



HAL
open science

Étude de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques

Pascaline Aimé

► **To cite this version:**

Pascaline Aimé. Étude de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10058 . tel-00711645

HAL Id: tel-00711645

<https://theses.hal.science/tel-00711645>

Submitted on 25 Jun 2012

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Pascaline Aimé

Etude de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques

Directeur de thèse : Dr. A.Karyn Julliard

Co-directeur : Pr. Remi Gervais

JURY: Pr. Claude Duchamp (Président)

Dr. Guillaume Ferreira (Rapporteur)

Pr. Anne Lorsignol (Rapporteur)

Dr. A. Karyn Julliard (Directeur)

Pr. Rémi Gervais (co-directeur)

Dr. Frédérique Datiche (Examineur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

RESUME en français : Le système olfactif partage de nombreux liens moléculaires, neuroanatomiques et fonctionnels avec le système de régulation de l'homéostasie énergétique. L'exploration de ces interactions nous a conduit à démontrer que la détection olfactive est modulée par les états alimentaires et métaboliques : des animaux affamés présentent une meilleure sensibilité olfactive que des animaux rassasiés. Cette modulation persiste chez les rats Zucker fa/fa obèses et disparaît chez les rats LouC résistants à l'obésité. Les hormones et les neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique apparaissent comme de bons candidats pour expliquer l'influence des états alimentaires et métaboliques sur la détection olfactive. Afin de tester directement leur action sur la détection olfactive, nous avons évalué les rôles de l'Orexine A, un neuropeptide hypothalamique orexigène, ainsi que de la leptine et de l'insuline, deux hormones d'adiposité périphériques, sur la capacité de détection olfactive de rats Wistar. Ainsi, nous avons démontré que l'injection ICV d'orexine A induit une augmentation de la détection olfactive. A l'inverse, les injections ICV de leptine et d'insuline induisent une diminution de la détection olfactive. Les récepteurs de l'orexine A, de l'insuline et de la leptine sont largement exprimés au niveau du système olfactif. En particulier, les récepteurs de l'insuline présentent une régionalisation marquée et sont très abondants au niveau de plusieurs catégories cellulaires du bulbe olfactif, le premier relais central de l'information olfactive. Nous avons également montré que la quantité d'insuline bulbaire variait en fonction de l'état alimentaire tandis que la densité des récepteurs n'était pas modifiée. L'ensemble de ces données, corroboré par d'autres travaux de la littérature, suggère que les hormones et les neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique jouent également un rôle majeur dans la régulation de la fonction olfactive. Les molécules orexigènes, libérées en état de faim et de carence énergétique, augmentent la détection olfactive et participent à l'initiation du comportement alimentaire. A l'inverse, les molécules anorexigènes libérées en état de rassasiement et d'abondance énergétique, diminuent la détection olfactive et conduisent à l'arrêt de la prise alimentaire. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent les interactions entre l'odorat et la régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle pourrait permettre à terme d'évaluer l'importance de la perception sensorielle de la nourriture lors de la mise en place de troubles du comportement alimentaire.

MOTS-CLES : Comportement, détection olfactive, bulbe olfactif, prise alimentaire, masse corporelle, hypothalamus, orexine A, insuline, leptine

TITRE en anglais: Influence of feeding and metabolic states on olfactory detection

RESUME en anglais: Olfaction is closely linked to energy homeostasis regulation. The olfactory system shares several molecular, anatomical and functional links with brain areas and peripheral organs involved in food intake and body weight regulations. We demonstrated that the feeding state modulates olfactory detection: fasted rats display better olfactory sensitivity than satiated ones. This modulation is also observed in Obese Zucker fa/fa rats. However, obesity-resistant LouC rats do not modulate their olfactory detection according to the feeding state. Peripheral hormones and neuropeptides involved in energy homeostasis regulation might be responsible for olfactory detection modulation. To examine this hypothesis, we evaluated the respective roles of Orexin A, a hypothalamic orexigenic neuropeptide; as well as leptin and insulin, two peripheral adiposity hormones; on olfactory detection. We demonstrated that central administration of Orexin A increases olfactory detection; whereas central administration of leptin or insulin decreases olfactory detection. Orexin A, leptin and insulin receptors are widely expressed in the olfactory system. We further demonstrated that insulin receptors were abundantly expressed in discrete olfactory bulb areas and in several neuron types of the olfactory bulb network. The whole of these data, supported by several reports, suggest that hormones and neuropeptides classically involved in energy homeostasis regulation extend their roles to olfactory detection modulation. Indeed, orexigenic signals released upon fasting or in conditions of energy depletion increase olfactory detection which participate in meal initiation. By contrast, anorexigenic signals released during refeeding or in conditions of energy abundance decrease olfactory detection which participate in meal termination. With the ever rising incidence of metabolic disorders, elucidating the cross-talks between olfaction and energy homeostasis regulation is of critical relevance to better understand and manage the etiology of altered food-intake behaviours.

