewis A. The folin by oliver. *Readings* (1951) 193:265–75.
46. Blanchard H, Pédrone F, Boulter-Monthéan N, Catheline D, Rioux V, Legrand P. Comparative effects of well-balanced diets enriched in α -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2013) 88:383–9. doi: 10.1016/j.plefa.2013.03.006
47. Kalivodová A, Hron K, Filzmoser P, Najdekr L, Janečková H, Adam T. PLS-DA for compositional data with application to metabolomics. *J Chemom.* (2015) 29:21–8. doi: 10.1002/cem.2657
48. van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* (2006) 7:142. doi: 10.1186/1471-2164-7-142
49. Legendre P, Legendre L. Numerical ecology. *J Chem Inf Model.* (1998) 53:1689–99.
50. Huang W, Zwimpfer E, Hervé MR, Bont Z, Erb M. Neighbourhood effects determine plant-herbivore interactions below-ground. *J Ecol.* (2017) 106:347–56. doi: 10.1111/1365-2745.12805
51. Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2010) 83:61–8. doi: 10.1016/j.plefa.2010.04.001
52. Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1213:277–88. doi: 10.1016/0005-2760(94)00054-9
53. Jan S, Guillou H, D'Andrea S, Daval S, Bouriel M, Rioux V, Legrand P. Myristic acid increases $\Delta 6$ -desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Reprod Nutr Dev.* (2004) 44:131–40. doi: 10.1051/rnd:2004020
54. Rioux V, Catheline D, Beauchamp E, Le Bloc'h J, Pédrone F, et al. Substitution of dietary oleic acid for myristic acid increases the tissue storage of α -linolenic acid and the concentration of docosahexaenoic acid in the brain, red blood cells and plasma in the rat. *Anim Anim Consort.* (2008) 2:636–44. doi: 10.1017/S1751731108001705
55. Legrand P, Beauchamp E, Catheline D, Pédrone F, Rioux V. Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue pufa content in the rat. *Lipids* (2010) 45:975–86. doi: 10.1007/s11745-010-3481-5
56. Horrobin DF. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am J Clin Nutr* (1993) 57:736S–737S.
57. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* (2013) 54:2325–40. doi: 10.1194/jlr.R036012
58. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* (2000) 72:905–11. doi: 10.1093/ajcn/72.4.905
59. Jones PJH. Dietary linoleic, α -linolenic and oleic acids are oxidized at similar rates in rats fed a diet containing these acids in equal proportions. *Lipids* (1994) 29:491–5. doi: 10.1007/BF02578246
60. Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids *in vivo* in the rat. *Br J Nutr.* (1987) 57:383–93. doi: 10.1079/BJN19870046
61. Rolland V, Roseau S, Fromentin G, Nicolaidis S, Tomé D, Even PC. Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter. *Am J Clin Nutr.* (2002) 75:21–30. doi: 10.1093/ajcn/75.1.21
62. Park HG, Engel MG, Vogt-Lowell K, Lawrence P, Kothapalli KS, Brenna JT. The Role of fatty acid desaturase (FADS) genes in oleic acid metabolism: FADS1 $\Delta 7$ desaturates 11–20:1 to 7,11–20:2. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* (2017) 128:21–5. doi: 10.1016/j.plefa.2017.11.004
63. Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol.* (2015) 27:79–82. doi: 10.1002/lite.201500013
64. Kaur G, Guo X-F, Sinclair AJ. Short update on docosapentaenoic acid: a bioactive long-chain n-3 fatty acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2016) 19:88–91. doi: 10.1097/MCO.0000000000000252
65. Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects. *Prog Lipid Res.* (2011) 50:28–34. doi: 10.1016/j.plipres.2010.07.004
66. Matsuoka YJ, Sawada N, Mimura M, Shikimoto R, Nozaki S, Hamazaki K, et al. Dietary fish, n-3 polyunsaturated fatty acid consumption, and depression risk in Japan: a population-based prospective cohort study. *Transl Psychiatry* (2017) 7:e1242. doi: 10.1038/tp.2017.206
67. Leng S, Picchi MA, Wu G, Gauderman WJ, Xu F, Gilliland FD et al. Dietary nutrients associated with preservation of lung function in Hispanic and non-Hispanic white smokers from New Mexico. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* (2017) 12:3171–81. doi: 10.2147/COPD.S142237
68. Mu H, Jin J, Xie D, Zou X, Wang X, Wang X, et al. Combined urea complexation and argentated silica gel column chromatography for concentration and separation of PUFAs from tuna oil: based on improved DPA level. *J Am Oil Chem Soc.* (2016) 93:1157–67. doi: 10.1007/s11746-016-2842-5
69. Edmond J, Korsak RA, Morrow JW, Torok-Both G, Catlin DONH. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *J Nutr.* (1991) 121:1323–30. doi: 10.1093/jn/121.9.1323
70. Innis SM, Hamilton JJ. Effects of developmental changes and early nutrition on cholesterol metabolism in infancy: a review. *J Am Coll Nutr.* (1992) 11:63S–8S. doi: 10.1080/07315724.1992.10737987
71. Innis SM. Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements. *Am J Clin Nutr.* (2000) 71:238S–44S. doi: 10.1093/ajcn/71.1.238S
72. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med.* (2013) 4:624–30. Available online at: <http://ijpm.mui.ac.ir/index.php/ijpm/article/view/1012>

Conflict of Interest Statement: CB and PLR are employed by Lactalis group. GD, DC, AS, VR and PL received financial support from Lactalis group.

Copyright © 2018 Drouin, Catheline, Sinquin, Baudry, Le Ruyet, Rioux and Legrand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material 1

Dairy lipids enriched diet increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Anaëlle Sinquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

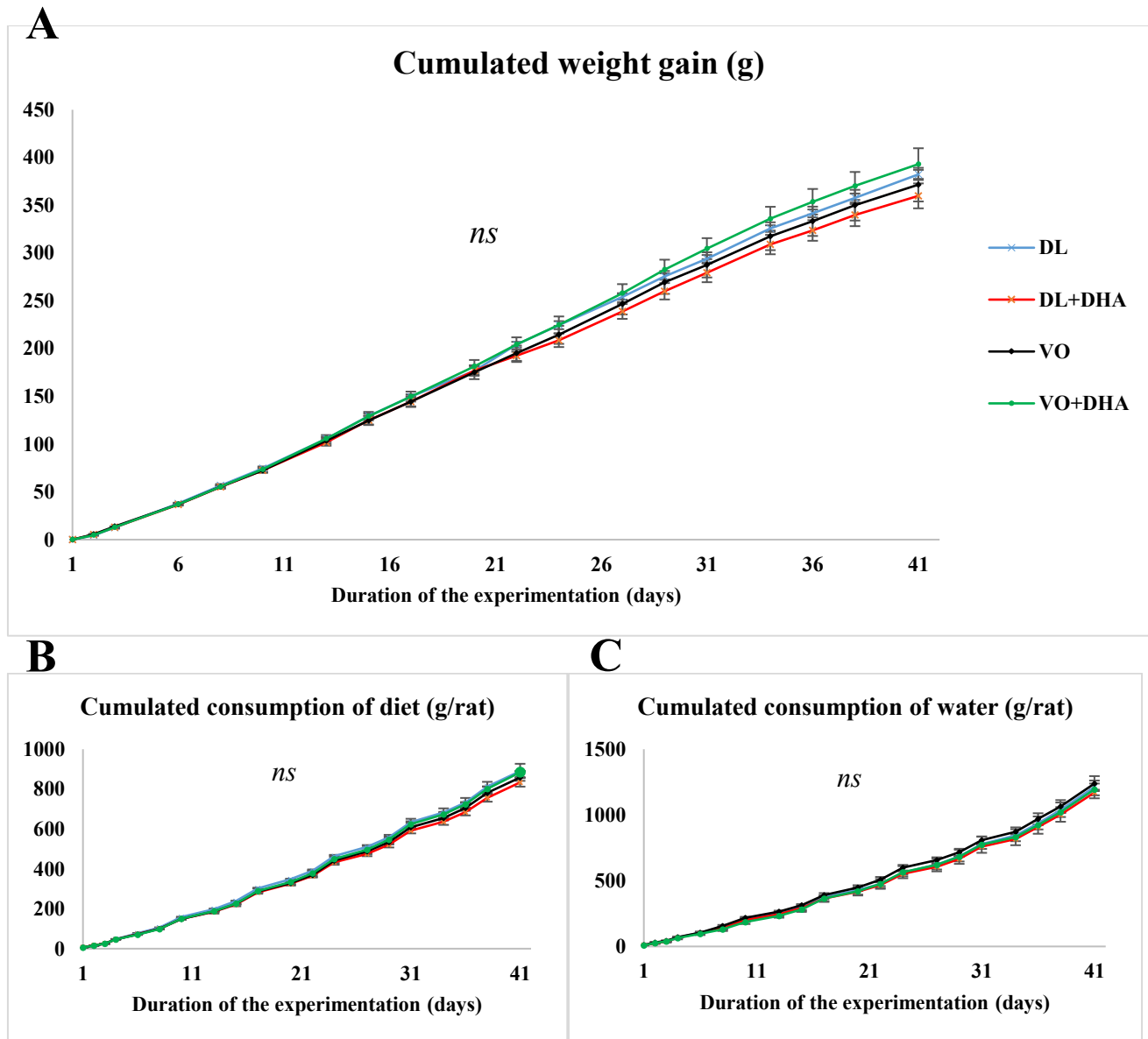
* **Correspondence:** Corresponding Author: philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Supplementary material 1 - Table 1: Organs weight at the end of the experimentation

Organs weight after 6 weeks of diets				
	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA
Liver	3.06 ±0.06	3.07 ±0.06	3.12 ±0.07	3.12 ±0.11
Brain	0.41 ^a ±0.01	0.47 ^b ±0.01	0.43 ^{ab} ±0.01	0.42 ^{ab} ±0.01
Heart	0.33 ±0.01	0.35 ±0.01	0.35 ±0.01	0.34 ±0.01

Organs weight of rats after 6 weeks of diets are presented (n = 8 / group for rats supplemented with DHA, n = 16 / group for rats not supplemented for 6 weeks). Results are mean ± SEM. A linear mixed model with two fixed factors (LQ: Lipid Quality, S: DHA supplementation) adjusted to the date of study is realized. The linear model is followed by a post-hoc test of Tukey-Kramer adjusted by false discovery rate method. Two different letters indicate significantly different values.

Supplementary material 1 - Figure 1: Rats body weight gain (A), food (B) and water consumption (C).



Cumulated weight gain, diet consumption and water consumption of rats after 6 weeks of diets are presented as mean \pm SEM ($n = 8$ / group for rats supplemented with DHA, $n = 16$ / group for rats not supplemented). A linear mixed model for repeated measures with two fixed adjusted to the date of study is realized. The linear model is followed by a post-hoc test of Tukey-Kramer adjusted by false discovery rate method. *ns*: non significant.

Supplementary Material 2

Dairy lipids enriched diet increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Anaëlle Siquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

* **Correspondence:** Corresponding Author: philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Supplementary material 2 - Table 1: Brain fatty acids composition of phospholipids

Supplementary material 2 - Table 2: Retina fatty acids composition of total lipids

Supplementary material 2 - Table 3: Liver fatty acids composition of total lipids

Supplementary material 2 - Table 4: Heart fatty acids composition of total lipids

Supplementary material 2 - Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids

Legend for all Tables:

The mass percentages of the identified fatty acids obtained by gas chromatography mass spectrophotometry are presented as mean \pm SEM of rats fed the vegetable oil blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL); not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA). A linear mixed model with two fixed factors (LQ: Lipid Quality, S: DHA supplementation) adjusted to the duration of the diets and the date of study was realized. A * represents globally an increase and • a decrease in favor of the DL groups for the LQ effect, in favor of the lots supplemented with DHA for the S effect (* p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001; . 0.1 <p <0.05). The linear model was followed by a post-hoc test of Tukey-Kramer adjusted by false discovery rate method. Two different letters indicate significantly different values. Fatty acids with a proportion <0.1% are noted as trace (tr).

Supplementary material 2 - Table 1: Brain fatty acids composition of phospholipids

	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
C14:0	0.17 ±0.04	0.15 ±0.02	0.13 ±0.01	0.16 ±0.02			
C16:0	20.53 ^{ab} ±0.54	19.54 ^b ±0.51	22.25 ^a ±0.66	19.74 ^b ±0.68	••		
C18:0	21.08 ±0.48	20.87 ±0.65	23.11 ±0.57	23.11 ±0.35			
C20:0	0.27 ±0.02	0.25 ±0.02	0.22 ±0.03	0.22 ±0.05			
Σ SFA	42.05^{ab} ±0.59	40.81^b ±0.78	45.71^a ±0.74	43.23^{ab} ±0.60	••		
C16:1 n-9	0.15 ±0.02	0.26 ±0.13	0.10 ±0.01	0.10 ±0.00			
C18:1 n-9	20.04 ±0.80	18.47 ±0.51	20.21 ±0.74	21.08 ±0.52			
C20:1 n-9	1.29 ±0.11	1.16 ±0.08	1.14 ±0.19	1.05 ±0.15			
Σ n-9	21.48 ±0.82	19.89 ±0.47	21.45 ±0.89	22.23 ±0.58			
C16:1 n-7	0.36 ±0.01	0.44 ±0.06	0.37 ±0.02	0.35 ±0.01			
C18:1 n-7	4.26 ±0.09	4.10 ±0.13	3.82 ±0.21	4.09 ±0.11		.	
C20:1 n-7	0.45 ±0.04	0.45 ±0.03	0.47 ±0.06	0.41 ±0.05			*
Σ n-7	5.07 ±0.11	4.99 ±0.13	4.67 ±0.24	4.85 ±0.15		.	
C18:2 n-6	0.73 ±0.06	0.76 ±0.06	0.78 ±0.04	0.96 ±0.10	*		
C20:3 n-6	0.33 ^a ±0.02	0.40 ^b ±0.02	0.42 ^c ±0.02	0.42 ^c ±0.03	**	***	
C20:4 n-6	11.04 ^{ab} ±0.31	11.87 ^b ±0.30	9.84 ^a ±0.40	10.38 ^{ab} ±0.39	.	.	
C22:4 n-6	3.04 ^a ±0.17	3.04 ^a ±0.16	1.76 ^b ±0.09	1.85 ^b ±0.10	•••		
C22:5 n-6	0.54 ^a ±0.06	0.50 ^a ±0.05	0.14 ^b ±0.02	0.14 ^b ±0.02	•••		
Σ n-6	15.73^a ±0.44	16.57^a ±0.42	12.92^b ±0.38	13.76^{ab} ±0.40	.	••	
C22:5 n-3	0.13 ^a ±0.01	0.15 ^{ab} ±0.01	0.16 ^{bc} ±0.02	0.18 ^c ±0.01		***	
C22:6 n-3	16.98 ^a ±0.28	18.43 ^b ±0.35	18.73 ^b ±0.71	19.58 ^b ±0.45	**	*	
Σ n-3	17.11^a ±0.49	18.58^b ±0.61	18.89^b ±0.58	19.76^b ±0.37	**	*	

For legend, see page 1.

Supplementary material 2 - Table 2: Retina fatty acids composition of total lipids

	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
C12:0	0.17 ±0.04	tr	0.14 ±0.03	0.10 ±0.01	•		
C14:0	0.60 ±0.04	0.59 ±0.06	0.54 ±0.03	0.60 ±0.02			
C15:0	0.15 ^a ±0.01	0.21 ^b ±0.02	0.16 ^{ab} ±0.01	0.19 ^{ab} ±0.01	***		
C16:0	25.15 ±0.47	25.12 ±0.19	25.93 ±0.29	25.51 ±0.23		•	
C18:0	21.67 ^a ±0.31	23.01 ^b ±0.20	22.64 ^{ab} ±0.41	22.86 ^b ±0.24	*		•
Σ SFA	47.74 ±0.65	49.02 ±0.24	49.41 ±0.55	49.25 ±0.34		•	
C16:1 n-9	0.37 ±0.01	0.44 ±0.07	0.37 ±0.02	0.33 ±0.02			
C18:1 n-9	18.64 ^a ±0.61	13.65 ^b ±0.28	15.25 ^b ±0.5	14.33 ^b ±0.14	•••	••	***
C20:1 n-9	0.36 ±0.04	0.42 ±0.05	0.44 ±0.05	0.37 ±0.05			
Σ n-9	19.36^a ±0.60	14.51^b ±0.30	16.05^b ±0.50	15.03^b ±0.15	•••	••	***
C16:1 n-7	0.85 ±0.09	0.80 ±0.05	0.78 ±0.06	0.82 ±0.06			
C18:1 n-7	3.12 ^a ±0.18	2.74 ^{ab} ±0.09	2.45 ^b ±0.06	2.48 ^b ±0.04		•••	•
C20:1 n-7	0.13 ±0.03	0.23 ±0.05	0.26 ±0.05	0.18 ±0.04			
Σ n-7	4.10^a ±0.22	3.77^{ab} ±0.09	3.49^b ±0.09	3.49^b ±0.07		••	
C18:2 n-6	2.86 ^a ±0.22	1.87 ^b ±0.14	2.47 ^{ab} ±0.12	2.57 ^a ±0.17	*		**
C20:3 n-6	0.19 ^a ±0.01	0.20 ^{ab} ±0.01	0.23 ^{bc} ±0.01	0.26 ^c ±0.01	•	***	
C20:4 n-6	7.72 ^a ±0.27	9.09 ^b ±0.13	7.58 ^a ±0.14	7.71 ^a ±0.11	***	•••	**
C22:4 n-6	1.31 ^a ±0.04	1.61 ^b ±0.10	0.97 ^c ±0.04	1.04 ^c ±0.05	**	•••	•
C22:5 n-6	0.28 ^a ±0.02	0.30 ^a ±0.01	tr	0.10 ^b ±0.01	***	•••	*
Σ n-6	12.36^{ab} ±0.35	13.07^a ±0.09	11.25^c ±0.13	11.68^{bc} ±0.20	*	•••	
C18:3 n-3	0.24 ±0.03	0.35 ±0.08	0.27 ±0.02	0.40 ±0.07	*		
C20:5 n-3	0.12 ^a ±0.01	0.16 ^a ±0.01	0.28 ^b ±0.02	0.40 ^c ±0.05	*	***	
C22:5 n-3	0.42 ^a ±0.02	0.38 ^a ±0.02	0.52 ^b ±0.01	0.54 ^b ±0.01		***	•
C22:6 n-3	15.66 ^a ±0.43	18.75 ^b ±0.47	18.73 ^b ±0.58	19.23 ^b ±0.25	***	***	**
Σ n-3	16.44^a ±0.43	19.64^b ±0.49	19.81^b ±0.59	20.56^b ±0.24	***	***	*

For legend, see page 1.