KEYWORDS : Behaviour, olfactory detection, olfactory bulb, food intake, body weight, hypothalamus, orexin A, insulin, leptin

DISCIPLINE: Neurosciences

CNRS/UCBL - UMR 5020
Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition
50 Avenue Tony Garnier
69366 LYON Cedex 7

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail. Merci à Claude Duchamp. Mon cursus à Lyon aura été marqué par ta présence, d'abord en tant que Professeur pendant les années de Licence et de Master, puis en tant que collaborateur lors d'une série d'expériences menées dans ton laboratoire. Les échanges scientifiques que nous avons eus au fil de ces années universitaires ont été pour moi d'une grande richesse. Merci à Guillaume Ferreira d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. Merci également pour la facilité que tu démontres à engager de passionnantes discussions scientifiques. Depuis mon tout premier poster présenté lors du congrès organisé à Grenade par l'ECRO en 2006 devant lequel nous nous sommes rencontrés, ces moments de partage et d'échange animent la passion que j'ai développée pour le métier de chercheur. Merci à Anne Lorsignol d'avoir accepté de juger mon manuscrit de thèse. Le congrès organisé par la société des neurosciences à Montpellier en 2007 a marqué la rencontre de nos deux équipes. De cette rencontre sont nées des discussions enrichissantes, notamment avec ton étudiant Tristan, une collaboration fructueuse et une excursion Toulousaine particulièrement agréable. Merci à Frédérique Datiche d'avoir accepté avec beaucoup de sympathie d'assister à ma soutenance pour évaluer et discuter de mon travail de thèse. Merci à Rémi Gervais : d'une part, pour avoir fait partie de l'équipe pédagogique qui a su me donner le goût des Neurosciences ; et d'autre part, pour l'encadrement de ma thèse. Merci en particulier d'avoir toujours su prendre le temps de m'ouvrir votre porte pour discuter de l'avancement de mon travail.

Un grand merci à Karyn Julliard, ma chère directrice de thèse. Grâce à ton dynamisme inégalable, plus que la perspective de l'obtention d'un diplôme, tu as su faire de mon doctorat une aventure formidable. Tout d'abord, en m'accompagnant lors de nos diverses expériences, tu as su me transmettre ton savoir et ton savoir-faire dans la bonne humeur. Week-ends, jours fériés et longues soirées de manip: tu as toujours été présente, et je dois sincèrement t'en remercier. Tu m'as permis d'enrichir mon expérience doctorale en m'incitant à participer à plusieurs formations : microscopie électronique, microscopie confocale, expérimentation animale et chirurgie expérimentale. Encouragée par une forte relation de confiance, j'ai également eu la chance de pouvoir présenter nos travaux à l'occasion de plusieurs congrès nationaux et internationaux et lors d'une école d'hiver

internationale. En favorisant l'échange et le partage, tu m'as permis d'établir plusieurs collaborations scientifiques avec des laboratoires français et étrangers et de partir vivre aux Etats-Unis pendant six mois. Au cours de ma thèse, tu m'as également encouragée à donner des enseignements de Neurosciences à l'université, et j'ai beaucoup appris de cette expérience pédagogique. Sous ton aile, j'ai donc la profonde sensation d'avoir pu explorer toutes les opportunités qui s'ouvraient à moi lors de cette formation doctorale. En plus d'évidentes qualités professionnelles d'encadrante, tes qualités humaines ont bien évidemment contribué à l'accomplissement de ce travail de thèse et m'ont beaucoup apporté. Pour tous les bons moments à l'intérieur et à l'extérieur du labo : merci !

Je tiens également à remercier l'environnement direct qui a gravité autour de notre binôme de choc. Merci à Patricia, Michel, André et Alexandre qui ont largement participé aux conditions favorables qui ont marqué mon Master 2 et le début de mon doctorat. Agnès, j'ai été frappée par ta gentillesse dès mon arrivée dans le laboratoire. Je n'imagine pas le nombre incalculable de fois où je t'ai demandé de l'aide et où tu as répondu présente... Pour la vie au sein du labo, pour la visite de Philadelphie et pour notre intronisation à certaines parties de poker endiablées, merci ! Brigitte, merci d'avoir su te rendre disponible dès que j'en avais besoin depuis que je suis entrée dans l'équipe. En particulier, merci pour ton aide dans la rédaction de mon manuscrit. Et merci pour ce fou-rire mémorable sur une vaste plage andalouse !

Merci aux âmes qui peuplent ou qui ont peuplé le bureau 108. Tristan, toujours de bon conseil : un véritable grand-frère dans le labo. Sache que ton altruisme m'épate. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, ta gentillesse, tes encouragements et ton activité de S.A.V. si efficace pour à peu près tout ce qui concerne de près ou de loin un ordinateur. Tu as su révéler mon petit côté « geek »... Merci à Virginie et sa joie de vivre, Manue et sa générosité, Fred et son humour décapant. L'ambiance qui règne avec vous dans ce bureau va être difficile à retrouver ailleurs. Votre bonne humeur, nos ingurgitations de kilos de bonbons, nos papotages et l'entraide caractérisant notre réduit vont me manquer.

Merci à tous les membres de l'UMR5020 avec qui j'ai adoré interagir et qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, à enrichir mon expérience au sein de ce laboratoire : Nadine, Anne-Marie, Nathalie, Philippe, Corinne, Jane, Jean-Pierre, Maxime, Carine, Florence, Manuela, Gilbert, ainsi que les membres de l'indispensable équipe

technique : Vincent, Belkacem, Marc Gyver et Samuel « qui est vraiment trop fort en informatique »...

Merci à mes précieux amis. Germain : tu portes la double casquette de pote du labo et d'ami dans la « vraie » vie. Ton soutien sans faille dans l'un et l'autre de ces deux univers a été crucial au cours de ces dernières années. Tu as été là pour moi aux moments où j'en avais le plus besoin, que ce soit dans un couloir du labo ou devant un verre à l'Albion... Merci au reste de ma chère « communauté » Lyonnaise, pour nos innombrables et inénarrables moments de détente à Lyon, à Sanary et, contre toute attente, dans le 42 : Anne, Aurélien, Amélie, Antoine : vous n'avez pas idée de tout ce que vous m'avez apporté et vous êtes dorénavant indispensables à mon équilibre. Je suis plus que ravie de vous retrouver de l'autre côté de l'atlantique... Bélek, j'espère que tu viendras nous voir souvent! Matéo, merci pour ta constante bonne humeur, tes incroyables jeux de mots et pour tous les excellents moments passés ensemble (entre bien d'autres, la chasse nocturne du blaireaugarou à Central Park restera gravée dans ma mémoire). Merci aux bouffées d'oxygène apportées par les membres passés et présents de mes équipes de volley, avec une mention spéciale pour mon petit gluon: la pétillante Julie. Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs : Audrey, Antoine, Clarisse et Sophie, ces perles rares dont j'ai eu la chance de croiser la route et que je ne veux plus quitter. Merci au gigantesque groupe des Tourengeois. Petits et grands, vous êtes ma deuxième famille. Depuis une bonne dizaine d'années, je me suis construite (parfois détruite) à vos côtés. J'ai adoré notre adolescence collective, nos multiples tribulations en vacances, en week-end, en semaine, en soirée. Je crois qu'il est définitivement impossible d'écrire en quelques lignes tout ce que vous représentez pour moi. Marise, Carole, Pô Rousset, Pô Pif, Pô Roux, Jérémy, Antoine, Loïc, Cédric, Aurélien, Gregours, Pat, Simon : je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui sans vous.