Supplementary material 2 - Table 3: Liver fatty acids composition of total lipids

	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
C14:0	0.57 ^a ±0.05	0.95 ^b ±0.05	0.45 ^a ±0.05	0.85 ^b ±0.10	***		
C15:0	0.14 ^a ±0.04	0.34 ^b ±0.03	0.13 ^a ±0.01	0.25 ^b ±0.01	***		
C16:0	23.84 ±0.69	23.18 ±0.56	24.53 ±0.21	24.25 ±0.97			
C18:0	12.61 ±0.73	12.21 ±0.48	13.71 ±1.05	11.70 ±0.72	•		
Σ SFA	37.17^{ab} ±0.42	36.68^b ±0.47	38.83^a ±0.98	37.05^{ab} ±0.72	•	•	
C16:1 n-9	0.50 ±0.04	0.47 ±0.03	0.63 ±0.06	0.51 ±0.06			
C18:1 n-9	29.78 ^a ±1.13	26.24 ^{ab} ±0.99	25.05 ^b ±2.37	25.74 ^{ab} ±1.05		••	
Σ n-9	30.29 ±1.17	26.71 ±1.01	25.67 ±2.41	26.25 ±1.09		•	
C16:1 n-7	2.07 ^a ±0.30	2.77 ^b ±0.22	1.51 ^a ±0.09	2.17 ^a ±0.29	***	•	
C18:1 n-7	3.22 ^a ±0.23	3.78 ^{ab} ±0.13	2.42 ^a ±0.06	2.97 ^b ±0.16	***	•••	
Σ n-7	5.28^a ±0.37	6.56^c ±0.32	3.93^b ±0.11	5.14^{ab} ±0.44	***	•••	
C18:2 n-6	7.15 ^a ±0.30	8.67 ^b ±0.36	8.92 ^b ±0.27	10.25 ^c ±0.52	***	***	
C18:3 n-6	0.18 ±0.02	0.18 ±0.01	0.15 ±0.02	0.14 ±0.02			
C20:2 n-6	0.16 ±0.01	0.13 ±0.01	0.16 ±0.03	0.16 ±0.02			
C20:3 n-6	0.29 ^a ±0.04	0.44 ^b ±0.05	0.54 ^c ±0.04	0.51 ^c ±0.06	•	***	•
C20:4 n-6	13.43 ^a ±0.82	13.48 ^a ±0.56	9.07 ^b ±0.67	8.01 ^b ±0.86		•••	
C22:4 n-6	0.15 ^a ±0.02	0.17 ^a ±0.02	0.06 ^b ±0.01	0.06 ^b ±0.01	•	••	
C22:5 n-6	0.15 ^a ±0.02	0.16 ^a ±0.02	0.02 ^b ±0.01	0.01 ^b ±0.01		•••	
Σ n-6	21.5 ±1.05	23.23 ±0.81	18.93 ±0.92	19.14 ±1.18		•	
C18:3 n-3	0.34 ^a ±0.04	0.50 ^b ±0.05	0.37 ^{ab} ±0.03	0.60 ^c ±0.06	***	***	
C20:5 n-3	0.12 ^a ±0.01	0.28 ^b ±0.03	1.32 ^c ±0.11	1.38 ^c ±0.13	**	***	
C22:5 n-3	0.25 ^a ±0.03	0.38 ^b ±0.04	0.39 ^c ±0.04	0.42 ^c ±0.04	*	***	
C22:6 n-3	5.05 ^a ±0.30	5.66 ^a ±0.37	10.57 ^b ±0.78	10.02 ^b ±0.59		***	
Σ n-3	5.75^a ±0.34	6.82^a ±0.43	12.64^b ±0.84	12.42^b ±0.77	***	***	

For legend, see page 1

Supplementary material 2 - Table 4: Heart fatty acids composition of total lipids

	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
C14:0	0.26 ^a ±0.03	0.32 ^b ±0.03	0.25 ^{ab} ±0.02	0.33 ^b ±0.03	**		
C15:0	0.02 ^a ±0.01	0.15 ^b ±0.02	0.10 ^{ab} ±0.01	0.14 ^b ±0.01	***	*	*
C16:0	12.84 ^a ±0.29	12.39 ^b ±0.34	14.19 ^c ±0.28	13.74 ^c ±0.20	•••	***	
C18:0	21.76 ±0.34	20.92 ±0.25	21.54 ±0.26	21.65 ±0.31	.		
Σ SFA	34.88^a ±0.58	33.78^b ±0.51	36.09^a ±0.38	35.86^a ±0.43	.	***	
C16:1 n-9	0.23 ±0.04	0.15 ±0.01	0.12 ±0.01	0.13 ±0.02			
C18:1 n-9	10.78 ±0.36	10.07 ±0.47	11.94 ±0.81	9.66 ±0.76	••		
C20:1 n-9	0.24 ±0.02	0.22 ±0.02	0.22 ±0.04	0.20 ±0.03			
C20:3 n-9	0.30 ^a ±0.03	0.29 ^a ±0.03	0.12 ^b ±0.02	0.11 ^b ±0.02		•••	
Σ n-9	11.55 ±0.36	10.74 ±0.47	12.40 ±0.83	10.10 ±0.78	••		
C16:1 n-7	0.55 ±0.07	0.60 ±0.04	0.32 ±0.03	0.50 ±0.07			
C18:1 n-7	4.47 ^{bc} ±0.10	4.84 ^{ab} ±0.12	4.09 ^{cd} ±0.23	3.99 ^d ±0.10		•••	
Σ n-7	5.02^{ab} ±0.14	5.44^b ±0.15	4.41^a ±0.25	4.49^a ±0.14		••	
C18:2 n-6	12.78 ^a ±0.29	14.18 ^b ±0.30	13.60 ^{ab} ±0.47	14.18 ^b ±0.50	***		
C20:3 n-6	0.34 ^a ±0.04	0.56 ^b ±0.04	0.40 ^b ±0.02	0.42 ^b ±0.04	***	.	*
C20:4 n-6	22.62 ^a ±0.26	21.32 ^a ±0.47	13.83 ^b ±0.35	13.71 ^b ±0.24		•••	
C22:4 n-6	0.65 ^a ±0.06	0.80 ^a ±0.06	0.08 ^b ±0.02	0.09 ^b ±0.02		•••	
C22:5 n-6	0.78 ^a ±0.08	0.73 ^a ±0.05	tr	tr		•••	
Σ n-6	37.18^a ±0.29	37.58^b ±0.51	27.91^c ±0.53	28.40^c ±0.45	*	•••	
C18:3 n-3	0.19 ±0.02	0.28 ±0.03	0.16 ±0.02	0.20 ±0.03	*		
C20:5 n-3	0.13 ^a ±0.02	0.15 ^a ±0.01	0.38 ^b ±0.04	0.37 ^b ±0.03		***	
C22:5 n-3	0.96 ^a ±0.10	1.46 ^b ±0.11	0.53 ^a ±0.05	0.63 ^a ±0.08	***	•••	
C22:6 n-3	10.10 ^a ±0.52	10.57 ^a ±0.51	18.12 ^b ±0.85	19.95 ^c ±1.02	*	***	
Σ n-3	11.37^a ±0.60	12.46^a ±0.58	19.20^b ±0.81	21.16^c ±1.07	*	***	

For legend, see page 1.

Supplementary material 2 - Table 5: Red blood cells fatty acids composition of total lipids

	VO	DL	VO+DHA	DL+DHA	ANOVA		
					LQ	S	LQ*S
C14:0	0.87 ±0.16	0.71 ±0.07	0.58 ±0.08	0.95 ±0.14	.		
C16:0	22.38 ^a ±0.81	22.58 ^a ±0.63	27.64 ^b ±0.42	26.31 ^{ab} ±0.54		*	.
C18:0	15.98 ±0.51	17.04 ±0.39	16.81 ±0.42	16.97 ±0.49		.	
Σ SFA	39.22 ±1.11	40.33 ±0.91	45.03 ±0.58	44.23 ±0.75			
C16:1 n-9	1.35 ±0.84	0.41 ±0.10	0.25 ±0.04	0.26 ±0.04			
C18:1 n-9	15.15 ±0.75	14.10 ±0.83	12.92 ±0.46	12.96 ±1.24			
Σ n-9	16.50 ±0.95	14.51 ±0.89	13.17 ±0.46	13.23 ±1.25			
C16:1 n-7	0.73 ±0.06	0.89 ±0.12	0.51 ±0.05	0.57 ±0.05			
C18:1 n-7	2.64 ^a ±0.09	2.86 ^a ±0.11	2.29 ^b ±0.04	2.43 ^b ±0.08	
Σ n-7	3.37^a ±0.11	3.75^c ±0.17	2.79^b ±0.07	3.00^{ab} ±0.07	**	...	
C18:2 n-6	5.89 ^a ±0.21	6.99 ^b ±0.46	6.87 ^{bc} ±0.13	7.53 ^c ±0.36	***	***	
C20:2 n-6	0.58 ±0.08	0.41 ±0.05	0.59 ±0.06	0.57 ±0.09			
C20:3 n-6	0.54 ^a ±0.04	0.60 ^a ±0.04	0.96 ^b ±0.06	0.99 ^b ±0.07		***	
C20:4 n-6	25.57 ^a ±0.70	24.38 ^b ±0.88	17.69 ^c ±0.40	17.82 ^c ±1.07	
C22:4 n-6	1.24 ^a ±0.08	1.24 ^a ±0.09	0.42 ^b ±0.05	0.60 ^b ±0.11		...	
C22:5 n-6	0.59 ^a ±0.05	0.52 ^a ±0.04	0.10 ^b ±0.04	0.23 ^b ±0.06		...	
Σ n-6	34.39^a ±0.71	34.14^a ±0.71	26.63^b ±0.39	27.73^b ±0.86		...	
C18:3 n-3	0.40 ±0.07	0.67 ±0.12	0.20 ±0.05	0.24 ±0.06	*		
C20:5 n-3	0.44 ^a ±0.11	0.56 ^a ±0.08	1.87 ^b ±0.13	1.58 ^b ±0.19		***	
C22:5 n-3	1.49 ^a ±0.14	1.71 ^b ±0.16	2.34 ^{bc} ±0.11	2.63 ^c ±0.30	**	**	
C22:6 n-3	4.19 ^a ±0.16	4.32 ^a ±0.28	7.97 ^b ±0.29	7.36 ^b ±0.72		***	
Σ n-3	6.52^a ±0.32	7.26^a ±0.38	12.38^b ±0.33	11.81^b ±1.01		***	

For legend, see page 1.

Supplementary Material 3

Dairy lipids enriched diet increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Anaëlle Sinquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

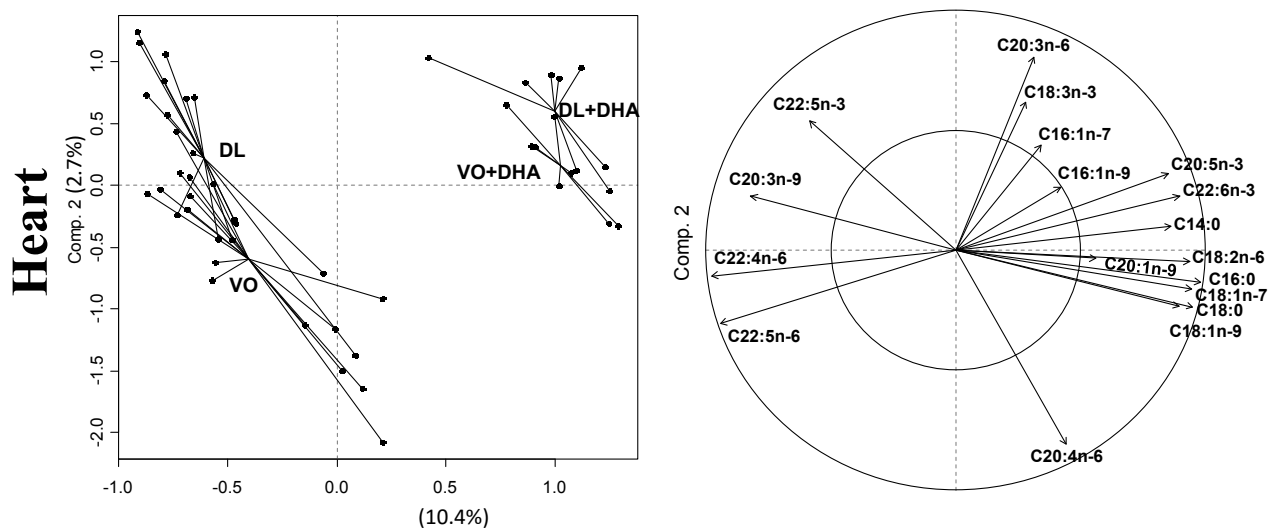
* **Correspondence:** Corresponding Author: philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Supplementary material 3 - Figure 1: Principal component analysis of the heart

Supplementary material 3 - Figure 2: Redundancy analysis of the heart

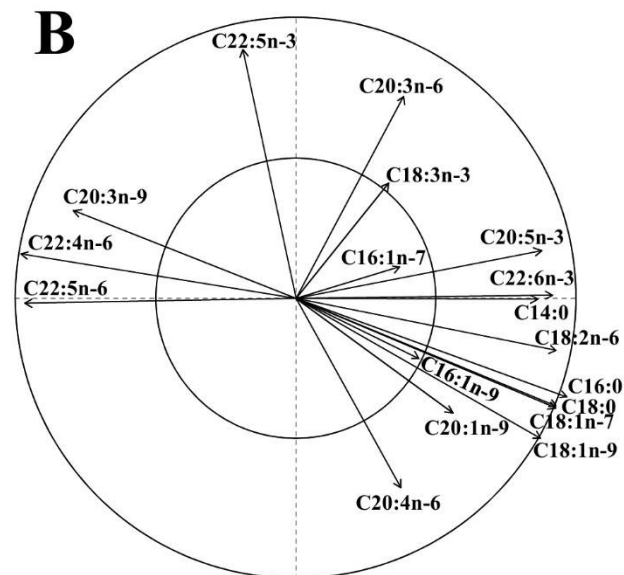
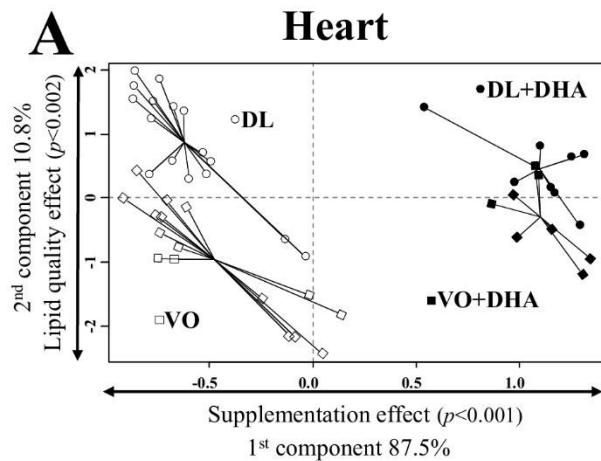
Supplementary material 3 - Table 1: Pearson correlation coefficient of heart redundancy analysis

Supplementary material 3 - Figure 1: Principal component analysis of the heart



PCA individuals score plots (A) and PCA loadings plots (B) of heart (n=48) fatty acids compositions, of rats fed during 6 weeks with the four experimental diets. Percentages expressed the explained variance associated with each component.

Supplementary material 3 - Figure 2: Redundancy analysis of the heart



C

RDA pairwise comparisons			
	DL	DL+DHA	VO
DL+DHA	0.0012	-	-
VO	0.0012	0.0012	-
VO+DHA	0.0012	0.0230	0.0012

Results: In the heart, the DHA supplementation effect can be decomposed along the first component and the lipid quality effect along the second component (A-B). To explain the differences in the FA profiles, the DHA supplementation effect influenced the variability (87.5% of constrained variance) more than the lipid quality effect (10.8%). Surprisingly, the proportions of n-3 DPA and C20:3n-6 are the only one that discriminated DL diets well while arachidonic acid (C20:4n-6) discriminated VO

Legend: Redundancy analysis was performed to assess differences in fatty acids metabolic profile in heart of rats fed the vegetable oils blend diet (VO) or the vegetable oil and dairy lipid blend diet (DL); not supplemented or supplemented with 0.5% DHA (VO+DHA and DL+DHA) for 6 weeks ($n = 8$ /group for rats supplemented with DHA and $n = 16$ for rats not supplemented for 6 weeks). We considered as constraints the lipid quality effect, the DHA supplementation effect and the interaction between these two effects. (A) Scatter plots showed individual scores. (B): Loadings plots showed correlation coefficient between fatty acids data and individual scores, a Pearson correlation coefficient procedure was performed to consider the significance of FA for each component (See Supplementary Material 3, Table 1). (C): A permutation test adjusted with false discovery rate method was used to consider the significance of the lipid quality effect (LQ) (VO+VODHA vs DL+DL+DHA) and the DHA supplementation effect (S) (VO+DL vs VODHA+DL+DHA). This test was followed by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination adjusted with false discovery rate method to assess the significance between the 4 groups.

Supplementary material 3 - Table 1: Pearson correlation coefficient of heart redundancy analysis

RDA Pearson correlation coefficient and test between FA and individuals						
First component				Second component		
Fatty acids	Corr	P.value		Fatty acids	Corr	P.value
C16 :0	0.9657	1.2639e-27	***	C22 :5 n-3	0.915000	3.2251e-11 ***
C18 :2 n-6	0.9267	1.4619e-20	***	C20 :3 n-6	0.716800	9.0481e-08 ***
C18 :1 n-7	0.9262	1.4619e-20	***	C18 :3 n-3	0.407300	1.2248e-02 *
C18 :0	0.9244	2.1211e-20	***	C20 :3 n-9	0.310400	5.7171e-02 .
C22 :6 n-3	0.9145	2.7529e-19	***	C20 :5 n-3	0.169200	3.4663e-01
C20 :5 n-3	0.8735	1.2473e-15	***	C22 :4 n-6	0.156700	3.6968e-01
C18 :1 n-9	0.8702	1.9226e-15	***	C16 :1 n-7	0.109900	5.4831e-01
C14 :0	0.8604	8.3356e-15	***	C22 :6 n-3	0.011130	9.7696e-01
C20 :1 n-9	0.5577	5.7256e-05	***	C14 :0	-0.004282	9.7696e-01
C16 :1 n-9	0.4386	2.3411e-03	**	C22 :5 n-6	-0.019210	9.7696e-01
C20 :3 n-6	0.3849	8.2918e-03	**	C18 :2 n-6	-0.188100	3.0061e-01
C20 :4 n-6	0.3715	9.9915e-03	**	C16 :1 n-9	-0.214100	2.3560e-01
C16 :1 n-7	0.3710	9.9915e-03	**	C16 :0	-0.350400	2.9226e-02 *
C18 :3 n-3	0.3295	2.2195e-02	*	C18 :1 n-7	-0.384400	1.5736e-02 *
C22 :5 n-3	-0.5347	1.2514e-04	***	C18 :0	-0.389600	1.5736e-02 *
C20 :3 n-9	-0.7919	3.3408e-11	***	C20 :1 n-9	-0.407100	1.2248e-02 *
C22 :5 n-6	-0.9643	2.0746e-27	***	C18 :1 n-9	-0.497900	1.4254e-03 **
C22 :4 n-6	-0.9795	2.1434e-32	***	C20 :4 n-6	-0.673100	9.5813e-07 ***

Test of Pearson correlation coefficient between FA data and individual scores. This test was used to show FA explaining most of the variability corresponding to the component representing the LQ effect or S effect on the loadings plots.

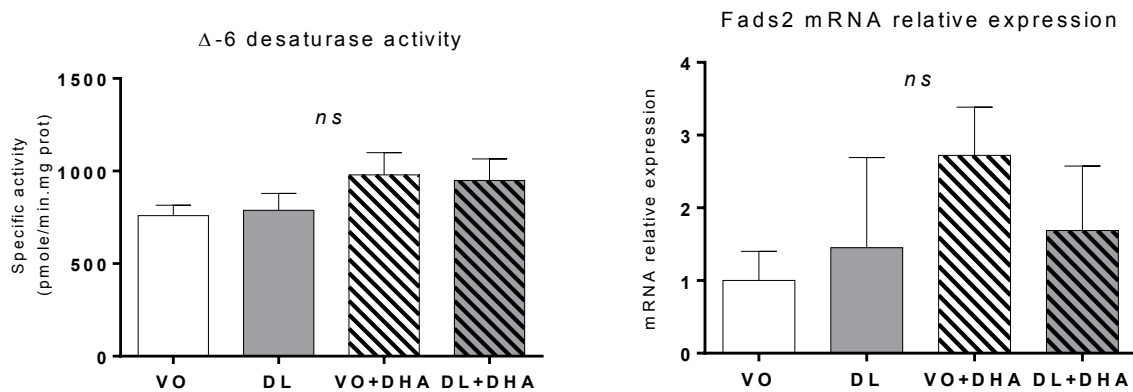
Supplementary Material 4

Dairy lipids enriched diet increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Anaëlle Siquin¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Vincent Rioux¹, Philippe Legrand^{1*}

* **Correspondence:** Corresponding Author: philippe.legrand@agrocampus-ouest.fr

Supplementary material 4 – Figure 1: Δ -6 desaturase activity and Fads2 mRNA relative expression



Values are represented as mean \pm SEM (n = 8/group). A Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc test of Dunn's were used to compare groups. Two different letters indicate significantly different values. *ns* = non significant. Fads2 : Fatty acid desaturase 2 gene.

Tissus complémentaire à l'article 3

Composition en acides gras totaux du jéjunum des rats nourris avec un régime MGV ou MGL supplémenté ou non avec 0,5% de DHA pendant 6 semaines.

Lot	MGV	MGV+DHA	MGL	MGL+DHA	ANOVA		
					V	S	V*S
C12:0	0,12 ^a ±0,01	0,11 ^a ±0,01	0,37 ^b ±0,04	0,54 ^c ±0,06	***	.	*
C14:0	1,01 ^a ±0,07	0,99 ^a ±0,07	2,55 ^b ±0,19	3,07 ^c ±0,17	***	.	.
C15:0	0,14 ^a ±0,01	0,13 ^a ±0,01	0,34 ^b ±0,02	0,40 ^c ±0,01	***	*	*
C16:0	21,64 ±0,42	22,42 ±0,23	22,86 ±0,46	23,55 ±0,48	**	.	.
C18:0	6,76 ^a ±0,86	7,04 ^{ab} ±1,10	8,27 ^{ab} ±0,86	6,91 ^b ±0,61			
Σ saturés	29,66^a ±0,88	30,70^a ±1,12	34,39^b ±0,61	34,47^b ±0,35	***		
C16:1 n-9	0,44 ^a ±0,02	0,39 ^{ab} ±0,02	0,37 ^b ±0,01	0,36 ^b ±0,01	•••	.	
C18:1 n-9	46,61 ^a ±2,41	45,09 ^{ab} ±2,89	37,74 ^b ±1,92	40,96 ^{ab} ±1,29	**		
C20:1 n-9	0,36 ^a ±0,02	0,34 ^a ±0,02	0,30 ^{ab} ±0,02	0,26 ^b ±0,01	•••	.	
C20:3 n-9	0,18 ±0,03	0,16 ±0,03	0,21 ±0,03	0,12 ±0,01		.	
Σ n-9	47,59^a ±2,38	45,98^{ab} ±2,87	38,62^b ±1,89	41,69^{ab} ±1,28	••		
C16:1 n-7	2,95 ±0,30	3,06 ±0,22	4,17 ±0,44	3,47 ±0,34	*		
C18:1 n-7	3,21 ^a ±0,18	2,60 ^c ±0,07	3,68 ^b ±0,11	2,81 ^{bc} ±0,06	**	•••	
C20:1 n-7	0,15 ±0,03	0,14 ±0,02	0,16 ±0,01	0,16 ±0,02			
Σ n-7	6,31^b ±0,39	5,80^b ±0,23	8,00^a ±0,52	6,45^b ±0,34	**	.	
C18:2 n-6	7,92 ^a ±0,26	8,78 ^a ±0,18	8,92 ^a ±0,40	10,16 ^b ±0,19	***	***	
C20:3 n-6	0,29 ±0,06	0,41 ±0,10	0,39 ±0,07	0,33 ±0,06			
C20:4 n-6	5,52 ±1,18	4,18 ±0,90	6,63 ±1,05	3,02 ±0,62		.	
C22:4 n-6	0,70 ^a ±0,17	0,26 ^b ±0,06	0,79 ^a ±0,12	0,18 ^b ±0,04		•••	
C22:5 n-6	0,07 ^a ±0,02	Tr ^b	0,10 ^a ±0,02	Tr ^b		•••	
Σ n-6	14,5 ±1,30	13,63 ±1,16	16,82 ±1,26	13,7 ±0,80		.	
C18:3 n-3	0,64 ^a ±0,04	0,72 ^a ±0,06	0,72 ^a ±0,07	0,94 ^b ±0,05	*	*	
C20:5 n-3	0,10 ^a ±0,03	0,40 ^b ±0,10	0,12 ^a ±0,03	0,33 ^{ab} ±0,07		***	
C22:5 n-3	0,20 ±0,04	0,33 ±0,08	0,26 ±0,04	0,30 ±0,06			
C22:6 n-3	1,00 ^a ±0,20	2,44 ^b ±0,58	1,06 ^{ab} ±0,19	2,14 ^{ab} ±0,37		**	
Σ n-3	1,93^a ±0,24	3,89^c ±0,71	2,16^{ab} ±0,19	3,70^{bc} ±0,43		***	

Les pourcentages massiques des acides gras identifiés obtenus par GCMS sont présentés en moyenne ± SEM (n=8 par lot). Une ANOVA à 2 facteurs (V : Vecteur, S : Supplémentation) est réalisée. Un * représente globalement une augmentation et un • une diminution en faveur des lots MGL pour l'effet vecteur, en faveur des lots supplémentés en DHA pour l'effet supplémentation (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; . 0,1<p<0,05). L'ANOVA est suivie d'un test post-hoc de Tukey, deux lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. Les acides gras avec une proportion <0,1% sont notés Trace (Tr).