Merci à ma formidable famille : Oncles et tantes, cousins et cousines, avec un double clin d'œil à mon ours de cousin, colloc' d'une époque et ami de la Tour : Binou. Chers grands-parents, merci pour votre sagesse qui m'accompagne au quotidien, ainsi que pour le soutien et l'intérêt que vous m'avez témoigné tout au long de ces études. Stéphane, merci d'être le meilleur frangin du monde, tout simplement. Ton goût pour les sciences a sûrement inspiré la voie que j'ai choisie de suivre. Et oui, tu as toujours été et tu resteras le modèle de ta petite sœur pot-de-colle. Mes chers parents, je ne pense pas pouvoir trouver les mots justes pour exprimer tout l'amour et toute l'admiration que j'ai pour vous. A vos côtés, je sais que rien

n'est impossible. Vous m'avez toujours guidé, soutenu, encouragé et accompagné tout en me laissant faire mes propres choix et sans jamais me fixer de limites. Je vous dois tout : ce que je suis et ce que j'aspire à être.

Merci à Vanja. Ta présence à mes cotés illustre particulièrement bien le fait que le doctorat représente pour moi bien plus qu'un diplôme... Merci pour ton soutien et pour toute l'attention que tu me portes. Merci pour tes efforts sans cesse renouvelés destinés à me donner confiance en moi. En partageant cette expérience de la thèse avec moi, tu as indéniablement contribué à ce travail en me donnant la force et le courage d'aller vers l'avant, afin de construire un avenir que je n'imagine pas sans toi.

« Je me représente la vaste enceinte des sciences, comme un grand terrain parsemé de places obscures et de places éclairées. Nos travaux doivent avoir pour but, ou d'étendre les limites des places éclairées, ou de multiplier sur le terrain les centres de lumières. L'un appartient au génie qui crée ; L'autre à la sagacité qui perfectionne. »

Denis Diderot

Pensées sur l'interprétation de la nature,
1753.

Abréviations

α -MSH	Alpha-mélanocyte stimulating hormone
AgRP	Agouti-related protein
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apo AIV	Apolipoprotéine A-IV
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
CACp	Cellules à axone court profondes
CACs	Cellules à axone court superficielles
CART	Cocaïne- and amphetamine- regulated transcript
CCK	Cholecystokinine
CCK _A /CCK _B	Récepteurs de la cholecystokinine
CG	Cellules granulaires
CM	Cellules mitrales
Cpe	Cellules à panache externe
CPm	Cellules à panache médianes
CPp	Cellules à panache profondes
CRF	Corticotropin-releasing factor
GABA	Gamma-amino-butyric acid
GLUT	Transporteur du glucose
GLP1/GLP2	Glucagon-like peptide 1/2
GRP	Gastrin-releasing peptide
HDM	Hypothalamus dorsomédian
HL	Hypothalamus latéral
HVM	Hypothalamus ventromédian
ICV	Intracérébroventriculaire
IR _A /IR _B	Récepteurs de l'insuline
IRS	Insulin receptor substrate
JAK2	Janus kinase 2
LepR	Leptin receptor
LiCl	Chlorure de lithium
MC3R/MC4R	Melanocortin Receptor 3/4
MCH	Melanin-concentrating hormone

mTOR	Mammalian target of rapamycin
NA	Noyau arqué de l'hypothalamus
NMB	Neuromédine B
NO	Neurorécepteurs olfactifs
NPV	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
NPY	Neuropeptide Y
OXA	Orexine A
OX1R/OX2R	Récepteurs de l'orexine
PG	Cellules périglomérulaires
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3'-kinase
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol-triphosphate
PKB/PKC	Protéines kinases B/C
POMC	Pro-opio-mélanocortin
PYY	Peptide tyrosine-tyrosine
S+	Stimulus renforcé
S-	Stimulus non-renforcé
SC	Stimulus conditionnel
SI	Stimulus inconditionnel
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	Signal transducers and activators of transcription 3
TOL	Tractus olfactif latéral

Introduction	1
Avant-propos	2
Chapitre I - Le système olfactif principal	4
A/ Organisation anatomo-fonctionnelle du système olfactif principal	4
1) L'épithélium olfactif principal	5
1.1) Organisation anatomique et histologique	5
1.2) La transduction du message olfactif	8
2) Les connexions épithélio-bulbaires	10
3) Le bulbe olfactif principal	12
3.1) Organisation anatomique et histologique	12
3.2) Synaptologie	16
3.3) Projections centripètes	19
3.4) Projections centrifuges	22
B/ Les tests comportementaux utilisés pour l'étude de l'olfaction	25
1) La tâche d'habituation et de déshabituation	25
2) La tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel	28
3) Le test de go/no-go	30
4) Bilan sur les tests olfactifs	32
4.1) Test psychophysiques et tests éthologiques	32
4.2) Tests spontanés et tests renforcés	32
4.3) Tests symétriques et tests asymétriques	33
5) L'aversion olfactive conditionnée	34
Chapitre II – Le système de régulation de l'homéostasie énergétique	37
1) Les signaux de la régulation de l'homéostasie énergétique	37
1.1) La mécanosensibilité	37

1.2) Les nutriments	38
1.3) Les hormones	40
1.3.1) Les hormones du tractus gastro-intestinal	41
1.3.1.1) La cholecystokinine	42
1.3.1.2) Les bombésines	43
1.3.1.3) La ghréline	44
1.3.2) Les signaux d'adiposité : l'insuline et la leptine	44
1.3.2.1) L'insuline	45
1.3.2.2) La leptine	51
2) Les centres intégrateurs de la régulation de l'homéostasie énergétique	56
2.1) L'hypothalamus	56
2.1.1) Le noyau arqué et le système des mélanocortines	57
2.1.2) L'hypothalamus latéral et les orexine	60
2.1.3) Le noyau paraventriculaire et le CRF	63
2.2) Le tronc cérébral	63
Chapitre III - Les interactions entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique	66
1) Substrats anatomiques et moléculaires	66
2) Interactions fonctionnelles	70
2.1) Les informations olfactives régulent le comportement alimentaire	71
2.2) Les états alimentaires et métaboliques modulent la perception olfactive	73
2.2.1) Le rôle de l'Orexine A dans la fonction olfactive	75
2.2.2) Le rôle de la leptine dans la fonction olfactive	77
2.2.3) Le rôle de l'insuline dans la fonction olfactive	78
3) Objectifs de la thèse	82
Résultats expérimentaux	84

Chapitre I - Modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques	85
1) Première étude	89
2) Résultat complémentaire	97
3) Deuxième étude	100
3.1) Le rat Zucker fa/fa : un modèle d'obésité	100
3.2) Le rat LouC : un modèle de résistance à l'obésité	101
Chapitre II - Modulation de la détection olfactive par les molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique	111
1) Troisième étude	112
2) Quatrième étude	120
Discussion générale	147
1) Résumé des principaux résultats expérimentaux	148
2) Considérations méthodologiques	151
2.1) Le protocole de restriction alimentaire et hydrique	151
2.2) La nature de la stimulation odorante	153
2.3) La voie d'administration centrale des molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique	156
2.4) L'analyse de la fonction olfactive	161
3) Implications fonctionnelles	164
Bibliographie	170