Composition en acides gras totaux du jéjunum des rats nourris avec un régime MGV ou MGL supplémenté ou non avec 0,5% de DHA pendant 6 semaines.

Lot	MGV	MGV+DHA	MGL	MGL+DHA	ANOVA		
					V	S	V*S
C12:0	Tr	Tr	Tr	Tr			
C14:0	0,40 ^a ±0,02	0,43 ^a ±0,04	0,79 ^b ±0,05	0,85 ^b ±0,07	***		
C15:0	0,12 ^a ±0,01	0,10 ^a ±0,02	0,23 ^b ±0,01	0,26 ^b ±0,02	***		
C16:0	22,03 ±0,38	22,52 ±0,24	22,20 ±0,21	22,92 ±0,58			
C18:0	13,29 ^a ±0,18	11,74 ^b ±0,47	13,29 ^a ±0,37	12,78 ^{ab} ±0,17		••	
C19:0	Tr	Tr	Tr	Tr			
C20:0	Tr	Tr	Tr	Tr			
Σ saturés	35,84^{ab} ±0,42	34,79^a ±0,53	36,51^{ab} ±0,21	36,82^b ±0,58	**		
C16:1 n-9	0,40 ±0,03	0,45 ±0,03	0,36 ±0,03	0,39 ±0,03			
C18:1 n-9	17,16 ±0,78	17,88 ±1,43	15,80 ±0,49	15,24 ±0,79	•		
C20:1 n-9	0,40 ^a ±0,06	0,28 ^{ab} ±0,03	0,25 ^{ab} ±0,02	0,16 ^b ±0,03	••	•	
C20:3 n-9	0,41 ^a ±0,02	0,20 ^b ±0,01	0,39 ^a ±0,03	0,16 ^b ±0,01	•	•••	
Σ n-9	18,36 ±0,80	18,81 ±1,43	16,81 ±0,50	15,95 ±0,79	•		
C16:1 n-7	0,78 ^a ±0,08	0,86 ^{ab} ±0,12	1,22 ^b ±0,09	1,03 ^{ab} ±0,12	**		
C18:1 n-7	3,62 ^{ab} ±0,15	3,09 ^a ±0,06	3,89 ^b ±0,12	3,41 ^{ab} ±0,24	•	••	
Σ n-7	4,40^{ab} ±0,21	3,95^a ±0,11	5,11^b ±0,17	4,45^{ab} ±0,34	*	•	
C18:2 n-6	16,70 ^{ab} ±0,32	15,80 ^b ±0,39	17,31 ^a ±0,41	15,76 ^b ±0,25		••	
C20:3 n-6	0,47 ±0,02	0,47 ±0,02	0,57 ±0,05	0,51 ±0,01	*		
C20:4 n-6	12,87 ^a ±0,31	5,81 ^b ±0,22	12,24 ^a ±0,44	5,62 ^b ±0,23		•••	
C22:4 n-6	0,35 ^a ±0,02	0,06 ^b ±0,01	0,41 ^a ±0,07	0,09 ^b ±0,01		•••	
C22:5 n-6	0,28 ^a ±0,03	0,00 ^b ±0,01	0,35 ^a ±0,05	0,01 ^b ±0,01		•••	
Σ n-6	30,67^a ±0,60	22,14^b ±0,60	30,88^a ±0,48	22,00^b ±0,45		•••	
C20:5 n-3	0,16 ^a ±0,01	0,43 ^b ±0,04	0,22 ^a ±0,03	0,43 ^b ±0,03		***	
C22:5 n-3	0,98 ^a ±0,05	0,62 ^b ±0,05	1,29 ^c ±0,09	0,73 ^b ±0,04	**	***	
C22:6 n-3	9,59 ^a ±0,37	19,26 ^b ±0,46	9,18 ^a ±0,15	19,62 ^b ±0,76		***	
Σ n-3	10,74^a ±0,37	20,32^b ±0,43	10,68^a ±0,16	20,79^b ±0,78		***	

Les pourcentages massiques des acides gras identifiés obtenus par GCMS sont présentés en moyenne ± SEM (n=8 par lot). Une ANOVA à 2 facteurs (V : Vecteur, S : Supplémentation) est réalisée. Un * représente globalement une augmentation et un • une diminution en faveur des lots MGL pour l'effet vecteur, en faveur des lots supplémentés en DHA pour l'effet supplémentation (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; . 0,1<p<0,05). L'ANOVA est suivie d'un test post-hoc de Tukey, deux lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. Les acides gras avec une proportion <0,1% sont notés Trace (Tr).

Composition en acides gras totaux du rein des rats nourris avec un régime MGV ou MGL supplémenté ou non avec 0,5% de DHA pendant 6 semaines.

Lot	MGV	MGV+DHA	MGL	MGL+DHA
C14:0	0,4 ^b ± 0,1	0,4 ^b ± 0,0	0,6 ^a ± 0,1	0,6 ^a ± 0,1
C15:0	0,1 ^b ± 0,0	0,1 ^b ± 0,0	0,2 ^a ± 0,0	0,3 ^a ± 0,0
C16:0	23,1 ^{ab} ± 0,9	23,6 ^b ± 0,6	22,3 ^a ± 0,8	23,0 ^{ab} ± 0,9
C18:0	15,8 ± 0,9	15,2 ± 0,7	16,1 ± 0,4	15,9 ± 0,7
Σ Saturés	39,5 ± 0,6	39,2 ± 0,7	39,3 ± 0,7	39,8 ± 0,4
C16:1 n-7	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,2
C18:1 n-7	2,9 ^a ± 0,3	2,2 ^b ± 0,1	3,0 ^a ± 0,2	2,3 ^b ± 0,1
C16:1 n-9	0,6 ^b ± 0,1	0,7 ^b ± 0,1	0,4 ^a ± 0,1	0,5 ^a ± 0,1
C18:1 n-9	14,3 ^b ± 1,6	15,0 ^b ± 1,7	11,5 ^a ± 0,8	12,1 ^a ± 1,0
C20:1 n-9	0,2 ^b ± 0,0	0,2 ^{ab} ± 0,0	0,1 ^{ab} ± 0,0	0,1 ^a ± 0,0
Σ AGMI	19,0^b ± 1,8	19,0^b ± 1,9	16,3^a ± 0,9	16,0^a ± 1,1
C18:2 n-6	7,8 ^c ± 0,6	12,3 ^d ± 0,5	8,7 ^a ± 0,7	13,2 ^b ± 0,6
C20:3 n-6	0,6 ^c ± 0,0	0,8 ^{ab} ± 0,1	0,7 ^a ± 0,1	0,9 ^b ± 0,1
C20:4 n-6	28,5 ^a ± 1,8	19,0 ^b ± 1,7	29,9 ^a ± 0,7	20,1 ^b ± 1,6
C22:4 n-6	0,4 ^a ± 0,0	0,1 ^b ± 0,0	0,4 ^a ± 0,0	0,1 ^b ± 0,0
C22:5 n-6	0,1 ^a ± 0,0	0,0 ^b ± 0,0	0,1 ^a ± 0,1	0,0 ^b ± 0,0
Σ n-6	37,5^c ± 1,6	32,3^a ± 2,0	39,9^b ± 0,7	34,4^a ± 1,9
C18:3 n-3	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,6 ± 1,0	0,3 ± 0,1
C20:5 n-3	0,3 ^a ± 0,0	3,1 ^b ± 0,6	0,4 ^a ± 0,1	3,3 ^b ± 0,5
C22:5 n-3	0,3 ^a ± 0,0	0,5 ^b ± 0,1	0,4 ^a ± 0,0	0,5 ^b ± 0,1
C22:6 n-3	2,8 ^a ± 0,2	5,3 ^b ± 0,8	2,9 ^a ± 0,1	5,5 ^b ± 0,4
Σ n-3	3,7^a ± 0,2	9,2^b ± 1,4	4,2^a ± 1,1	9,6^b ± 0,8

Les pourcentages massiques des acides gras identifiés obtenus par GCMS sont présentés en moyenne ± SD (n=8 par lot). Une ANOVA à 2 facteurs est réalisée et suivie d'un test post-hoc de Tukey. Deux lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

Composition en acides gras totaux du plasma des rats nourris avec un régime MGV ou MGL supplémenté ou non avec 0,5% de DHA pendant 6 semaines.

Lot	MGV		MGV+DHA		MGL		MGL+DHA	
C14:0	0,4 ^b	± 0,1	0,4 ^b	± 0,1	0,8 ^a	± 0,1	0,7 ^a	± 0,1
C15:0	0,1 ^b	± 0,0	0,2 ^b	± 0,0	0,3 ^a	± 0,0	0,3 ^a	± 0,0
C16:0	17,7	± 1,8	18,9	± 1,8	19,3	± 2,7	18,5	± 1,1
C18:0	4,2 ^{ab}	± 0,6	4,5 ^{ab}	± 0,3	4,1 ^a	± 0,6	4,9 ^b	± 0,5
Σ Saturés	22,4	± 1,8	24,0	± 1,8	24,4	± 2,2	24,4	± 1,3
C16:1 n-7	1,8 ^b	± 0,5	1,6 ^b	± 0,4	2,7 ^a	± 0,7	2,0 ^b	± 0,3
C18:1 n-7	1,9 ^b	± 0,3	1,4 ^c	± 0,1	2,4 ^a	± 0,4	1,7 ^{bc}	± 0,2
CC0:1 n-7	0,2 ^{ac}	± 0,0	0,2 ^{ab}	± 0,1	0,2 ^a	± 0,0	0,3 ^b	± 0,1
C16:1 n-9	0,4 ^b	± 0,0	0,4 ^b	± 0,0	0,3 ^{ab}	± 0,0	0,3 ^a	± 0,0
C18:1 n-9	27,9 ^a	± 2,6	25,9 ^{ab}	± 2,0	28,2 ^a	± 3,5	23,8 ^b	± 2,6
C20:1 n-9	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0
Σ AGMI	32,3^{ab}	± 3,0	29,7^{ab}	± 2,3	34,0^a	± 4,5	28,3^b	± 2,6
C18:2 n-6	9,7 ^a	± 0,8	12,3 ^c	± 1,2	11,1 ^{ac}	± 0,8	13,9 ^b	± 1,3
C18:3 n-6?	0,3	± 0,1	0,2	± 0,1	0,3	± 0,1	0,2	± 0,0
C20:3 n-6	0,3 ^a	± 0,1	0,5 ^b	± 0,1	0,3 ^a	± 0,1	0,5 ^b	± 0,1
C20:4 n-6	29,1 ^b	± 4,5	17,8 ^a	± 3,5	23,5 ^{ab}	± 6,4	17,1 ^a	± 4,6
C22:4 n-6	0,3 ^a	± 0,1	0,0 ^b	± 0,0	0,4 ^a	± 0,1	0,0 ^b	± 0,0
C22:5 n-6	0,2 ^a	± 0,0	0,0 ^b	± 0,0	0,2 ^a	± 0,1	0,0 ^b	± 0,0
Σ n-6	39,8^b	± 4,7	30,9^a	± 4,5	35,6^{ab}	± 6,6	31,7^a	± 4,5
C18:3 n-3	0,6 ^b	± 0,1	0,7 ^{ab}	± 0,1	0,8 ^{ab}	± 0,1	0,9 ^a	± 0,4
C20:5 n-3	0,7 ^a	± 0,2	4,4 ^b	± 1,0	0,9 ^a	± 0,2	4,6 ^b	± 0,8
C22:5 n-3	0,4 ^b	± 0,1	0,7 ^a	± 0,3	0,5 ^{ab}	± 0,2	0,7 ^a	± 0,2
C22:6 n-3	3,1 ^a	± 0,4	9,4 ^b	± 1,4	3,2 ^a	± 0,5	9,2 ^b	± 1,5
Σ n-3	4,8^a	± 0,5	15,2^b	± 2,1	5,4^a	± 0,7	15,4^b	± 2,6

Les pourcentages massiques des acides gras identifiés obtenus par GCMS sont présentés en moyenne ± SD (n=8 par lot). Une ANOVA à 2 facteurs est réalisée et suivie d'un test post-hoc de Tukey. Deux lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

ANNEXE IV-B:
Données complémentaires de la Partie 3.2

**Vers l'optimisation des conditions nutritionnelles et
physiologiques pour l'incorporation de lipides laitiers comme
vecteur d'optimisation du statut tissulaire en AGPI n-3**

Composition en acides gras des huiles alimentaires utilisées dans les mélanges lipidiques des régimes.

Acide gras (%)	% AG totaux des matières premières					
	MGLA	Colza	Tournesol	Tournesol oléique	Palme	Tournesol hydrogéné
C4:0	4,94					
C6:0	2,26					
C8:0	1,23					
C10:0	2,76					0,3
C10:1	0,25					
C12:0	3,11				0,14	
C12:1 n-3	0,07					
C13:0	0,08					
C14:0 antéiso	0,08					
C14:0	10,57	0,05	0,07		0,90	0,2
C15:0 iso	1,16					
C14:1 n-5 c	0,00					
C15:0 antéiso	0,50					
C15:0	1,09					
C16:0 iso	0,22					
C16:0	29,51	5,15	6,80	4,40	42,60	6,50
C16:1 n-9 c	0,21					
C16:1 n-7 c	1,48	0,19	0,08		0,22	
C17:0 iso	0,39					
C17:0 antéiso ?	0,58					
C17:0	0,57				0,09	
C18:0	11,08	1,78	4,6	2,14	4,56	92
C18:1 n-9 t	0,39					
C18:1 n-x t						
C18:1 n-7 t + n-12 c	1,79					
C18:1 n-9 c + n-5 t	20,78	59,11	31,12	75,57	39,51	
C18:1 n-3 t	0,00					
C18:1 n-7 c	0,70	2,90	0,72	1,84	1,05	
C18:1 n-6 c	0,34					
C18:1 n-5 c	0,35					
C18:2 n-6 tt	0,32					
C18:1 n-3 c	0,00					
C18:2 n-6 cc	2,05	19,25	55,05	13,56	10,20	
C18:3 n-3	0,34	9,05	0,06	1,62	0,22	
C20:0	0,00	0,57	0,31	0,40	0,39	0,4
C18:2 c 9 t 11	0,66					
C20:3 n-6	0,04	1,33	0,17		0,12	
C20:4 n-6	0,06					
C22:0		0,30	0,82	0,47		0,6
C22:5 n-3	0,04	0,32	0,20			
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,0	100,0

ANNEXE V :
Communications affichées et résumés associés

Dairy lipids in infant formula : Impact on the Omega-3 fatty acid content. Focus on DPA n-3.



Drouin G¹., Sinquin A¹., Boissel F¹., Catheline D¹., Baudry C²., Le Ruyet P²., Legrand P¹., Pédrono F¹.

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest
²Lactalis R&D



Context

In most infant formulas, lipids are provided by a blend of **vegetable oils (VL)**. The partial reintroduction of **dairy lipids (DL)** could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in α -linolenic acid (ALA) were superior to n-3 FA-enriched VL blends for increasing DHA accretion in brain. However these results were observed in specific conditions :

- 1) In post-weaning rats after depletion of Omega-3 FA during gestation and lactation (Delplanque&al., PLEFA, 2012).
- 2) In mice, when the Omega-6 / Omega3 ratio was lower in the DL group (2.3% ALA, LA/ALA ratio=5) as compared to the VL group (1.3% ALA, LA/ALA ratio=10) during gestation and lactation (Dinel&al., PLEFA, 2016).

ALA 18:3 Δ^6 18:4 ϵ^5 20:4 Δ^5 EPA 20:5 ϵ^2-5 DPA 22:5 ϵ^2 24:5 Δ^6 24:6 β -ox DHA 22:6

Methods

Experimental design

Sprague Dawley rats (n=8) were fed after weaning with a diet containing a mix of plant oils (VL) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) during 6 weeks \pm 0.5% DHA or 3 weeks with VL \pm 0.5% DPA.

Total FA analysis

Lipids were extracted from frozen tissues (Delsal, 1944). FA were then derived into FA methyl esters whose composition were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Statistical analysis

Results were expressed in mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by ANOVA 2 and Student t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; td $p < 0.1$

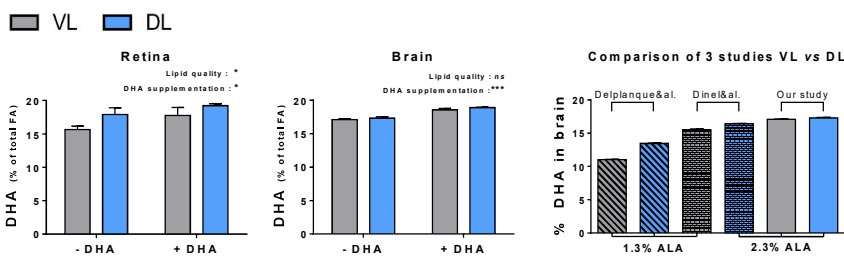
Diets : % FA	VL	DL
Saturated	21.0	37.5
4:0 to 24:0	21.0	36.6
whose 16:0	17.2	17.1
Mono-unsaturated	65.3	47.4
18:1 n-9	63.3	42.7
Poly-unsaturated	13.7	14.2
18:2 n-6 (LA)	11.3	11.5
18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.4
LA/ALA ratio	4.9	5.0
DHA	\pm 0.5	\pm 0.5
or		
DPA		\pm 0.5

Objectives

- 1) To evaluate the DL effect on Omega-3 metabolism during post-weaning with an equal 2,3% ALA and LA/ALA ratio of 5.
- 2) Study the potential impact of DPA n-3 on lipid metabolism.

Results

Impact of diets on Omega-3 status



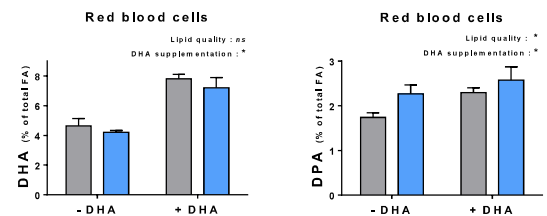
In retina, rats fed DL accumulated more DHA than VL group. The DHA status was higher when diets were supplemented with DHA.

In brain, the DL diet did not impact on the DHA level. Only the supplementation of diets with DHA increased its brain accretion.

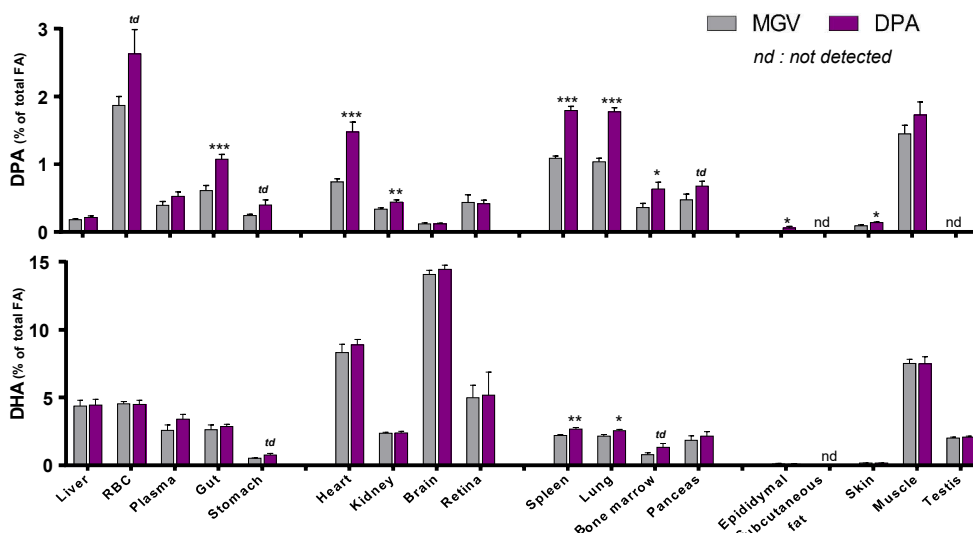
In comparison with the other studies, in our conditions (with ALA 2.3%, ratio LA/ALA=5 and post-weaning) the conversion of ALA to DHA might be saturated.

The DHA proportion in red blood cells was equivalent with DL or VL diets but was improved when animals were supplemented with DHA.

On the contrary, DPA was more abundant in red blood cells from rats fed DL as compared to VL.



Impact of DPA n-3 supplementation



Most tissues were enriched in DPA when diets were supplemented with the FA, and particularly heart, spleen, lung and bone marrow.

Brain, retina and liver were not affected by the diet.

Overall the DHA profile was not impacted by the DPA diet; again spleen, lung and bone marrow were slightly enriched in DHA with the DPA diet.

Conclusion and perspectives

- 1) DL improved the DHA status in retina but not in brain, and increased DPA in red blood cells when rats are fed with an equal 2.3% ALA and a LA/ALA ratio of 5. Future study will determine if the beneficial effect of DL reported in Delplanque's and Dinel's work stems from a gestation-lactation effect or a difference in the ratio.
- 2) The DPA supplementation in diet may improve the DPA status in most tissues and possibly the DHA level in specific organs, but didn't change the Omega-3 status in retina and brain. Future study with DPA supplementation in a diet containing VL + DL will investigate the potential effect of DPA on lipid metabolism.

Impact de la matière grasse laitière et du DPA n-3 dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés.