Introduction

Avant-propos

Tout organisme vivant assure son développement et sa survie par la consommation de matière organique. Au cours de l'évolution, une telle nécessité a conduit à l'apparition de fonctions spécialisées et de stratégies alimentaires permettant à l'organisme de garantir un approvisionnement en matière organique régulier. Chez les mammifères supérieurs, le comportement alimentaire est un comportement complexe, temporellement défini par l'accomplissement de différentes phases (Watts, 2000; Berthoud, 2002). Le comportement alimentaire débute par une phase d'initiation au cours de laquelle l'état interne de l'organisme permet de focaliser l'attention de l'organisme sur la nourriture. Les stimulations sensorielles distales par l'odorat et la vue sont alors suffisantes pour initier le comportement alimentaire, sans que l'état interne ne justifie aucun besoin homéostatique particulier. Une fois que l'attention sélective et la motivation pour se procurer de la nourriture sont obtenues, l'organisme entre alors dans la phase de recherche active de nourriture. Chez les animaux, cette phase de recherche est particulièrement longue et intense et repose à la fois sur des mécanismes sensoriels et sur des processus cognitifs de haut niveau tels que l'apprentissage et la mémoire. De nombreux animaux utilisent l'odorat pour identifier, discriminer et localiser les sources de nourriture. Lorsque de la nourriture disponible a été localisée sur la base d'indices sensoriels, la phase consommation de nourriture peut enfin commencer. Cette phase est caractérisée par de nombreux mouvements stéréotypés (mâcher, avaler) et par la perception continue des attributs sensoriels qui composent la nourriture ingérée. Si la phase de consommation a été suffisante et ininterrompue, alors le phénomène de satiété se met en place et l'individu rassasié arrête progressivement la consommation de nourriture. A l'issue de la phase prandiale, intervient la phase de terminaison du comportement alimentaire. Cette dernière phase n'est pas simplement représentée par l'arrêt de la prise alimentaire, mais est également caractérisée par la mise en mémoire des informations concernant les attributs sensoriels et les conséquences absorptives et post-absorptives de la nourriture ingérée, dont le rappel influencera la répétition du comportement alimentaire.

Toutes les phases du comportement alimentaire sont donc caractérisées par des interactions fortes entre la perception des attributs sensoriels de la nourriture et la nécessité de satisfaire les besoins énergétiques de l'organisme. Reposant sur le contexte large du comportement alimentaire, ce travail de thèse a été mené dans le but de comprendre les implications comportementales et les mécanismes sous tendant les interactions entre une modalité sensorielle largement impliquée dans les comportements alimentaires, l'olfaction, et la régulation de l'homéostasie énergétique.

La section introductive de ce manuscrit est organisée en trois parties distinctes : Le premier chapitre, s'intéresse plus particulièrement à l'organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif ainsi qu'au trajet emprunté par le message olfactif, de la périphérie jusqu'aux différentes structures cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive. Nous présenterons également les principales méthodologies comportementales développées à l'heure actuelle pour étudier la fonction olfactive. Le second chapitre est dédié à la présentation des principaux acteurs du système de régulation de l'homéostasie énergétique : Les signaux sensoriels, métaboliques et hormonaux ainsi que les mécanismes d'intégration de ces signaux par le système nerveux central. Le but de cette seconde partie est donc de présenter, de caractériser et de définir les rôles de ces signaux au sein du système de régulation de l'homéostasie énergétique. Le troisième et dernier chapitre est focalisé sur notre problématique de recherche. Il expose les multiples interactions qui existent entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique, à travers de nombreux travaux de la littérature qui ont mis en évidence les liens anatomiques, neurochimiques et comportementaux entre le système olfactif et les acteurs principaux de la régulation de la prise alimentaire.

Chapitre I - Le système olfactif principal

A/ Organisation anatomo-fonctionnelle du système olfactif principal

Le système olfactif est le système sensoriel permettant de détecter et d'analyser les molécules odorantes présentes dans l'air. Chez la plupart des espèces animales, les odeurs renseignent sur l'environnement et régissent de nombreux comportements tels que les interactions sociales, la reproduction et le comportement alimentaire, ainsi que les processus de mémoire et d'apprentissage qui leur sont associés. Le système olfactif est composé d'une structure périphérique permettant la chémoréception des molécules odorantes et de structures centrales assurant l'analyse et le traitement de l'information olfactive (Figure 1).

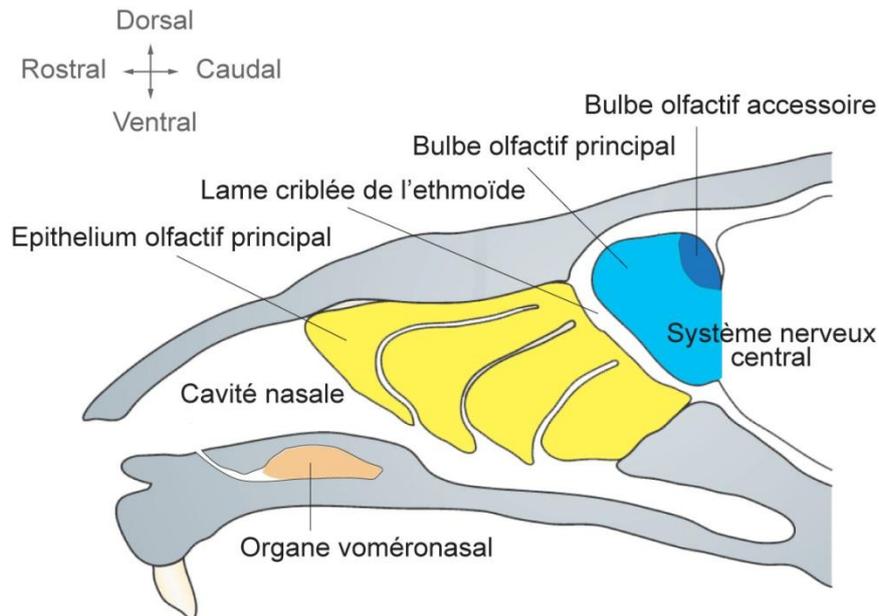


Figure 1 : Organisation anatomique des premiers étages du système olfactif.

Schéma d'une coupe sagittale de tête de rat. Le système olfactif périphérique est composé de l'épithélium olfactif principal et de l'organe voméronasal. Le premier étage du système olfactif central est constitué du bulbe olfactif principal et du bulbe olfactif accessoire. L'étage périphérique est séparé de l'étage central par la lame criblée de l'ethmoïde.

Pour la majeure partie des mammifères, le système olfactif est divisé en deux sous-systèmes : le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Le système olfactif principal est composé en périphérie de l'épithélium olfactif principal et du bulbe olfactif principal, premier centre intégrateur de ce sous-système. Le système olfactif accessoire est composé en périphérie de l'organe voméronasal, situé à la base de la cloison septale, et au niveau central, du bulbe olfactif accessoire localisé en position dorsale et caudale du bulbe olfactif principal. Il est classiquement décrit que le système olfactif principal permet de percevoir exclusivement les odeurs générales de l'environnement alors que le système olfactif accessoire permet de détecter spécifiquement les phéromones (Meisami and Bhatnagar, 1998; Firestein, 2001). Ainsi, le système olfactif principal se projette sur de nombreuses structures corticales et sous-corticales, alors que le système olfactif accessoire se projette de manière restreinte et privilégiée sur les aires cérébrales responsables des comportements sociaux et reproductifs. Toutefois, cette dichotomie entre le système olfactif principal et accessoire semble être aujourd'hui revisitée, puisque plusieurs études ont démontré que les deux systèmes sont sensibles à des signaux généraux et phéromonaux, et qu'ils se projettent sur des aires corticales distinctes mais également communes (Zufall and Leinders-Zufall, 2007; Ferrero and Liberles, 2009; Martinez-Marcos, 2009). Notre propos se centrera désormais sur le système olfactif classiquement décrit comme étant le système olfactif principal.

1) L'épithélium olfactif principal

1.1) Organisation anatomique et histologique

La cavité nasale est séparée en deux fosses nasales par une cloison centrale cartilagineuse, le septum. Les parois latérales sont pourvues d'excroissances cartilagineuses, les cornets. Chez le rat, chaque fosse nasale compte sept cornets olfactifs. Les nombreuses circonvolutions des cornets permettent d'augmenter la surface de contact entre l'air circulant à l'intérieur des cavités nasales et les épithéliums respiratoire et sensoriel.