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹, Pedrono F.¹

¹ : *Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest* ; ² : *Lactalis R&D*

L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) est le dérivé terminal de la voie de conversion des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI) à partir de l'acide α -linoléique (ALA, 18:3 n-3). Il est indispensable au bon développement neurocognitif et visuel chez l'enfant. Alors que dans la plupart des formules infantiles, les lipides sont apportés par un mélange de matières grasses végétales (MGV), certaines études ont montré qu'une réintroduction partielle de matière grasse laitière (MGL) pourrait être bénéfique pour stimuler la voie de conversion endogène des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3. Tout d'abord nous avons cherché à comparer l'effet de la MGL et de la MGV sur l'enrichissement des tissus en AGPI. Pour cela des rats ont été nourris pendant 6 semaines après le sevrage à des régimes à 10% de lipides à base de MGV ou de MGL contenant 2,3% d'ALA et \pm 0,5% de DHA. Le statut en DHA des groupes MGL a augmenté dans les rétines mais pas dans le cerveau. Les teneurs en DHA sont restées inférieures aux groupes supplémentés directement en DHA (17,4% contre 19,1% pour le cerveau). Néanmoins, la proportion de DHA dans les tissus est plus élevée dans nos conditions par rapport aux autres études (entre 11 et 15% pour le cerveau) ; nous avons supposé que la voie de conversion endogène des AGPI n-3 est saturée dans nos conditions. La suite de nos études s'intéressera aux conditions nutritionnelles permettant de stimuler la voie de conversion des AGPI n-3 par la MGL. Un résultat intéressant a été l'augmentation de la proportion d'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5 n-3) avec un régime MGL. Le DPA est un AGPI intermédiaire du DHA peu étudié compte-tenu de sa faible disponibilité commerciale. Pour étudier les potentiels effets spécifiques associés à une augmentation du DPA sur le métabolisme lipidique, des rats ont été nourris pendant 3 semaines à partir du sevrage à base d'un régime à 10% de lipides contenant de la MGV à 2,3% d'ALA \pm 0,5% de DPA. Les profils d'acides gras ont été réalisés sur 20 tissus. Aucune différence n'a été observée sur les proportions d'AGPI du cerveau et de la rétine. Par contre, pour les rats supplémentés en DPA, les proportions de DPA ont été augmentées dans tous les autres tissus étudiés (cœur : 0,7% et 1,5%, globules rouges 1,9% et 2,6%, reins...). Les statuts en DHA et en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) ont par contre été augmentés dans certains organes spécifiques (rate, poumon, moelle osseuse). L'enrichissement ciblé de certains tissus en DPA, différents de ceux enrichis lors d'une supplémentation en DHA (rétines, cerveau...) présagent une action potentielle spécifique du DPA. De futures études s'intéresseront donc aux potentiels effets physiologiques spécifiques du DPA par rapport aux autres AGPI n-3.



Journée recherche Lactalis 2016

Impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation on n-3 fatty acid composition of tissues in rats.

Drouin G¹., Catheline D¹., Baudry C²., Le Ruyet P²., Legrand P¹.

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France

²Lactalis R&D, Retiers, France



Poster number : N-P-005

Introduction

The role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 PUFA) on lipid metabolism is well known. However, most research focuses on docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3). Few studies concern n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA, C22:5 n-3), which is not commercially available in sufficient amount for *in vivo* studies. This fatty acid (FA) is an intermediate between EPA and DHA in the n-3 PUFA conversion pathway from α -linolenic acid (ALA, C18:3 n-3). It could be of interest both for DPA ability to be converted to EPA or DHA, and for its potential specific physiological effects. To our knowledge, no study has been able to describe the specific enrichment of this FA in the tissues when it was supplemented *in vivo*. The objective of this study was therefore to examine the effect of DPA supplementation at a physiological dose on the PUFA composition of the main tissues in rats in order to guide future studies towards the search for physiological effects.

Methods

Sprague Dawley rats (n=8) were fed after weaning with a control diet (Ctrl) or a n-3 DPA-supplemented diet (0.5% n-3 DPA) containing a mix of plant oils during 3 weeks.

Lipids were extracted from 18 different frozen tissues (Delsal, 1944). FA were then derived into FA methyl esters whose composition was analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS).

Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by Student t-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; td $0,1 < p < 0,05$

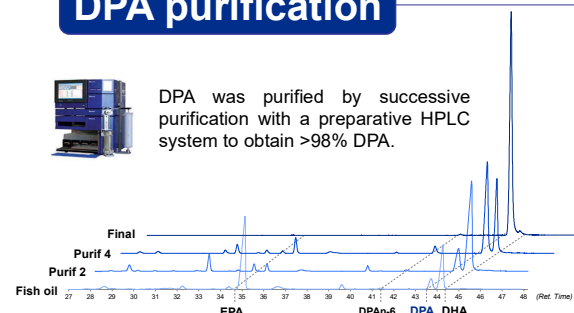
An Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA) was performed on reduced centered Log-Ratio of FA for all tissues to determine the most discriminant variables between diets. Cross Validation ANOVA was used to validate the model. Colored variables have a Variable Importance in the Prediction (VIP) > 1.

Diets : % FA	Ctrl	N-3 DPA
Saturated (14:0 to 22:0)	21.0	20.9
16:0 (palmitic acid)	17.2	17.1
Mono-unsaturated	65.3	65.0
18:1 n-9 (oleic acid)	63.3	63.0
Poly-unsaturated	13.7	13.6
18:2 n-6 (LA)	11.3	11.3
18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.3
LA/ALA ratio	4.9	4.9
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0	0.5

DPA purification



DPA was purified by successive purification with a preparative HPLC system to obtain >98% DPA.

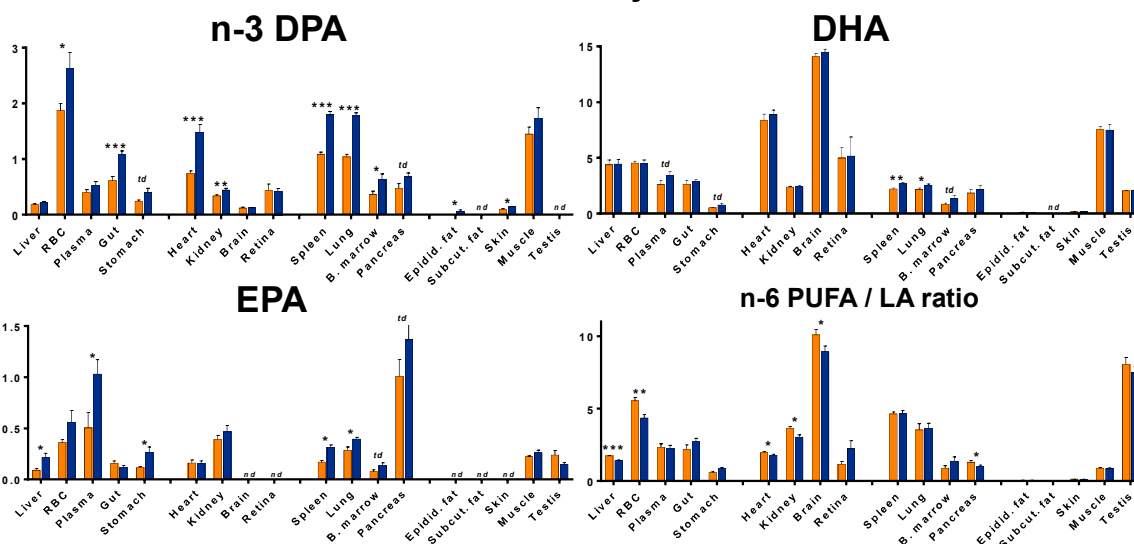


Results

Univariate analysis

% of total fatty acid

Ctrl DPA



n-3 DPA was increased in most tissues when diets were supplemented with this FA, and particularly heart, spleen, lung and bone marrow but not in liver, plasma, brain, retina and muscle.

DHA profile was not impacted by the DPA diet except in spleen, lung and bone marrow where it was increased.

EPA proportion was increased in some tissues like in the liver. This FA might come from the peroxisomal retroconversion of DPA into EPA.

The n-6 PUFA / LA ratio was decreased in some tissues and especially in the liver, suggesting a decrease in the n-6 PUFA conversion. This result could be due to a substrate competition between n-3 PUFA and n-6 PUFA for the different enzymes of the conversion pathway, since these enzymes are common for both families.

Multivariate analysis

All the rats of each diet are well separated on the score scatter plot. The loadings scatter plot shows the most discriminant FA levels between the 2 diets.

Heart, liver, lung, kidney, spleen then bone marrow and pancreas were the most impacted by the n-3 DPA supplementation.

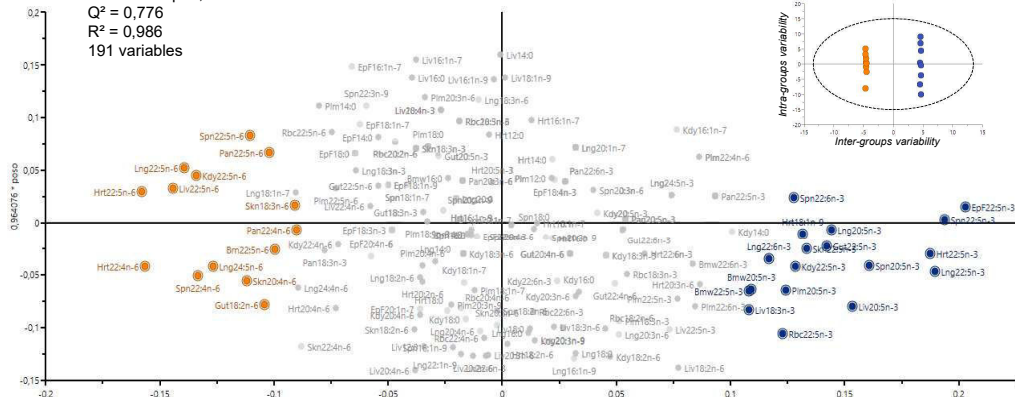
The changes in FA proportions concerned PUFA metabolism only; suggesting a specific action of n-3 DPA supplementation on these pathways.

Beyond an increase in all n-3 PUFA, the n-3 DPA supplementation induced principally a decrease in n-6 docosapentaenoic acid (22:5 n-6) and arachidonic acid (20:4 n-6).

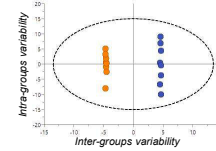
Model validation

CV ANOVA $p < 0,05$
 $Q^2 = 0,776$
 $R^2 = 0,986$
 191 variables

Loadings scatter



Score scatter



Bm : brain ; Ht : heart ; Kdy : kidney ; Liv : liver ; Lng : lung ; Skn : skin ; Spln : spleen ; Pan : pancreas ;

Mus : muscle ; Ret : retina ; Stc : stomach ;

ScF : subcutaneous fat ; Tes : testis ;

Bmw : bone marrow ; EpF : epidid. fat ; Hrt : heart ; Kdy : kidney ; Liv : liver ; Lng : lung ; Plm : plasma ; Rbc : red blood cells ; Skn : skin ; Spln : spleen ;

Conclusion and perspectives

After only 3 weeks of physiological n-3 DPA supplementation, the omega-3 status was improved in most tissues. The impact of n-3 DPA diet was tissue-dependent. It specifically affected heart, lung, spleen, kidney and bone marrow and was specific of PUFA metabolism. These results suggest potential physiological effects specific of DPA metabolism in these organs compared to the EPA and DHA, whose assimilation was less specific from our findings.

Furthermore, some studies have shown an increase in n-3 DPA in red blood cells and in some tissues when the diet is partially enriched with dairy lipids compared to diet composed of vegetable oils (Dinel & al., 2016, PLEFA) (Du & al., 2013, PLEFA). It would be interesting to investigate whether the potential physiological effects associated with n-3 DPA supplementation would be found with a diet partially enriched with dairy lipids.

Impact of docosapentaenoic acid n-3 (DPA) supplementation on n-3 fatty acid composition of tissues in rats

Gaetan Drouin*¹, Daniel Catheline¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Frédérique Pédrone¹, Philippe Legrand¹

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, INRA-Agrocampus Ouest, Rennes, France

²Nutrition Department, Lactalis R&D, Retiers, France

Objectives and study : The role of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) n-3 on lipid metabolism is well known. However, most research focuses on docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3). Few studies concern docosapentaenoic acid n-3 (DPA n-3, C22:5 n-3), which is not commercially available in sufficient amount for *in vivo* studies. This fatty acid is an intermediate between EPA and DHA in the n-3 PUFA conversion pathway from α -linolenic acid (ALA, C18:3 n-3). It could be of interest both for DPA ability to be converted to EPA or DHA, mostly in the liver; and for its potential specific physiological effects. To our knowledge, no studies have been able to observe globally the specific enrichment of this fatty acid in the tissues when it was supplemented *in vivo*.

The objective of this study is therefore to examine the effect of DPA supplementation at a physiological dose on the PUFA composition of the main tissues in rats in order to guide future studies towards the search for physiological effects.

Methods: DPA was purified by preparative liquid chromatography. Two groups of Sprague Dawley male rats (n= 8 / group) were fed for 3 weeks from weaning with a 10% weight lipid diet supplemented or not with 0.5% DPA of total fatty acids (TFA) and containing ALA (2.3% of TFA, ratio n-6/n-3= 5). The TFA composition of 20 tissues was investigated by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. The two groups were compared by Student's t-test ($p < 0.05$).

Results: When supplemented, the proportion of DPA is significantly increased in the heart (x2.1), lung (x1.8), spleen (x1.6), bone marrow (x1.5) and kidney (X1.3). Its proportion tends to increase in the red blood cells (x1.4) and the pancreas (x1.2) but remains stable in the liver, plasma, brain and retina that are known to be impacted with diets supplemented with EPA or with DHA. DHA status was significantly increased in the spleen (x1.2), lung (x1.2) and tends to increase in the bone marrow (x1.6). DPA supplementation would therefore increase the conversion to DHA. The proportions of EPA were significantly increased in the liver (x2.0), plasma (x2.0), spleen (x1.5), lung (x1.3) and bone marrow (x1.1). This would confirm direct or indirect retroconversion through DHA from DPA to EPA.

Concerning the n-6 series PUFAs in competition with the enzymes of the n-3 conversion pathway, the proportions of DPA n-6 (C22:5 n-6) and arachidonic acid (C20:4 n- 6) decreased in some tissues specifically (red blood cells, heart, kidney, spleen, lung).

Conclusion: DPA supplementation at 0.5% of TFA results in enrichment of n-3 PUFA and depletion of n-6 PUFAs targeted in some tissues. This suggests a potential and specific action of this fatty acid. Future studies are now scheduled to determine the potential physiological effects of DPA in these organs as compared to DHA and EPA.



European Society for Paediatric
Gastroenterology Hepatology and Nutrition
2017 (ESPGHAN)

Dairy lipids enrichment increased Omega-3 (n-3) status in post-weaning rats. Effect of n-3 DPA supplementation.

Journée recherche 2017

Drouin G¹., Catheline D¹., Baudry C²., Le Ruyet P²., Legrand P¹.



contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France
²Lactalis R&D, Retiers, France



Introduction

1) In most infant formulas, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VL). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in α -linolenic acid (ALA) were superior VL blends for increasing DHA accretion in brain. However these results were observed in specific conditions: In post-weaning rats after depletion of Omega-3 FA during gestation and lactation (Delplanque & al., PLEFA, 2012); in mice, when the LA/ALA ratio was lower in the DL group (2.3% ALA, LA/ALA ratio=5) as compared to the VL group (1.3% ALA, LA/ALA ratio=10) during gestation and lactation (Dinel & al., PLEFA, 2016).

2) In both studies, n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA, C22:5 n-3), was increased in red blood cells. Few studies concern n-3 DPA, which is not commercially available for *in vivo* studies. This FA is an intermediate between EPA and DHA in the Omega-3 PUFA conversion pathway from ALA. It could be of interest both for DPA ability to be converted to DHA, and for its potential specific physiological effects. To our knowledge, no study has been able to describe the specific enrichment of this FA in the tissues when it was supplemented *in vivo*.

Methods

Sprague Dawley rats (n=8) were fed after weaning during 6 weeks with a diet containing a mix of plant oils (VL) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) \pm 0.5% DHA (study 1) or with DL \pm 1.0% EPA, DPA or DHA (study 2).

Lipids were extracted from different frozen tissues (Delsal, 1944). FA were then derived into FA methyl esters whose composition was analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS). Plasmatic parameters were measured by commercial kit.

Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by ANOVA 2 factors (* indicate a global difference; * p<0,05; *** p<0,001) or by Tukey *post-hoc* test (different letters indicate a significative difference).

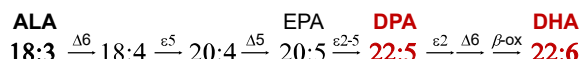
Diets : % FA	DL	VL
Saturated	37.5	21.0
16:0	17.1	17.2
Mono-unsaturated	47.4	65.3
18:1 n-9	42.7	63.3
Poly-unsaturated	14.2	13.7
18:2 n-6 (LA)	11.5	11.3
18:3 n-3 (ALA)	2.4	2.3
LA/ALA ratio	5.0	4.9
DHA	\pm 0.5	\pm 0.5

OR
EPA DPA DHA \pm 1.0

Objectives

- To evaluate the DL effect on Omega-3 metabolism post-weaning with an equal 2,3% ALA and LA/ALA ratio of 5.
- To study the potential impact of n-3 DPA supplementation on physiology and on n-3 conversion pathway.

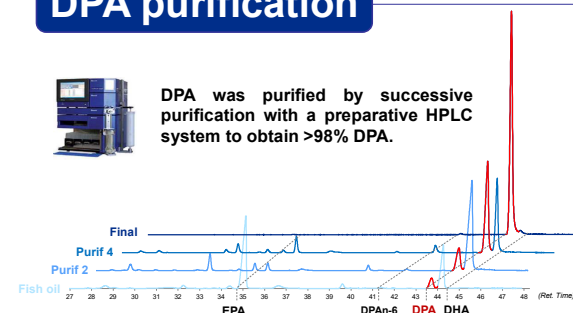
Omega-3 conversion pathway



DPA purification



DPA was purified by successive purification with a preparative HPLC system to obtain >98% DPA.



Results

Study 1 : Impact of dairy lipids on Omega-3 status

VL Vegetables fat

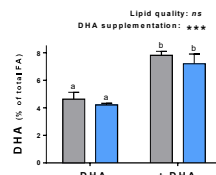
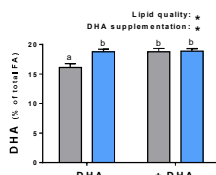
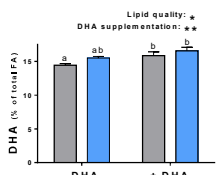
DL 50% Dairy fat

Brain

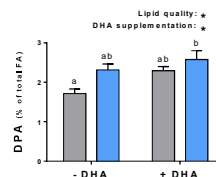
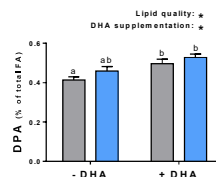
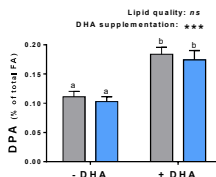
Retina

Red blood cells

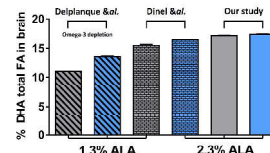
DHA



DPA



Comparison of 3 studies VL vs DL



In brain and retina, rats fed DL accumulated more DHA than VL group, but DHA proportion did not change in red blood cells. The DHA status was higher when diets were supplemented with DHA.

In red blood cells and retina, DPA was more abundant in rats fed DL as compared to VL. The DPA status was higher when diets were supplemented with DHA.

In comparison with the previous studies, in our conditions (with ALA 2.3%, ratio LA/ALA=5 and post-weaning) the accretion of DHA in brain might start to be saturated.

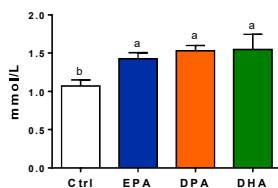
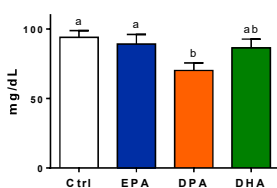
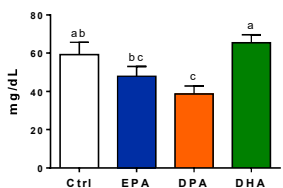
Study 2 : Impact of n-3 DPA supplementation

Plasmatic parameters

Triglycerides

Total cholesterol

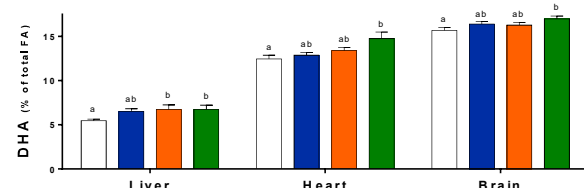
Total antioxidant status



Compared to control group, only DPA supplementation decreased both triglycerides and total cholesterol in plasma. Rats fed DPA had an increased in the plasmatic concentration of antioxidants in plasma similarly as rats fed EPA or DHA.

DHA status

Ctrl EPA DPA DHA



DPA supplementation increased the DHA proportion in liver, heart and brain at the same level than rats fed DHA, but not in heart and brain compare to control group.

Conclusion and perspectives

1) DL improved the DHA status in retina and in brain, increased DPA in red blood cells and retina when rats were fed after weaning with an equal 2.3 % ALA and a LA/ALA ratio of 5. Future study will determine if the beneficial effect of DL reported in Delplanque's and Dinel's works stems from a gestation-lactation effect or a difference in the ratio.

2) DPA supplementation decreased specifically triglycerides and total cholesterol in plasma and the oxidative stress like EPA and DHA supplementation. It could increase DHA status in some organs but tends to act more than EPA supplementation. Future analysis will determine its action on inflammatory parameters and its specific active hydroxylated metabolites.

Impact de la matière grasse laitière et du DPA n-3 dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés.

Contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹
¹ : Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest ; ² : Lactalis R&D

L'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3 (Oméga-3)) est le dérivé terminal de la voie de conversion des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI) à partir de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3). Il est indispensable au bon développement neurocognitif et visuel chez l'enfant. Alors que dans la plupart des formules infantiles, les lipides sont apportés par un mélange de matières grasses végétales (MGV), certaines études ont montré qu'une réintroduction partielle de matière grasse laitière (MGL) pourrait être bénéfique pour stimuler la voie de conversion des AGPI n-3, ces matières premières ne contenant pas de DHA. L'enrichissement en MGL augmenterait le statut en DHA dans le cerveau et les rétines sous certaines conditions, ainsi que le l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22 :5 n-3) dans le cœur et les globules rouges. Le DPA est un intermédiaire dans la voie de conversion des AGPI n-3 dont les effets sont peu connus à cause de sa faible disponibilité commerciale.

Tout d'abord nous avons cherché à comparer l'effet de la MGL et de la MGV sur l'enrichissement des tissus en AGPI chez des rats nourris pendant 6 semaines après le sevrage avec des régimes contenant la même quantité d'ALA (2,3%) et un même ratio oméga-6 / oméga-3= 5.

Dans une deuxième étude, nous avons cherché à savoir si l'enrichissement en DHA dans le cerveau avec la MGL se retrouve à tous les stades (gestation, lactation, adulte), pour les deux sexes, même si les quantités d'ALA dans les régimes sont différentes. 3 groupes de rats ont donc été nourris à partir de la gestation jusqu'à l'âge adulte avec des régimes contenant soit de la MGL (ratio= 5, 2,3% d'ALA), soit de la MGV (ratio= 5, 2,3% d'ALA), soit de la MGV (ratio= 10, 1,3% d'ALA) (analyses en cours).

Ensuite, après purification au laboratoire du DPA, nous avons étudié chez le rat l'effet d'une supplémentation de 1% en AGPI dans le régime pendant 6 semaines avec soit de l'EPA, du DPA ou Du DHA. Nous nous sommes intéressés à l'impact du DPA sur le métabolisme lipidique, l'enrichissement en acides gras des tissus et les potentiels effets physiologiques spécifiques du DPA par rapport aux autres AGPI n-3 (résultats en cours).

Une autre étude comparera les effets d'une supplémentation de 0,5% en DPA avec une matrice MGV et MGL pendant 3 ou 6 semaines sur la composition en acides gras des tissus et les paramètres lipidiques (analyses en cours).

Ensuite, après purification au laboratoire du DPA, nous avons étudié chez le rat l'effet d'une supplémentation de 1% en AGPI dans le régime pendant 6 semaines avec soit de l'EPA, du DPA ou Du DHA.

Dairy lipids enrichment increased Omega-3 status in post-weaning rats.



Drouin G¹, Catheline D¹, Sence O¹, Devillechabrolle C¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹.

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France

²Lactalis R&D, Retiers, France



Introduction

In most infant formulas, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VL). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in α -linolenic acid (ALA) were superior VL blends for increasing DHA accretion in brain. However these results were observed in specific conditions: In post-weaning rats after depletion of Omega-3 FA during gestation and lactation (Delplanque et al., PLEFA, 2012); in mice, when the LA/ALA ratio was lower in the DL group (2.3% ALA, LA/ALA ratio=5) as compared to the VL group (1.3% ALA, LA/ALA ratio=10) during gestation and lactation (Dinel et al., PLEFA, 2016).

Our purpose is to evaluate the DL effect on Omega-3 metabolism post-weaning with an equal 2,3% ALA and LA/ALA ratio of 5.

Methods

Design : Sprague Dawley rats were fed after weaning during 6 weeks with a diet containing a mix of plant oils (VL) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) supplemented (n=8) or not (n=24) with 0.5% DHA.

Methods : Lipids were extracted from different tissues (Desfat, 1944). FA were then derived into FA methyl esters whose composition was analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS). Plasmatic parameters were measured by commercial kit. Delta-6 desaturase in liver was studied by enzymatic activity in post-mitochondrial supernatant using ¹⁴C18:3 n-3 (ALA) as substrate; and mRNA expression by RT-qPCR using Taqman® technology.

Analysis : Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by ANOVA 2 factors (* indicate a global difference; * p<0,05; *** p<0,001). ANOVA is followed by a Tukey post-hoc test (different letters indicate a significative difference).

Diets : % FA	VL	DL
Saturated	21.0	37.5
16:0	17.2	17.1
Mono-unsaturated	65.3	47.4
18:1 n-9	63.3	42.7
Poly-unsaturated	13.7	14.2
18:2 n-6 (LA)	11.3	11.5
18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.4
LA/ALA ratio	4.9	5.0
DHA	± 0.5	± 0.5

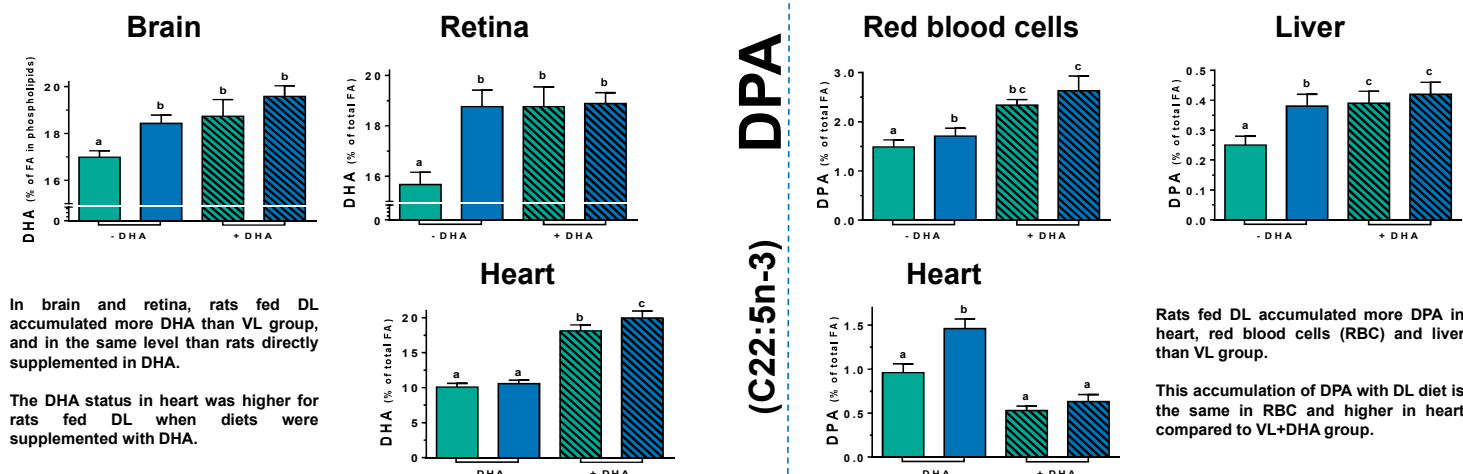
Results

DL increased Omega-3 status in brain, retina, heart, liver and RBC

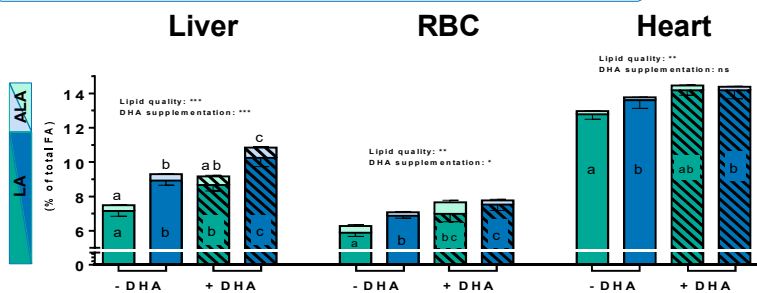
VL Vegetables fat **DL** 50% Dairy fat

DHA (C22:6n-3)

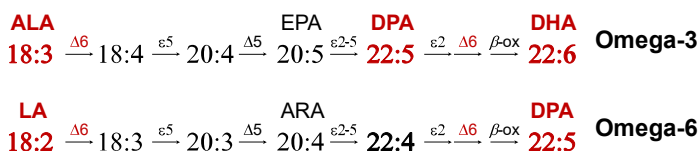
DPA (C22:5n-3)



DL prevented PUFA precursors from β -oxydation



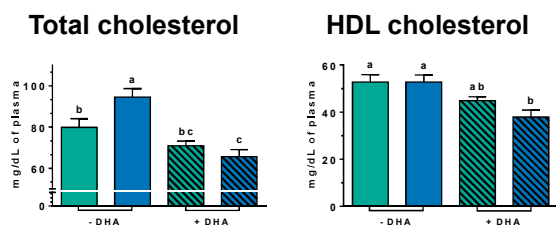
PUFA conversion pathway



Rats fed DL accumulated more PUFA precursors ALA and LA in liver than VL group. No effect was detected on the delta-6 desaturase activity and expression in liver, which is known as the major lipids metabolic organ.

The increase of Omega-3 in peripheral tissues could be due to the presence of short-chain FA in DL diets which prevent PUFA precursors from mitochondrial β -oxydation in liver.

DL increased cholesterolemia



Rats fed DL increased total cholesterol concentration in plasma. The direct DHA supplementation decreased this concentration.

Our DL diet contained 0.33mg of cholesterol /100g of lipids

Conclusion

When rats were fed after weaning with an equal 2,3 % ALA and a LA/ALA ratio of 5 :

- A partial enrichment in dairy lipids improved the DHA status in brain and in retina at the same level than rats directly supplemented in DHA.
- Rats fed DL diets increased DPA in red blood cells, heart and liver compare to rats fed VL diets.
- This increase of Omega-3 status could be due to a prevention from β -oxydation of PUFA precursors in liver by DL diet.

Dairy lipids enrichment increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Gaetan Drouin¹, Daniel Catheline¹, Charlotte Baudry², Pascale Le Ruyet², Philippe Legrand¹

1Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus Ouest, Rennes, France, 2Lactalis R&D, Retiers, France

Introduction: Docosahexaenoic acid n-3 (DHA) status is essential for neurocognitive and visual development. In most infant formula, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VL). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Oméga-3 Fatty Acid (FA) precursor α -linolenic acid (ALA) into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in ALA were superior to n-3 FA-enriched VL blends for increasing brain DHA accretion in specific conditions.

Aim: Our purpose is to evaluate the DL effect on Oméga-3 metabolism during post-weaning with an equal 2.3% ALA and Omega-6/ Oméga-3 ratio of 5.

Methods: Sprague Dawley rats (n=32) were fed after weaning with a diet containing a mix of VL or a mix of VL and DL during 6 weeks \pm 0.5% DHA. Diets lipid composition followed infant formula composition. FA composition in tissues were analyzed by GCMS. Desaturases activities were measured in post-mitochondrial supernatant and estimated by FA ratio, Western Blot and PCR. Cholesterol and triglycerides were analyzed in plasma. Results were compared by ANOVA 2 factors followed by Duncan's test and PLS-DA.

Results: DL improved the DHA status in brain and retina phospholipids; and decreased the n-6 polyunsaturated FA proportion. Introduction of DL increased the docosapentaenoic acid n-3 (DPA) proportion in heart and red blood cells; enhanced the proportion of ALA precursor in the liver. DL increased triglycerides and cholesterol levels in plasma. In any case the DL effect is less important than the DHA direct supplementation effect. No effect was detected on the delta-6 desaturase activity and expression.

Conclusion: DL positively impact the DHA status in retina and brain, DPA status in red blood cells and heart, ALA status in the liver with an equal 2.3% ALA and Omega-6/Oméga-3 ratio of 5 in post-weaning rats.



International Dairy Federation 2017

Dairy lipids increase Omega-3 status. Impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation.

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Lucas M.¹, Guéret P.³, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹
 contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

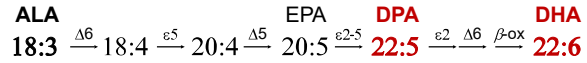
¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France
²Lactalis R&D, Retiers, France ; ³Hémostase, CHU Ponchaillou, Rennes, France



Introduction

In most infant formulas, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VO). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives like DHA or DPA. Few studies concern DPA, which is not available for *in vivo* studies. It could be of interest both for DPA ability to be converted to DHA, and for its potential specific physiological effects. Our aim are to evaluate the DL effect on Omega-3 metabolism post-weaning and to study the potential impact of n-3 DPA supplementation on physiology and on n-3 conversion pathway.

Omega-3 conversion pathway



Methods

Study 1 – Impact of DL on the Omega-3 metabolism :

Rats were fed during 6 weeks with a diet containing a mix of vegetables oils (VO) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) supplemented (n=8) or not (n=24) with 0.5% DHA

Study 2 - Whole body FA impact and DPA assimilation of DPA supplementation:

Rats were fed during 3 weeks with a VL diet supplemented or not with 0.5% DPA

Study 3 - Physiological effects and DHA conversion of DPA supplementation:

Rats were fed during 6 weeks with a DL diet supplemented or not with 1.0% EPA, DPA or DHA.

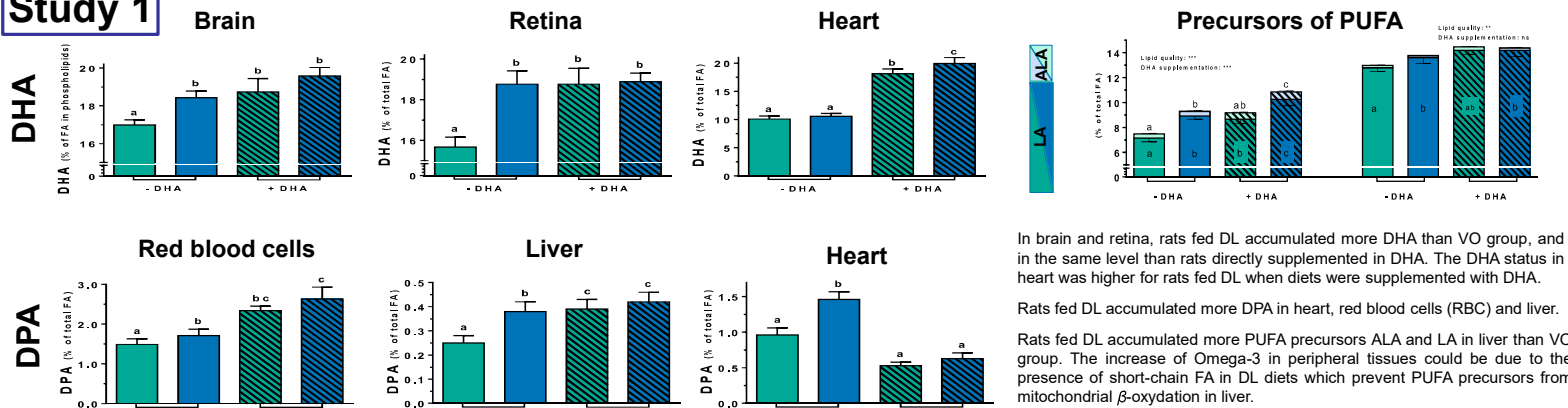
FA compositions were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS). Biochemical assays were realized with commercial kit. Results were expressed as mean ± SEM. Significance between groups was evaluated by mixed linear model (study1), Student t-test and OPLS-DA (Study2), ANOVA followed by Duncan test (study 3). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; td 0.1<p<0.05



Diets : % FA	VO	DL
Saturated	21.0	37.5
16:0	17.2	17.1
Mono-unsaturated	65.3	47.4
18:1 n-9	63.3	42.7
Poly-unsaturated	13.7	14.2
18:2 n-6 (LA)	11.3	11.5
18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.4
LA/ALA ratio	4.9	5.0
Study 1 : DHA	± 0.5	± 0.5
Study 2 : DPA	± 0.5	
Study 3 EPA		± 1.0
Study 3 DPA		
Study 3 DHA		

Results

Study 1

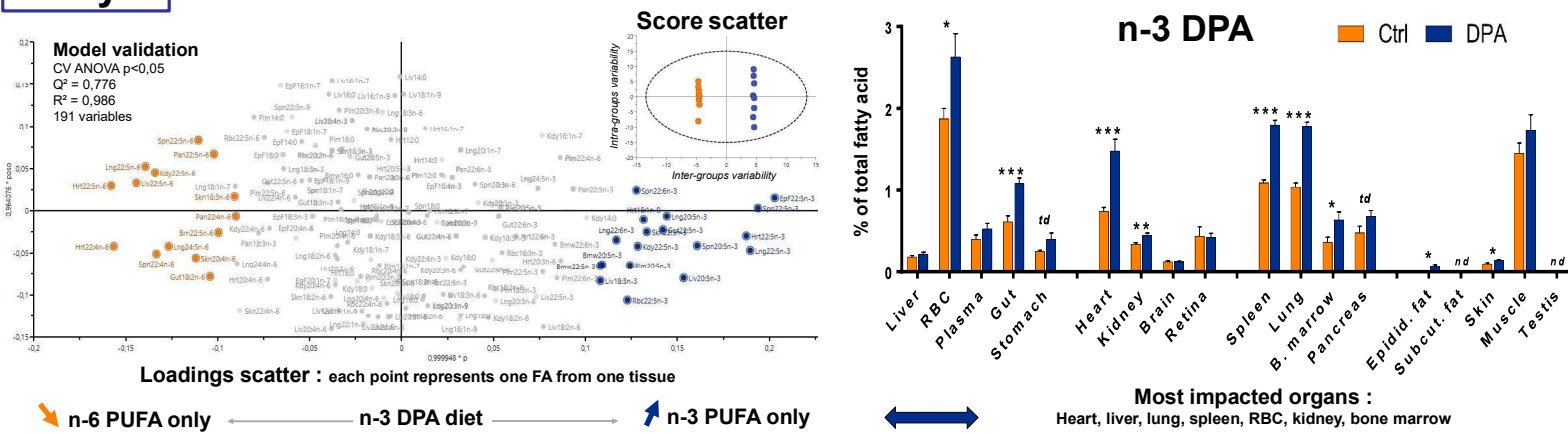


In brain and retina, rats fed DL accumulated more DHA than VO group, and in the same level than rats directly supplemented in DHA. The DHA status in heart was higher for rats fed DL when diets were supplemented with DHA.

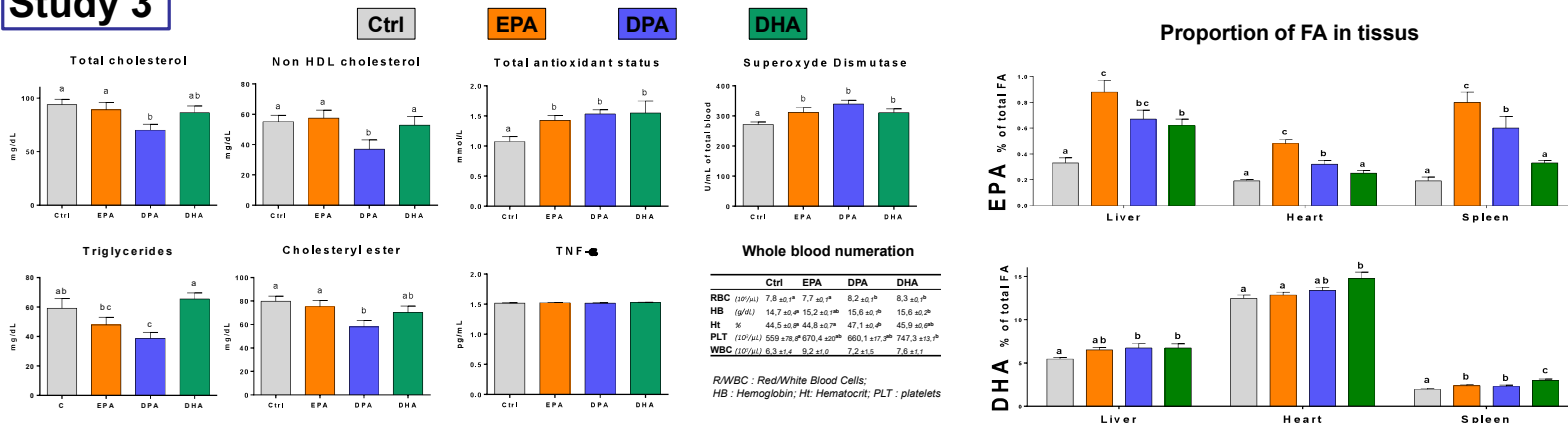
Rats fed DL accumulated more DPA in heart, red blood cells (RBC) and liver.

Rats fed DL accumulated more PUFA precursors ALA and LA in liver than VO group. The increase of Omega-3 in peripheral tissues could be due to the presence of short-chain FA in DL diets which prevent PUFA precursors from mitochondrial β-oxidation in liver.

Study 2



Study 3



Conclusion and perspectives

A partial enrichment in dairy lipids improved the DHA status in brain and in retina at the same level than rats directly supplemented in DHA. Rats fed DL diets increased DPA in red blood cells, heart and liver compare to rats fed VO diets. DPA supplementation decreased specifically triglycerides and total cholesterol in plasma, and the oxidative stress, like EPA and DHA supplementation. DPA was increased in some specific tissues and its supplementation could increase DHA status in some organs. Future analysis will determine its action on inflammatory parameters and its specific active hydroxylated metabolites.

Les lipides laitiers augmentent le statut en Oméga-3. Impact d'une supplémentation en acide docosapentanoïque n-3 (DPA).

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Lucas M.¹, Guéret P.³, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹

¹ : Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest ; ² : Lactalis R&D ³ : Laboratoire d'hématologie, CHU Ponchaillou

Introduction et but de l'étude

L'objectif de cette étude est d'examiner l'effet d'un enrichissement partiel en lipides laitiers ou d'une supplémentation en DPA n-3 à une dose physiologique sur la conversion potentielle en DHA, la composition en AGPI des principaux tissus et les effets physiologiques généraux chez le rat.

Matériel et méthodes

Des rats Sprague Dawley ont été nourris à partir du sevrage pendant 3 ou 6 semaines avec des régimes dont la base lipidique est composée d'un mélange d'huiles végétales partiellement enrichi (MGL) ou non (MGV) en lipides laitiers (50%) et supplémentés ou non en DPA, EPA ou DHA (0,5% ou 1%). Des compositions tissulaires en acides gras par GCMS et des dosages plasmatiques ont été réalisés.

Résultats

Par rapport au lot MGV, l'introduction partielle de MGL augmente la proportion de DHA dans les phospholipides du cerveau, dans les AGT des rétines et du cœur parfois au même niveau que les lots supplémentés directement en DHA. La MGL entraîne aussi une augmentation du DPA n-3 dans le foie, les globules rouges et le cœur. Cette augmentation de la voie de conversion proviendrait d'une économie de substrat associée à la présence d'acides gras courts dans la MGL.

La supplémentation avec 0,5% de DPA impacte des organes spécifiques en augmentant la proportion de DPA spécifiquement dans certains tissus et en agissant uniquement sur le métabolisme des acides gras polyinsaturés Oméga-3 et Omega-6.

Par rapport à des lots supplémentés avec 1% d'EPA et de DHA, seule la supplémentation avec 1% de DPA réduit la cholestérolémie et la triglycéridémie. Le lot DPA réduit le stress oxydatif et augmente les proportions de DHA et d'EPA de manière équivalente ou inférieure aux supplémentations directes en EPA et DHA.



NAMS 2017

Prix du meilleur poster

Effets métaboliques et physiologiques associés à une supplémentation en DPA n-3 chez le rat en post sevrage. Impact de la matière grasse laitière.



Drouin G.¹, Catheline D.¹, Sence O.¹, Guéret P.³, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹



contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

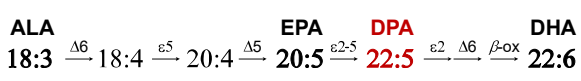
¹Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine- Agrocampus Ouest, Rennes
²Lactalis R&D, Retiers; ³Hémostase, CHU Ponchaillo, Rennes

Introduction

L'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) est un acide gras (AG) intermédiaire dans la voie de conversion des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI), du précurseur ALA jusqu'au DHA. Peu d'études concernent cet acide gras qui est peu disponible commercialement pour des études *in vivo*, et difficilement purifiable. Cet AG pourrait être intéressant tant pour sa capacité à se convertir en DHA ou en EPA que pour ses effets physiologiques potentiels. Certaines matrices lipidiques comme la matière grasse laitière (MGL) pourraient augmenter les proportions de DPA dans les tissus, laissant présager des effets physiologiques potentiels associés.

Notre objectif est d'évaluer l'impact métabolique et physiologique d'une supplémentation en DPA (Etude 1), après purification du DPA (Etude 3) et d'évaluer l'effet de la MGL sur l'enrichissement en AGPI n-3 dans les tissus (Etude 2).

Voie de conversion des AGPI n-3



Matériels et méthodes

Etude 1 – Effets physiologiques et enrichissement en DHA et en EPA après une supplémentation en DPA :
 Des rats (n=32) sont nourris pendant 6 semaines avec des régimes à bases de MGL supplémentés ou non avec 1,0% d'EPA, de DPA ou de DHA.

Etude 2 – Impact de la MGL sur le métabolisme des AGPI n-3 :
 Des rats (n=48) sont nourris pendant 6 semaines après le sevrage avec des régimes à base de MGL ou de MG végétale (MGV) supplémentés ou non avec 0,5% de DHA.

Etude 3 – Méthode novatrice de purification à grande échelle de DPA à haute pureté par chromatographie liquide.

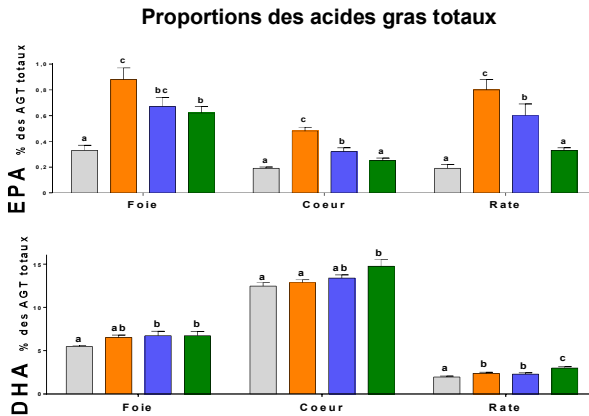
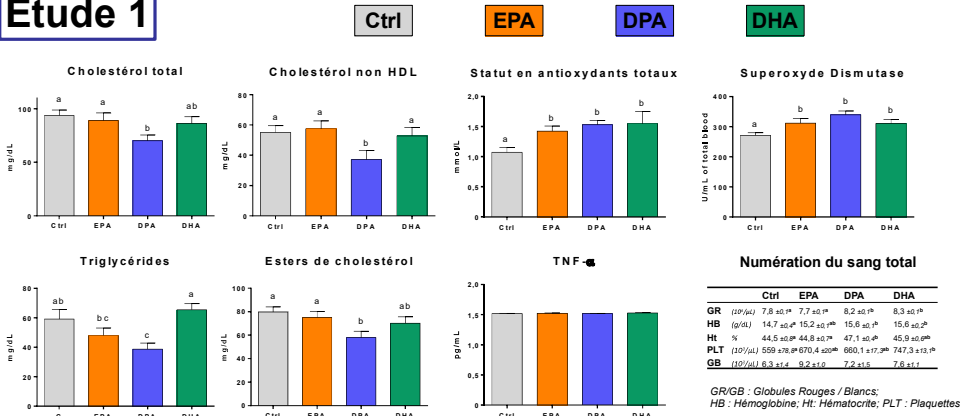
Les compositions en AG des tissus ont été réalisées par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les dosages biochimiques ont été réalisés à l'aide de kit commerciaux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. La significativité entre les groupes est évalué par ANOVA suivi d'un test de Duncan (Etude 1) ou par modèle linéaire mixte suivi d'un test de Tukey-Kramer. Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).



Régimes: % AG	MGV	MGL
Saturés	21,0	37,5
16:0 (palmitate)	17,2	17,1
Mono-insaturés	65,3	47,4
18:1 n-9 (oléate)	63,3	42,7
Poly-insaturés	13,7	14,2
18:2 n-6 (ALA)	11,3	11,5
18:3 n-3 (ALA)	2,3	2,4
Ratio LA/ALA	4,9	5,0
Etude 1 EPA DPA DHA	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
Etude 2 : DHA	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$

Résultats

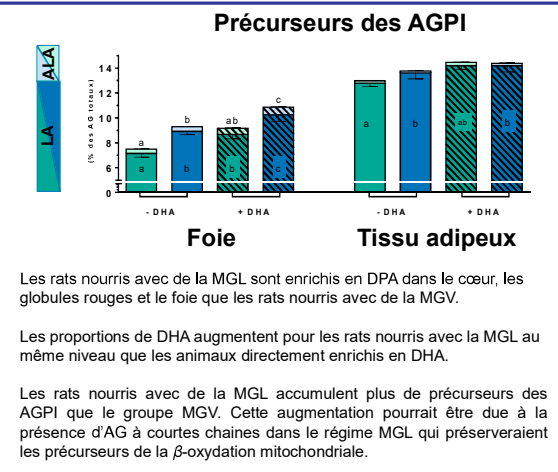
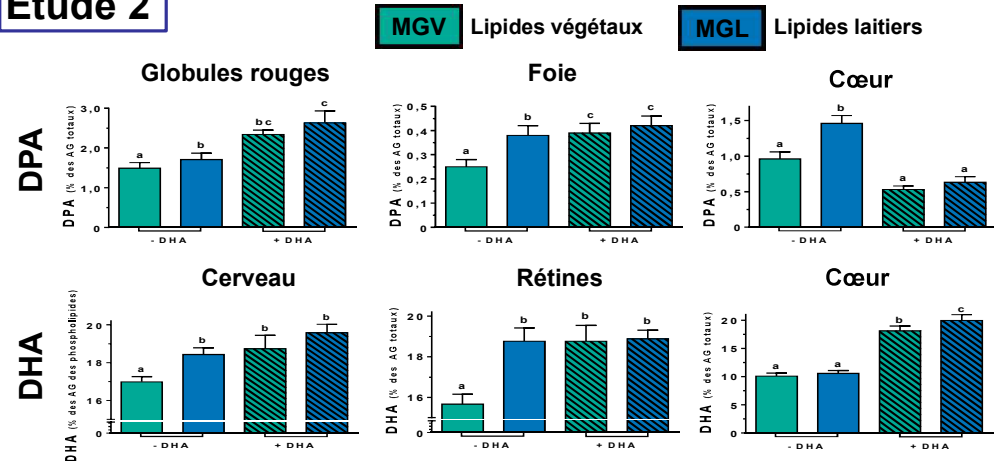
Etude 1



Les rats supplémentés en DPA sont les seuls à diminuer leur cholestérolémie et leur triglycéridémie par rapport aux rats contrôle. Le part de cholestérol non HDL est impactée par la supplémentation en DPA. Tous les groupes supplémentés en AGPI n-3 améliorent leur statut antioxydant. Nous travaillons sur des animaux sains, d'où aucun effet des suppléments sur l'inflammation.

La supplémentation en DPA entraîne un enrichissement en EPA et en DHA dans la plupart des tissus étudiés, le plus souvent intermédiaire par rapport à la supplémentation directe en l'acide gras (EPA ou DHA).

Etude 2



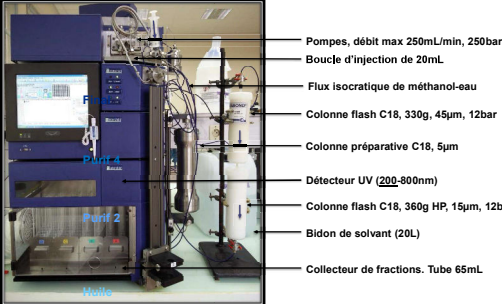
Les rats nourris avec de la MGL sont enrichis en DPA dans le cœur, les globules rouges et le foie que les rats nourris avec de la MGV.

Les proportions de DHA augmentent pour les rats nourris avec la MGL au même niveau que les animaux directement enrichis en DHA.

Les rats nourris avec de la MGL accumulent plus de précurseurs des AGPI que le groupe MGV. Cette augmentation pourrait être due à la présence d'AG à courtes chaînes dans le régime MGL qui préserveraient les précurseurs de la β -oxydation mitochondriale.

Etude 3

Chromatographie préparative



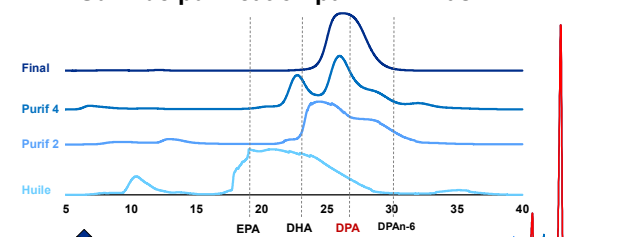
Sources alimentaires de DPA

Acides gras (%)	4020EE	DHA70 EE	Requin	Foie de bœuf
<C20	18,33	13,40	83,63	91,08
C20:5 n-3	44,97	4,07	4,53	1,36
C21:5 n-3	2,03	0,22	0,09	
C22:5 n-6	0,54	4,05	0,24	0,37
C24:1 n-9	0,53	2,04	2,86	
C22:5 n-3	6,64	5,15	1,46	4,46
C22:6 n-3	23,81	69,05	5,82	0,67

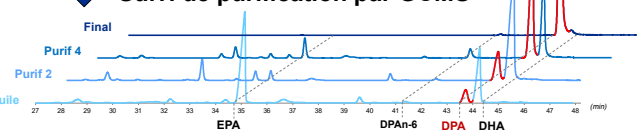
Les ester éthyliques (EE) d'AG peuvent être consommés.

Nous avons purifié des AGPI n-3 à 99% de pureté, de quelques dizaines (DPA) à plusieurs centaines de grammes (EPA, DHA). Nous pouvons donc produire des quantités d'AG compatibles avec la réalisation d'expérimentation *in vivo*. La méthodologie est applicable à d'autres types d'acides gras.

Suivi de purification par HPLC flash



Suivi de purification par GCMS



Effets métaboliques et physiologiques associés à une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPAn-3) chez le rat.

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹

¹ : Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest ; ² : Lactalis R&D

Introduction et but de l'étude : Le rôle des Acides Gras Polyinsaturés n-3 (AGPI) sur le métabolisme lipidique est bien connu. Néanmoins, la plupart des recherches sont axées sur l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3). Peu d'études concernent le DPA n-3 (C22:5n-3), peu disponible commercialement. Cet acide gras est un dérivé intermédiaire entre l'EPA et le DHA dans la voie de conversion des AGPI n-3 à partir de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3n-3). Le DPAn-3 pourrait être intéressant tant pour sa capacité à se convertir en DHA que pour ses effets physiologiques spécifiques potentiels. A notre connaissance, il n'existe aucune étude nutritionnelle de supplémentation *in vivo* en DPA n-3, et nous ne savons pas si la supplémentation en DPA n-3 permettrait un enrichissement en DHA. L'objectif de cette étude est d'observer les effets d'une supplémentation comparative en DPA n-3, EPA et en DHA sur la physiologie générale et le métabolisme lipidique.

Matériels et méthodes : Le DPAn-3, l'EPA et le DHA ont été purifiés par HPLC préparative sur colonne flash (>99%) à partir d'huiles de poissons commerciales. 4 lots de rats mâles Sprague Dawley (n=8/lot, 32 rats) ont été nourris pendant 3 ou 6 semaines à partir du sevrage avec un régime à 10% de lipides en masse supplémenté ou non avec de l'EPA, du DPA ou du DHA à hauteur de 1% des acides gras totaux (AGT) et contenant de l'ALA (2,3% des AGT, ratio n-6/n-3 de 5). Les dosages plasmatiques ont été réalisés à l'aide de kit commerciaux (cholestérol total, libre, HDL, triglycérides, cytokines inflammatoires, marqueurs du stress oxydatif, glycémie, créatinine, ALAT, ASAT) et par cytométrie de flux (numération formulation sanguine). La composition en AGT de 10 tissus a été étudiée par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les lots ont été comparés par ANOVA suivi d'un test *post-hoc* de Duncan ($p<0,05$).

Résultats et analyse statistique : Le DPAn-3 diminue le cholestérol total et les esters de cholestérol plus fortement que l'EPA, il diminue le cholestérol non HDL et la triglycéridémie plus fortement que le DHA. Le DPAn-3 est le seul à augmenter l'activité d'ASAT et le ratio ASAT/ALAT par rapport au contrôle. L'hématocrite et la concentration de globules rouges sont augmentées au même niveau que le lot DHA. Le statut en antioxydant totaux est augmenté similairement avec les 3 acides gras. Les autres mesures n'ont pas montré de différences significatives avec le contrôle.

Le DPAn-3 augmente la proportion de DHA dans le foie au même niveau que la supplémentation en DHA mais pas dans les autres organes pour lesquels l'enrichissement en DHA est plus important avec une supplémentation directe. L'apport de DPA augmente la proportion de DPA dans tous les tissus de façon plus importante que l'apport en DHA mais de façon similaire que l'apport en EPA. Cela renforce l'hypothèse d'une faible activité de conversion entre le DPAn-3 et le DHA tandis qu'apparaît une rétroconversion du DPAn-3 en EPA.

Conclusion : Une supplémentation nutritionnelle en DPA affecte spécifiquement le bilan lipidique par rapport aux autres Oméga-3. Dans nos conditions, la supplémentation en DPA ne permet pas d'augmenter l'enrichissement en DHA des tissus mais enrichit les tissus de manière similaire à une supplémentation en EPA.



Journée Francophones de Nutrition 2017

Une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPA) impacte spécifiquement la composition tissulaire en acides gras chez le rat.

Poster N° P137



Drouin G¹, Catheline D¹, Baudry C², Le Ruyet P², Legrand P¹

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine - Agrocampus Ouest, Rennes

²Lactalis R&D, Retiers



Introduction

Le rôle des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) sur le métabolisme des lipides est bien connu. Cependant, la plupart des recherches portent sur l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3). Peu d'études portent sur l'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA n-3, C22:5 n-3), qui n'est pas commercialement disponible en quantité suffisante pour des études *in vivo*. Cet acide gras (AG) est un intermédiaire entre l'EPA et le DHA dans la voie de conversion des AGPI n-3 à partir de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3). Le DPA pourrait être intéressant à la fois pour sa capacité à être converti en EPA ou DHA, et pour ses effets physiologiques spécifiques. À notre connaissance, aucune étude n'a été en mesure de décrire l'enrichissement spécifique de cet AG dans les tissus lors de sa supplémentation *in vivo*. Notre objectif était donc d'examiner l'effet de la supplémentation en DPA à dose physiologique sur la composition en AGPI des principaux tissus chez le rat afin de guider les études futures vers la recherche d'effets physiologiques.

Matériel et méthodes

Des rats Sprague Dawley (n=16) ont été nourris après le sevrage avec un régime contrôle (Ctrl) ou supplémenté avec 0,5% de DPA n-3 pendant 3 semaines.

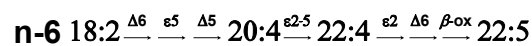
Les lipides totaux ont été extraits de 18 tissus puis les AG ont été dérivés en esters méthyliques d'AG pour être analysés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-MS).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les groupes sont comparés par des tests t de Student (ajustement *fd*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; td 0,1 < $p < 0,05$

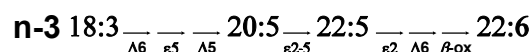
Une analyse par OPLS-DA est utilisée pour identifier les tissus et les AG les plus impactés par la supplémentation. Cette analyse permet de considérer que tous les AG sont interdépendants. Un modèle de validation croisée est utilisé pour valider le modèle. Les variables en couleurs sont significatives (VIP > 1).

Régimes : % AG	Ctrl	DPA n-3
AG saturés (C14:0 à C22:0)	21,0	20,9
C16:0 (acide palmitique)	17,2	17,1
AG Mono-saturés	65,3	65,0
C18:1 n-7 (acide oléique)	63,3	63,0
AG Poly-insaturés	13,7	13,6
C18:2 n-6 (LA)	11,3	11,3
C18:3 n-3 (ALA)	2,3	2,3
Ratio LA/ALA	4,9	4,9
C22:5 n-3 (DPA n-3)	0	0,5

Conversion des AGPI



Compétition entre substrats pour les enzymes communes aux deux voies.



EPA C20:5 n-3
Acide timnodonique

DPA C22:5 n-3
Acide clupanodonique

DHA C22:6 n-3
Acide cervonique



Résultats

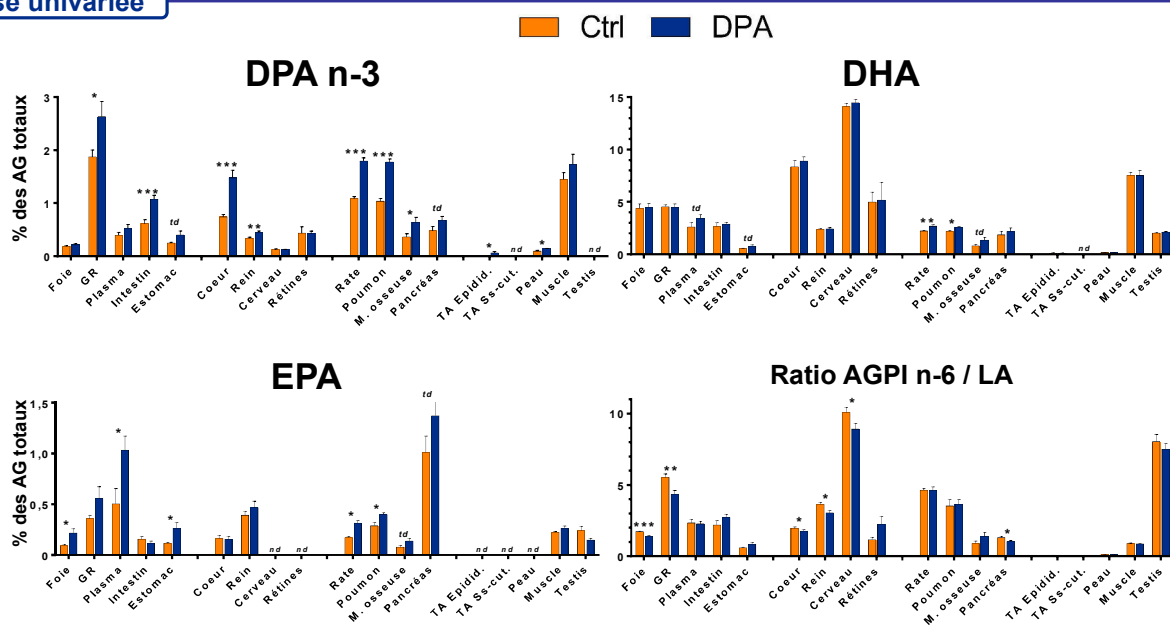
Analyse univariée

Le DPA n-3 augmente dans la plupart des tissus quand les animaux sont supplémentés avec cet AG.

Le profil en DHA n'est pas impacté par le régime DPA, à part dans la rate, le poumon et la moelle osseuse où son statut augmente.

L'EPA augmente dans certains tissus comme le foie et le plasma. Il pourrait venir de la rétroconversion péroxisomale du DPA en EPA.

Le ratio AGPI n-6 / LA diminue dans quelques tissus et particulièrement dans le foie. Cela suggère une diminution de la voie de conversion des AGPI n-6. Ce résultat pourrait être dû à la compétition de substrats entre les AGPI n-3 et n-6 pour les différentes enzymes de la voie de conversion des AGPI, communes aux deux familles.

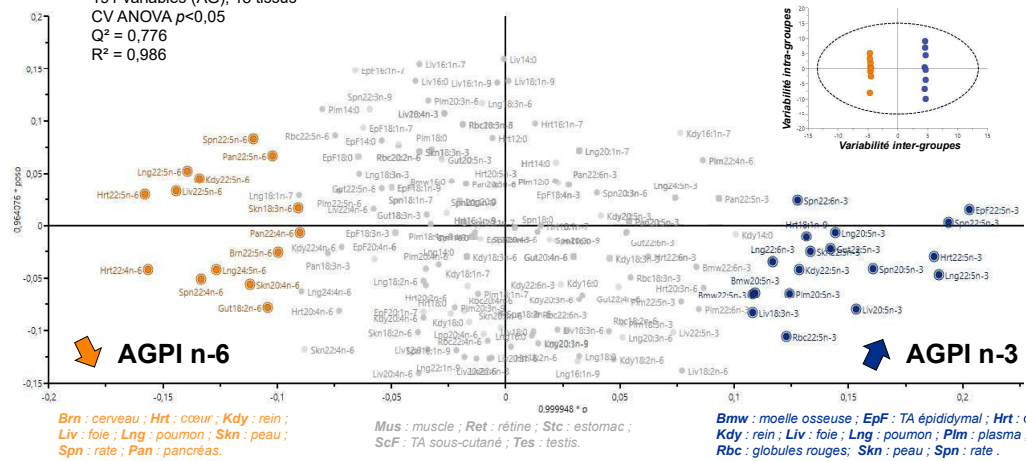


Analyse multivariée

Validation du modèle
191 variables (AG), 18 tissus
CV ANOVA $p < 0,05$
 $Q^2 = 0,776$
 $R^2 = 0,986$

Dispersion des variables...

et des individus



Le graphe des **individus** sépare fortement les 2 régimes pour tous les animaux. Le graph des **variables** montre les AG des tissus les plus discriminants entre les 2 groupes séparés.

Seuls les **AGPI n-3 et n-6** sont impactés dans tous les tissus, ce qui suggère une action spécifique du DPA n-3 sur ces voies.

Pour les **AGPI n-6**, la supplémentation en DPA n-3 diminue principalement le DPA n-6 et l'acide arachidonique (C20:4 n-6).

Le cœur, le foie, le poumon, le rein, la rate, la moelle osseuse puis le pancréas sont les tissus les plus impactés par la supplémentation en DPA n-3.

Conclusion et perspectives

Après seulement 3 semaines de supplémentation en DPA n-3 à dose physiologique, le statut en AGPI n-3 a été amélioré dans la plupart des tissus. L'impact du régime DPA n-3 a été tissu-dépendant; il a impacté spécifiquement le cœur, les poumons, la rate, les reins et la moelle osseuse. Ces résultats suggèrent des effets physiologiques potentiels spécifiques du DPA n-3 dans ces organes par rapport à l'EPA et au DHA, dont les enrichissements étaient moins spécifiques lors de précédentes études.

En outre, certaines études ont montré une augmentation du DPA n-3 dans les globules rouges et dans certains tissus lorsque le régime est partiellement enrichi en lipides laitiers par rapport à un régime composé d'huiles végétales. Une autre de nos études s'intéresse aux effets physiologiques potentiels associés à une supplémentation en DPA n-3 dans des régimes partiellement enrichi en lipides laitiers et à la purification du DPA n-3 (voir Poster P133, « Effets métaboliques et physiologiques associés à une supplémentation en DPA n-3 chez le rat »).

Une supplémentation en acide docosapentaénoïque n-3 (DPAn-3) impacte spécifiquement la composition tissulaire en acides gras chez le rat

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Guillocheau E.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹

¹ : Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest ; ² : Lactalis R&D

Introduction et but de l'étude : Le rôle des Acides Gras Polyinsaturés (AGPI) n-3 sur le métabolisme lipidique est bien connu. Néanmoins, la plupart des recherches sont axées sur l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3). Peu d'études concernent le DPAn-3 (C22:5n-3), peu disponible commercialement. Cet acide gras est un dérivé intermédiaire entre l'EPA et le DHA dans la voie de conversion des AGPI n-3 à partir de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3n-3). Cet acide gras pourrait être intéressant tant pour sa capacité à se convertir en DHA que pour ses effets physiologiques spécifiques. A notre connaissance, il n'existe aucune étude nutritionnelle vérifiant si une supplémentation en DPAn-3 entraînait un enrichissement en DHA *in vivo*. L'objectif de cette étude est donc d'examiner l'effet d'une supplémentation en DPAn-3 à une dose physiologique sur la composition en AGPI des principaux tissus et sur la conversion potentielle en DHA chez le rat, en fonction du temps de supplémentation.

Matériel et méthodes : 4 lots de rats mâles Sprague Dawley (n=16/lot) ont été nourris pendant 3 ou 6 semaines à partir du sevrage avec un régime à 10% de lipides en masse supplémenté ou non avec du DPAn-3 à hauteur de 0,5% des acides gras totaux (AGT), et contenant de l'ALA (2,3% des AGT, ratio n-6/n-3 de 5). La composition en AGT des tissus a été étudiée par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Vingt tissus ont été analysés et comparés par analyse multivariée (OPLS-DA) pour 8 rats par lot à 3 semaines. La composition des 8 tissus les plus impactés par la supplémentation ont ensuite été analysés pour tous les rats et comparés par ANOVA à 2 facteurs à effet aléatoire suivi d'un test *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$). Cette étude regroupe deux expérimentations distinctes.

Résultats : L'analyse multivariée a montré que le cœur, le foie, les poumons, les reins, la rate, les globules rouges (GR), la moelle osseuse et le pancréas sont les tissus les plus impactés par la supplémentation en DPA. Seuls les Oméga-3 et les Omega-6 sont impactés.

Après une supplémentation en DPA, la proportion de DPA est augmentée significativement dans tous les tissus analysés sauf dans le cerveau. Le DHA est augmenté dans le cœur, les GR, la rate et les poumons. La supplémentation en DPA augmenterait donc la conversion jusqu'au DHA dans ces tissus. Les proportions d'EPA ont été accrues dans le foie, le cœur, les GR. Cela confirmerait l'hypothèse de la rétroconversion directe du DPA vers l'EPA ou indirecte en passant par le DHA.

Concernant les Omega-6 en compétition avec les enzymes de la voie de conversion des Oméga-3, les proportions d'acide arachidonique (C20:4n-6) ont diminué dans le cœur uniquement et les proportions de DPAn-6 (C22:5n-6) ont diminué dans tous les tissus observés sauf les poumons.

Les effets sont généralement plus marqués après 6 semaines de régimes qu'après 3 semaines de régimes pour les Oméga-3, montrant une importance du temps d'accumulation pour cet acide gras.

Conclusion : La supplémentation en DPA à hauteur de 0,5% des AGT entraîne un enrichissement en DHA, en DPA et en EPA dans des tissus spécifiques mais pas dans le cerveau. Cela laisse suggérer une action potentielle et spécifique de cet acide gras.



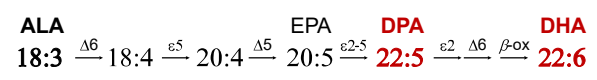
Journée Francophones de Nutrition 2017

Dairy lipids increased Omega-3 status. Impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA) supplementation.

Introduction

In most infant formulas, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VO). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives like DHA or DPA. Few studies concern DPA, which is not available for *in vivo* studies. It could be of interest both for DPA ability to be converted to DHA, and for its potential specific physiological effects. Our aim are to evaluate the DL effect on Omega-3 metabolism post-weaning and to study the potential impact of n-3 DPA supplementation on physiology and on n-3 conversion pathway.

Omega-3 conversion pathway



Methods

Study 1 – Impact of dairy lipids (DL) on the Omega-3 metabolism :

Rats were fed during 6 weeks with a diet containing a mix of vegetables oils (VO) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) supplemented (n=8) or not (n=24) with 0.5% DHA

Study 2 - Whole body FA impact and DPA assimilation of DPA supplementation:

Rats were fed during 3 weeks with a VL diet supplemented or not with 0.5% DPA

Study 3 - Physiological effects and DHA conversion of DPA supplementation:

Rats were fed during 6 weeks with a DL diet supplemented or not with 1.0% EPA, DPA or DHA.

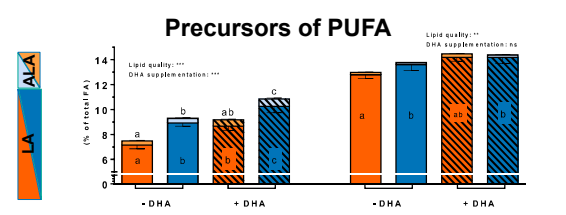
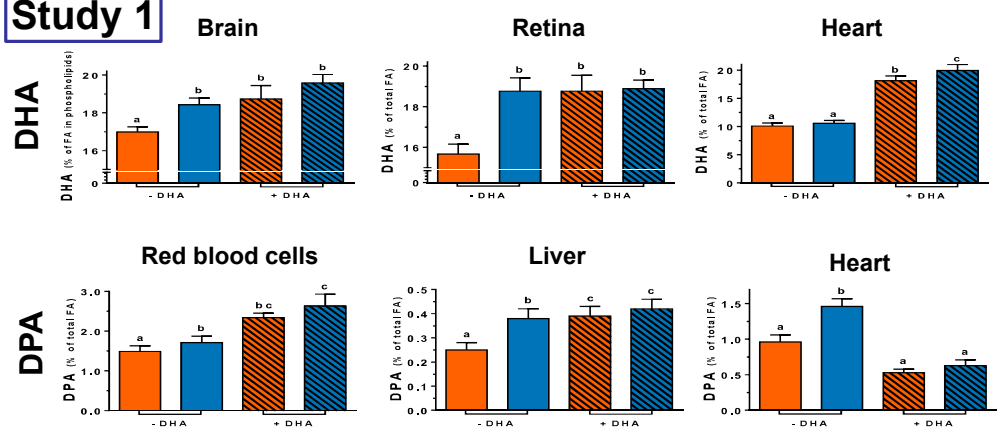
FA compositions were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS). Biochemical assays were realized with commercial kit. Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by mixed linear model (study1), Student t-test and OPLS-DA (Study2), ANOVA followed by Duncan test (study 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; td $0.1 < p < 0.05$

Diets : % FA	VO	DL
Saturated	21.0	37.5
16:0	17.2	17.1
Mono-unsaturated	65.3	47.4
18:1 n-9	63.3	42.7
Poly-unsaturated	13.7	14.2
18:2 n-6 (LA)	11.3	11.5
18:3 n-3 (ALA)	2.3	2.4
LA/ALA ratio	4.9	5.0
Study 1 : DHA	± 0.5	± 0.5
Study 2 : DPA	± 0.5	± 0.5
Study 3 EPA		± 1.0
Study 3 DPA		
Study 3 DHA		



Results

Study 1

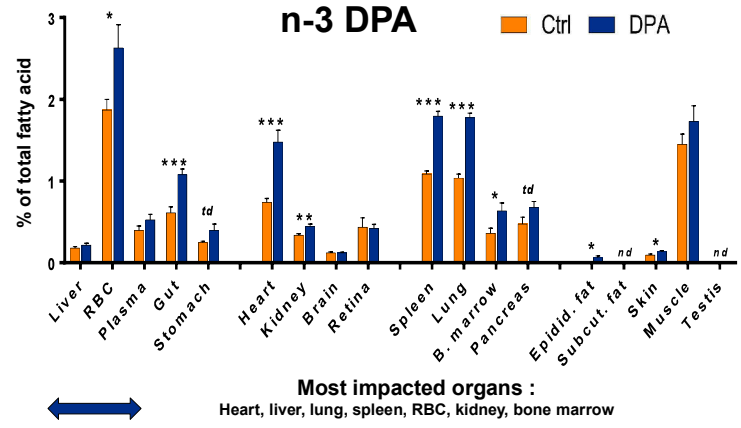
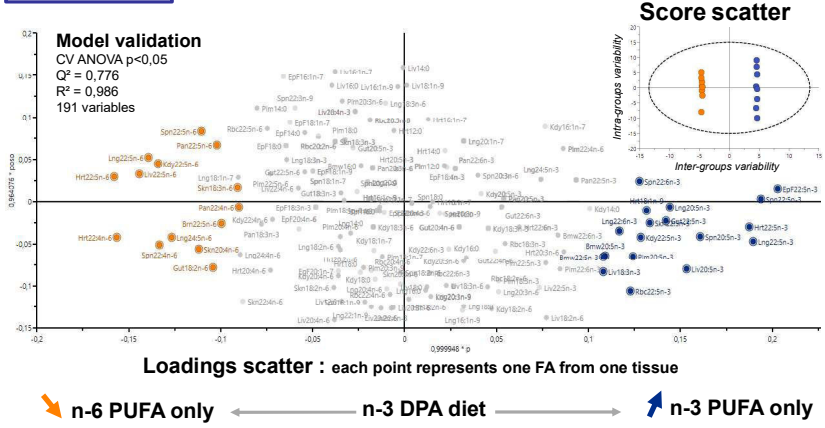


In brain and retina, rats fed DL accumulated more DHA than VO group, and in the same level than rats directly supplemented in DHA. The DHA status in heart was higher for rats fed DL when diets were supplemented with DHA.

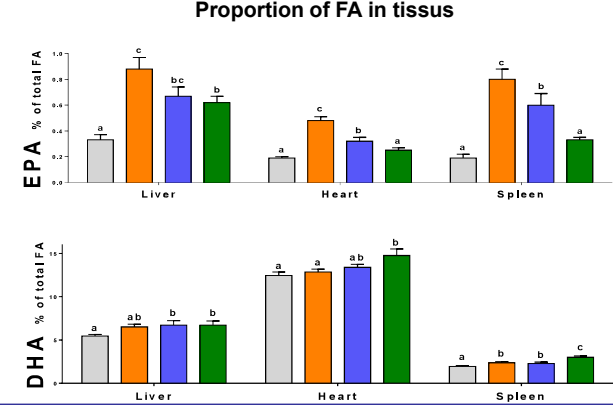
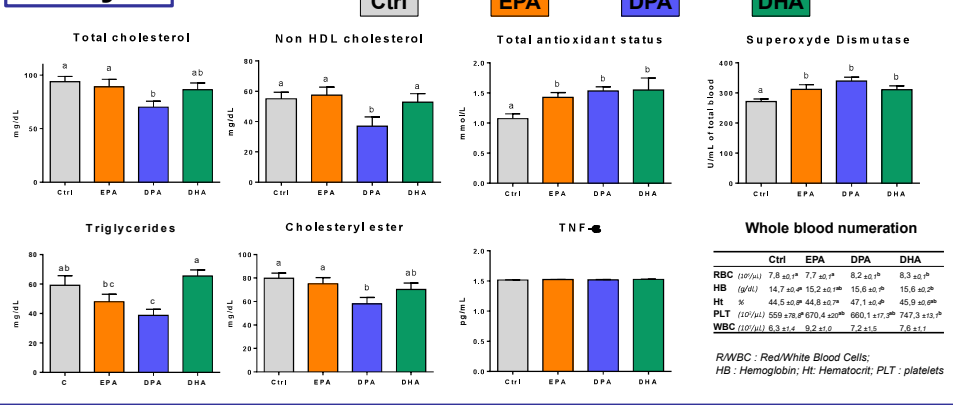
Rats fed DL accumulated more DPA in heart, red blood cells (RBC) and liver.

Rats fed DL accumulated more PUFA precursors ALA and LA in liver than VO group. The increase of Omega-3 in peripheral tissues could be due to the presence of short-chain FA in DL diets which prevent PUFA precursors from mitochondrial β -oxidation in liver.

Study 2



Study 3



Conclusion and perspectives

A partial enrichment in dairy lipids in diets mimicked infant formula lipid composition improved the DHA status in brain and in retina at the same level than rats directly supplemented in DHA. Rats fed DL diets increased DPA in red blood cells, heart and liver compared to rats fed VO diets. DPA supplementation decreased specifically triglycerides and total cholesterol in plasma, and the oxydative stress, like EPA and DHA supplementation. DPA was increased in some specific tissues and its supplementation could increase DHA status in some organs. Future analysis will determine its action on inflammatory parameters and its specific active hydroxylated metabolites.

Dairy lipids increase Oméga-3 status. Physiological impact of n-3 docosapentaenoic acid (DPA).

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹

¹ : Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus Ouest ; ² : Lactalis R&D

Introduction:

Oméga-3 and especially DHA are important for neurocognitive and visual development. Infant formula partially enrich with dairy lipids (DL) could improve Oméga-3 status in tissues, and especially DHA and DPA. DPA is a poorly study Oméga-3, these physiological effects are unknown and it could have specific physiological effects compare to the other Oméga-3 (ALA, EPA, DHA), which could prevent cardiovascular events.

Material and methods:

Rats (n=120) were fed with diets composed of vegetables oils (VO) or DL, supplemented or not with EPA, DPA or DHA, during 3 or 6 weeks. Non-supplemented diets mimicked the composition of commercial infant formula. Fatty acids composition of 18 tissues, biochemical parameters, inflammation and oxidative stress markers were assessed.

Results:

Compared with the VO group, the partial introduction of DL increased the proportion of DHA in brain, retina and heart, at the same level as diets directly supplemented with DHA. DL also increased n-3 DPA in the liver, red blood cells and heart. These increases in the Oméga-3 conversion pathway would come from an economy of Oméga-3 precursors, associated with the presence of short chain fatty acids in DL.

Supplementation with 0.5% DPA affects specific organs by increasing the proportion of DPA specifically in some tissues and by acting only on the metabolism of Oméga-3 and Omega-6 polyunsaturated fatty acids.

Compared to groups supplemented with 1% EPA or DHA, only supplementation with DPA decreased cholesterol and triglyceride levels. The DPA group decreased oxidative stress and increased the proportions of DHA and EPA equally or less than direct EPA and DHA supplementation.

Perspectives:

To maintain an adequate Oméga-3 status in infant, guidelines for the sale of infant formula should be directed to milks enriched with DL or directly enriched in DHA.

DPA could have a synergic impact with EPA and DHA, which are always supplemented in humans after a cardiac injury.

Dairy lipids enrichment increased Omega-3 status in post-weaning rats.

Drouin G¹., Catheline D¹., Baudry C²., Le Ruyet P²., Rioux V¹., Legrand P¹.

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France

²Lactalis R&D, Retiers, France

GRUPE
LACTALIS

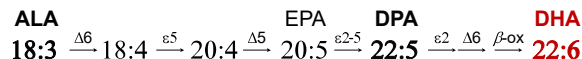
INRA

AGRO
CAMPUS
OUEST

Introduction

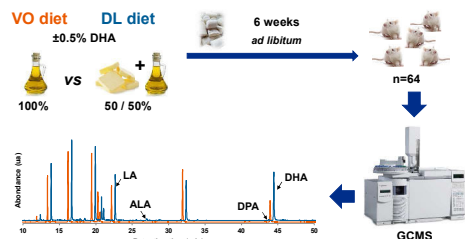
In most infant formulas, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VL). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Omega-3 Fatty Acid (FA) precursors into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in α -linolenic acid (ALA) were superior VL blends for increasing DHA accretion in brain. However these results were observed in specific conditions: In post-weaning rats after depletion of Omega-3 FA during gestation and lactation (Delplanque et al., PLEFA, 2012); in mice, when the LA/ALA ratio was lower in the DL group (2.3% ALA, LA/ALA ratio=5) as compared to the VL group (1.3% ALA, LA/ALA ratio=10) during gestation and lactation (Dinel et al., PLEFA, 2016).

Omega-3 conversion pathway



Our purpose was to evaluate the dairy lipid effect on Omega-3 metabolism post-weaning with an equal 2,3% ALA and LA/ALA ratio of 5.

Methods



Design : Sprague Dawley rats were fed after weaning during 6 weeks with a diet containing a mix of plant oils (VO) or a mix of plant oils and dairy lipids (DL) supplemented or not with 0.5% DHA.

Methods : Lipids were extracted from different tissues (Delsal, 1944). FA were analyzed as FA methyl esters by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS). Plasmatic parameters were measured by commercial kit.

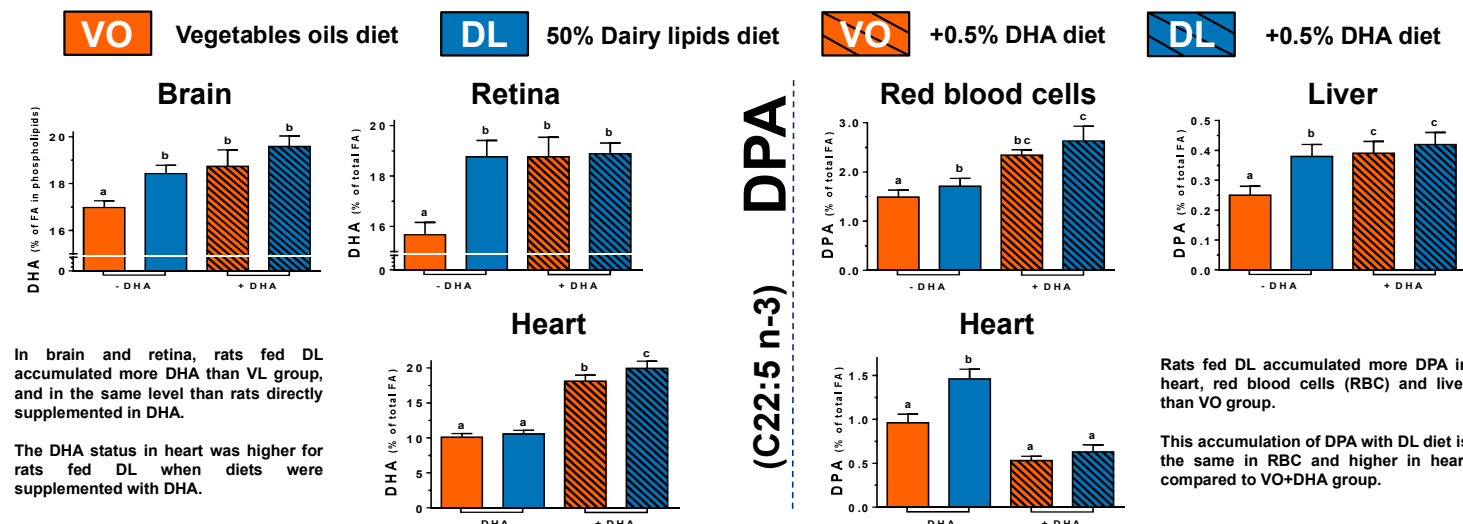
Analysis : Results were expressed as mean \pm SEM. Significance between groups was evaluated by 2-ways ANOVA (* indicate a global difference; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). ANOVA is followed by a Tukey *post-hoc* test, different letters indicate a significative difference. Redundancy analysis was used to evaluated global FA metabolism in epididymal adipose tissue.

Results

DL increased Omega-3 status in brain, retina, heart, liver and RBC

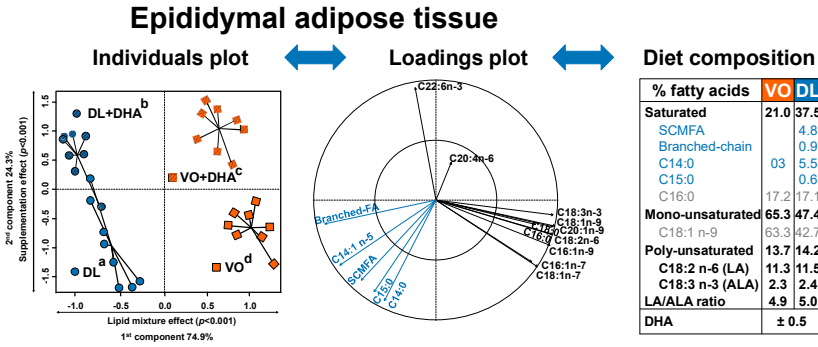
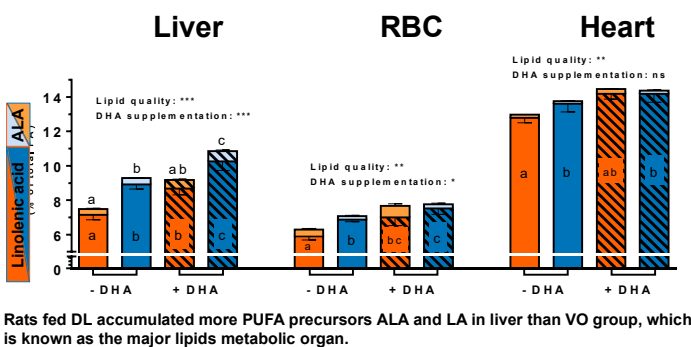
DHA (C22:6 n-3)

DPA (C22:5 n-3)



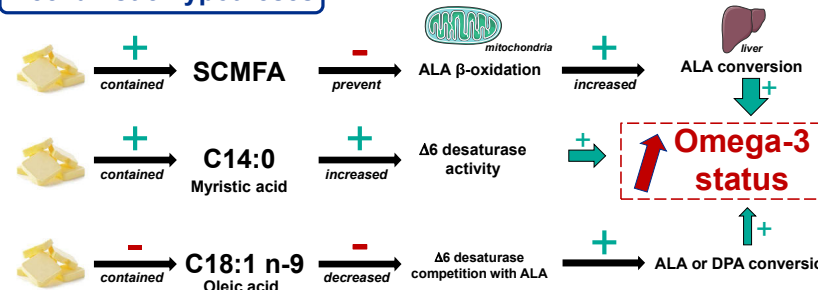
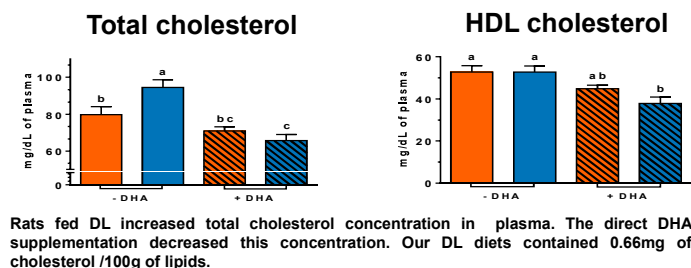
DL prevented PUFA precursors from β -oxidation

DL provided specific fatty acids from diet



DL increased plasma cholesterol

Mechanistic hypotheses



Dairy lipids enrichment increased Oméga-3 status in post-weaning rats.

Drouin G.¹, Catheline D.¹, Baudry C.², Le Ruyet P.², Legrand P.¹

¹ : *Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus Ouest* ; ² : *Lactalis R&D*

Background and Aims

Docosahexaenoic acid n-3 (DHA) status is essential for neurocognitive and visual development. In most infant formula, lipids are provided by a blend of vegetable oils (VL). The partial reintroduction of dairy lipids (DL) could be beneficial to stimulate the endogenous conversion of Oméga-3 Fatty Acid (FA) precursor α -linolenic acid (ALA) into derivatives. Indeed, recent studies showed in rodents that DL blends high in ALA were superior to n-3 FA-enriched VL blends for increasing brain DHA accretion in specific conditions.

Our purpose is to evaluate the DL effect on Oméga-3 metabolism during post-weaning with an equal 2.3% ALA and Omega-6/ Oméga-3 ratio of 5.

Method

Sprague Dawley rats (n=48) were fed after weaning with a diet containing a mix of VL or a mix of VL and DL during 6 weeks \pm 0.5% DHA. Diets lipid composition followed infant formula composition. FA composition in tissues were analyzed by GCMS. Desaturases activities were measured in liver. Cholesterol were analyzed in plasma.

Results

In brain and retina, rats fed DL accumulated more DHA than VL group, and in the same level than rats directly supplemented in DHA.

Introduction of DL increased the docosapentaenoic acid n-3 (DPA) proportion in heart, red blood cells and liver; enhanced the proportion of ALA and linoleic acid precursors of polyunsaturated acids in the liver. DL increased cholesterol level in plasma. No effect was detected on the delta-6 desaturase activity and expression.

Conclusion

DL positively impacted Oméga-3 status in brain, retina and heart by preserving precursors in liver.

Keywords : Dairy lipids ; Oméga-3 ; Brain ; DHA ; PUFA conversion



LARGE SCALE PURIFICATION OF MINORITY FATTY ACIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY : THE n-3 DOCOSAPENTAENOIC ACID CASE

2018 AOCS Annual Meeting & Expo
May 6-9
Minneapolis, Minnesota, USA



Drouin G¹., Guillocheau E¹., Catheline D¹., Baudry C²., Rioux V¹., Legrand P¹.

contact : gaetan.drouin@agrocampus-ouest.fr

¹Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition - Agrocampus Ouest, Rennes, France

²Lactalis R&D, Retiers, France

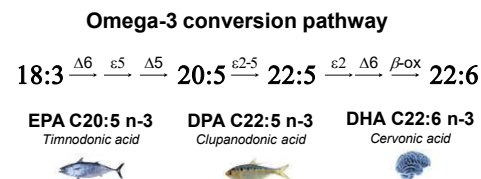


Introduction et objectifs

Some fatty acids (FA) of interest present in natural or synthesized sources are not commercially available at high purity in sufficient amounts, and at affordable prices to allow *in vivo* studies of these molecules. It is the case of the n-3 docosapentaenoic acid (DPA). One solution is to purify these molecules from natural sources or syntheses.

Here we take the example of DPA, the intermediate between EPA and DHA in the Omega-3 conversion pathway. The structural similarity of DPA with other long-chain polyunsaturated fatty acids makes its purification difficult.

Our goal was to purify several ten grams of DPA, EPA and DHA with a purity higher than 98%.



Method and sources

Preparative and flash liquid-chromatography



- Pumps, max flow 250mL/min (250bar)
- Injection loop (20mL)
- Flash column C18, 330g, 45µm, 12bar max
- Preparative column C18, 5µm, 250bar max
- UV-detector (200-800nm)
- Flash column C18, 360g HP, 15µm, 12bar
- Solvent containers (20L)
- Fraction collector (65mL tubes)

Alternative methods

(Don't working for n-3 DPA)



Distillation



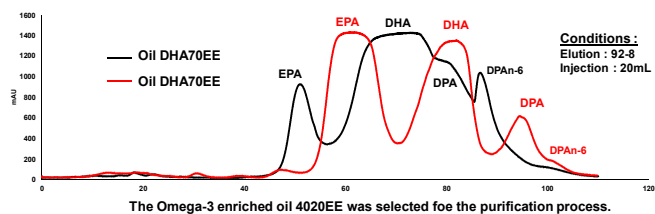
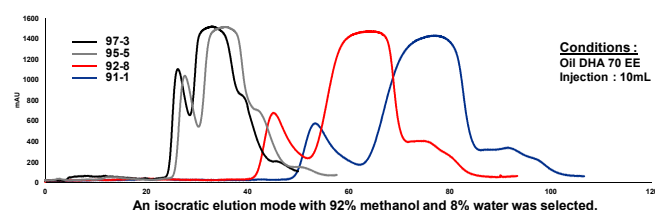
Cristallisation

Food sources

Fatty acids (%)	4020EE	DHA70 EE	Squale	Beef liver
<C20	18,33	13,40	83,63	91,08
C20:5 n-3	44,97	4,07	4,53	1,36
C21:5 n-3	2,03	0,22	0,09	
C22:5 n-6	0,54	4,05	0,24	0,37
C24:1 n-9	0,53	2,04	2,86	
C22:5 n-3	6,64	5,15	1,46	4,46
C22:6 n-3	23,81	69,05	5,82	0,67

Ethyl esters (EE) can be consumed directly

Optimisation



Purification method



Harvesting and grouping fractions

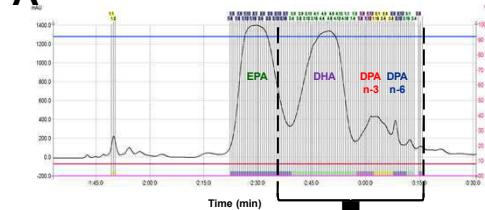


Rotary evaporator Quantification by GCMS and weighing

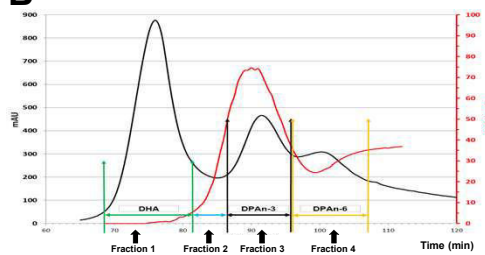


Solvent recycling by distillation

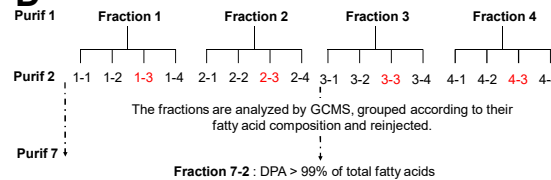
A Injection and collection of fractions by 30 seconds (60mL)



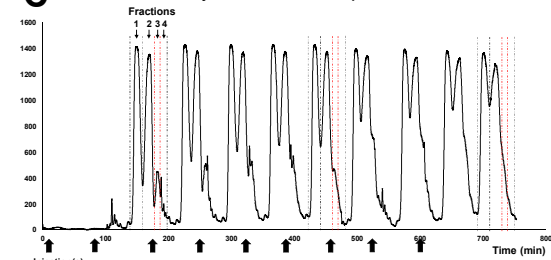
B Identification and quantification of collected fractions by GCMS



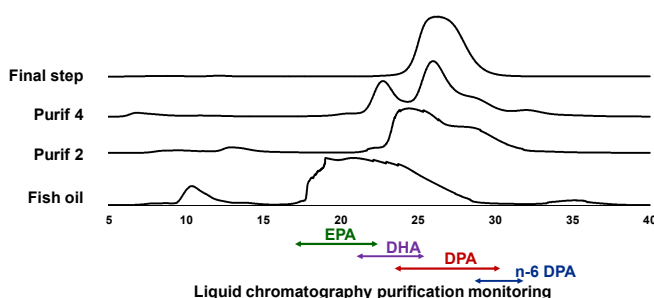
D Pool system of the collected fractions



C Successive injections and harvest of predefined fractions

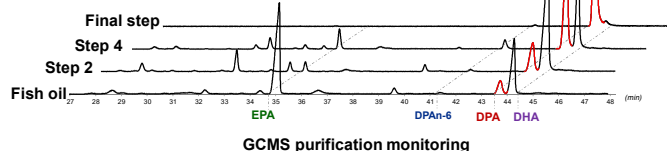


Purification



Fraction composition monitoring and recovery

% fatty acids	DPA	DHA	DPA n-6	EPA	DPA recovery
Huile	7	23	0,5	45	100
Purif 2	18	68	0,7	3	92
Purif 4	46	33	2	9	85
Final	98	1	0,5	0	76



Conclusion and perspectives

We have purified 99% purity fatty acids, from a few dozen (DPA) to several hundred grams (EPA, DHA). After optimization of the method, we can therefore produce quantities of fatty acids compatible with carrying out *in vivo* experimentation. The methodology is applicable to other types of fatty acids including monounsaturated fatty acids.

Large scale purification of minority fatty acids by liquid chromatography: the n-3 docosapentaenoic acid case.

Drouin G.1, Guillocheau E.1, Catheline D.1, Rioux V.1, Legrand P.1

¹ : *Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition – Agrocampus Ouest*

Background and Aims

Some fatty acids of interest present in natural or synthesized sources are not commercially available at high purity in sufficient amounts, or at affordable prices to allow in vivo studies of these molecules. The purpose of this study was to purify on the scale of a few tens of grams of n-3 ethyl docosapentaenoic acid (n-3 DPA) in the laboratory.

Method

The purification was performed by crystallization following by flash and preparative liquid chromatography. The optimization of the n-3 DPA source, the columns used, the elution, the volume and the injection method, the purification process and the associated logistics were carried out.

Results

Several tens of grams of n-3 DPA were obtained with a purity and an efficiency greater than 99% and 80%, respectively. Starting from a high Oméga-3 content marine oil, one step of crystallization and seven successive steps of liquid chromatography coupled with an UV-detector were necessary. 20 ml of oil mixed with 15% methanol were injected over an original system consisting in two-coupled C18 flash columns (45 μm with high capacity, and 15 μm with high performance). The elution was operated at 120 ml/min (constant flow rate), with an isocratic methanol/water mode which proportions depended on the purification step. These conditions allowed successive injections without waiting for the end of the chromatogram.

Conclusion

This method could be applicable to the separation of all polyunsaturated and monounsaturated fatty acids.

**2018 AOCs Annual
Meeting & Expo**
May 6–9

Minneapolis, Minnesota, USA



ANNEXE VI

: Liste des formations doctorales

- ✓ Communication, anglais ; Communication scientifique en anglais et français : rédaction d'articles, communications orales ; du 18 au 22/05/2015 ; 14h ; Campus Beaulieu, Université Rennes 1
- ✓ Expérimentation animale ; Formation à l'expérimentation animale, niveau 1 ; du 07 au 16/10/2015 ; 73h ; ONIRIS Nantes
- ✓ Rentrée des doctorants 02/11/2015 ; 2h30 ; Campus Beaulieu, Université Rennes 1
- ✓ Histologie, H2P2, Préparation d'échantillon de tissu en histologie : Inclusion en paraffine, 11/12/2015 ; 2j ; Plateforme H2P2, Université Rennes 1, Villejean.
- ✓ Table ronde entreprises 29/04/2016 ; 3h ; STLO Agrocampus Ouest
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite de la Plateforme d'analyse de l'INRA Saint Gilles ; 29/04/2015 ; 1 journée ; INRA Saint Gilles (+ présentation orale du projet)
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite et manipulation sur automate de dosage; 20/07/2016; ½ journée ; laboratoire de biochimie du CHU Ponchaillou de Rennes
- ✓ Séminaire Envigo « Importance de la qualité des aliments dans la recherche » ; ½ journée ; 20/09/2016 ; Faculté de médecine Rennes 1
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite et manipulation (agrégation plaquettaire, NFS, coloration);01 ;08-09/12/2016 3 jours ; Laboratoire d'hémostase du CHU Ponchaillou de Rennes

- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite et manipulation (cytométrie de flux) ; 08-10/12/2016 ; 3 ½ journées ; Plateforme cytométrie de Biosit Rennes
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Initiation à l'analyse de redondance ; 23/03/2017 ; 3h ; Beaulieu Rennes
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite de l'UPAE de l'INRA Jouy en Josas pour la fabrication de régime croquettes pour expérimentation animale ; 27/06/2017 ; ½ journée ; INRA Jouy en Josas (+ présentation orale français)
- ✓ Formation d'Habilitation pour la conduite des autoclaves ; 1 journée ; 27/06/2017 ; Agrocampus Ouest Rennes
- ✓ Séminaire Envigo « Surveillance de la santé des animaux de laboratoire » ; ½ journée ; 06/07/2017 ; Biosit Villejean Rennes 1
- ✓ Séjour dans laboratoire ; Visite, manipulation et formation au dosage par Multiplex ; 1,5 jours ; 06 ; 09/07/2017 ; Laboratoire d'analyse médical du centre Eugène Marquis de Rennes
- ✓ Séminaire entreprise ; Journée recherche Lactalis et visite du musée du lait ; 29/06/2017 ; 1 journée ; Groupe Lactalis Laval
- ✓ Visite de l'usine de production et du service R&D de l'entreprise Polaris ; 04/07/2017 ; ½ journée ; Polaris Quimper et La Forêt Fouesnant
- ✓ Enseignement ; Dispensation d'une formation de 27h en statistiques appliquée à la biologie interne au laboratoire, 27h ; Agrocampus Ouest Rennes

ABSTRACT

The optimization of tissue status in n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA) is one of the current goals in human nutrition. Indeed, many beneficial effects on human health have been demonstrated for these different n-3 LCPUFA. However, the bioconversion of these derivatives from their food precursor, α -linolenic acid, is limited in humans and it does not meet the needs of the organism. Among this family of fatty acids, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) have been widely studied in contrast to those of n-3 docosapentaenoic acid (DPA).

The first objective of this work was to study the impact of dietary supplementation with DPA on fatty acid metabolism and lipid metabolism in healthy rats. For this, a method for purifying DPA with high purity and in large quantities by liquid chromatography was first established. This result helps future research of the *in vivo* effects of DPA, poorly commercially available. After its nutritional supplementation, DPA was incorporated into multiple tissues and it has affected the n-3 LCPUFA tissue compositions of specific organs such as the liver, heart, lung, spleen and the kidney. Thus, supplementation with DPA could be a source of EPA, DPA, and to a lesser extent DHA. Finally, compared to supplementation with EPA or DHA, DPA was the most potent n-3 LCPUFA to improve triglyceridemia and cholesterolemia in animals. This information will certainly contribute to a greater consideration of DPA both in nutritional studies and in the direction of future nutritional recommendations.

The second area of research focused on the ability of a partial incorporation of dairy lipids in the diet to increase the tissue status in n-3 LCPUFA. Incorporation of dairy lipids in the diet increased DHA status in brain and retina and DPA status in the other studied tissues. In addition, the induction of conversion of n-3 LCPUFA from their precursor by dairy lipid was complementary with the DPA supplementation to increase n-3 LCPUFA status in tissues. These results fit into a context of infant nutrition, during which the incorporation of n-3 LCPUFA is maximal in nervous tissues. Thus, these results provide interesting data for both companies and health professionals to recommend infant formulas containing dairy lipids for consumption.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids; docosahexaenoic acid DHA; eicosapentaenoic acid EPA; infant formula; Omega 3; cholesterol; lipids; nutrition; rat; tissue composition; dairy lipids; vegetable oil.

RÉSUMÉ

L'optimisation du statut tissulaire en acides gras polyinsaturés à longues chaînes n-3 (AGPI-LC n-3) fait partie des objectifs actuels en nutrition humaine. En effet, de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine ont été démontrés pour ces différents AGPI-LC n-3. Néanmoins, la bioconversion de ces dérivés à partir de leur précurseur alimentaire, l'acide α -linoléinique, est limitée chez l'Homme et ne permet pas de subvenir aux besoins. Parmi cette famille AGPI-LC n-3, l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) ont été largement étudiés à l'inverse de l'acide docosapentaénoïque n-3 (DPA).

Le premier objectif de ces travaux a été d'étudier l'impact d'une supplémentation nutritionnelle en DPA sur le métabolisme des acides gras et le métabolisme lipidique chez le rat sain. Pour cela, une méthode de purification du DPA à haute pureté et en grande quantité par chromatographie liquide a tout d'abord été mise en place. Ce résultat participe à faciliter la recherche future des effets *in vivo* du DPA dont la disponibilité commerciale est faible. Après sa supplémentation nutritionnelle, le DPA a été incorporé dans de multiples tissus et a impacté les compositions tissulaires en AGPI-LC n-3 de certains organes spécifiques comme le foie, le cœur, le poumon, la rate et le rein. Ainsi, la supplémentation en DPA pourrait être une source d'EPA, de DPA et dans une moindre mesure de DHA. Enfin, comparé à une supplémentation en EPA ou en DHA, le DPA a été l'AGPI-LC n-3 le plus puissant pour améliorer la triglycéridémie et la cholestérolémie des animaux. Ces informations participeront certainement à une prise en compte plus importante du DPA tant dans les études nutritionnelles que dans l'installation des futures recommandations nutritionnelles.

Le deuxième axe de recherche a porté sur la capacité d'une incorporation partielle de lipides laitiers dans le régime à augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3. L'incorporation de lipides laitiers a augmenté le statut en DHA cérébral et rétinien et le statut en DPA dans les autres tissus étudiés. De plus, l'induction de la conversion des AGPI-LC n-3 à partir de leur précurseur par les lipides laitiers a été complémentaire avec la supplémentation en DPA pour augmenter le statut tissulaire en AGPI-LC n-3. Ces résultats s'insèrent dans un contexte de nutrition infantile, période pendant laquelle l'incorporation des AGPI-LC n-3 est maximale dans les tissus nerveux. Ainsi, ces résultats apportent des données intéressantes tant pour les entreprises que pour les professionnels de santé pour recommander à la consommation des formules infantiles contenant des lipides laitiers.

Mots-clés : Acides gras polyinsaturés; acide docosahexaénoïque DHA; acide eicosapentaénoïque EPA; formule infantile; Oméga 3; cholestérol; lipides; nutrition; rat; composition des tissus; matière grasse laitière; huile végétale