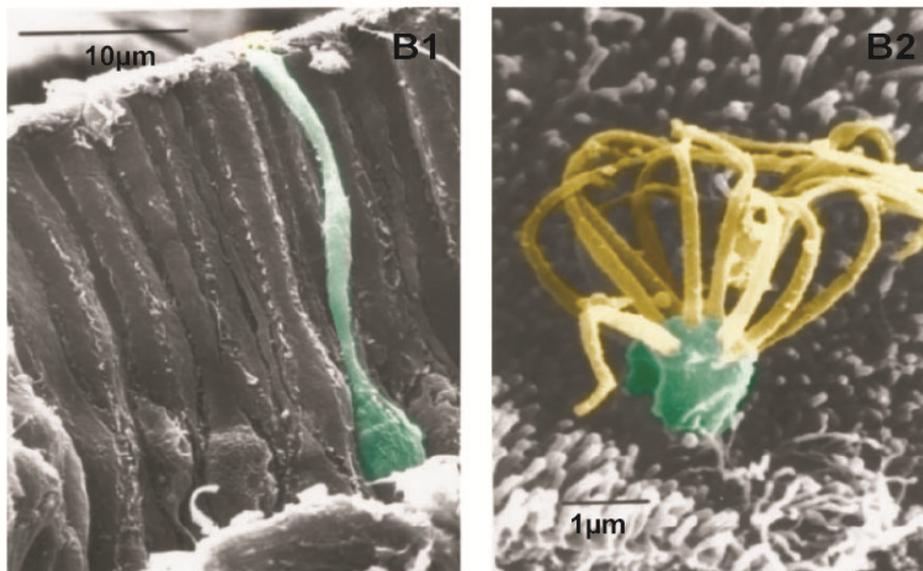
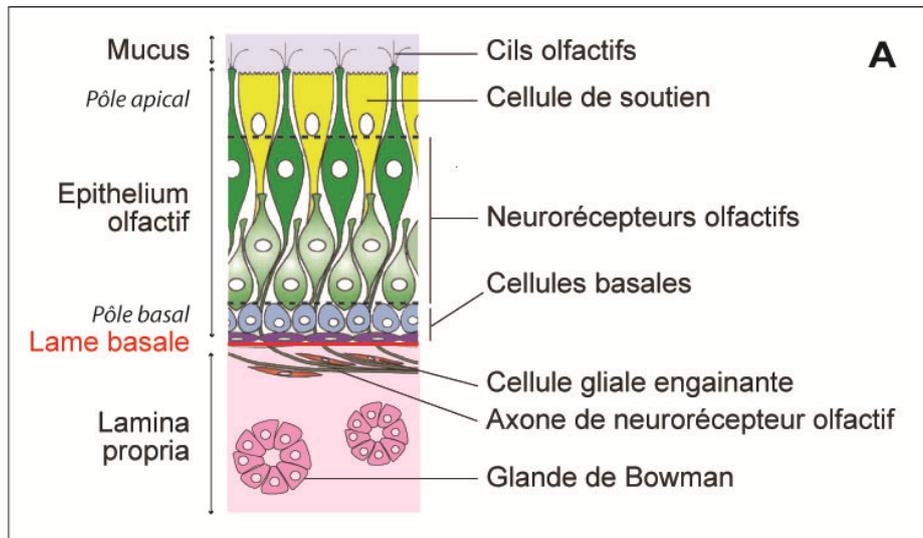


Figure 2 : Histologie de l'épithélium olfactif (D'après Schild & Restrepo 1998)

(A) Représentation schématique d'une coupe de muqueuse olfactive constituée d'un épithélium olfactif reposant sur une lame basale (ligne rouge) et recouvrant une *lamina propria*. Dans l'épithélium olfactif, les cellules de soutien traversent toute l'épaisseur de l'épithélium et leurs noyaux sont visibles dans la zone superficielle de l'épithélium. Dans la zone médiane de l'épithélium olfactif sont situés les noyaux des neurorécepteurs olfactifs matures (vert foncé) et immatures (vert clair). A la base de l'épithélium olfactif se trouvent les noyaux des cellules basales (les cellules globulaires et les cellules horizontales). Dans la *lamina propria*, les axones des neurorécepteurs olfactifs sont entourés des cellules gliales engainantes. Les glandes de Bowman situées dans la *lamina propria* sécrètent le mucus qui recouvre l'épithélium olfactif. **(B1)** Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée après fracture montrant l'organisation de l'épithélium olfactif ainsi que le soma et la dendrite apicale d'un neurorécepteur olfactif (en vert). **(B2)** Photographie en microscopie électronique à balayage prise à la surface de l'épithélium olfactif, illustrant la présence des microvillosités des cellules de soutien (non colorisés) et des cils (en jaune) ornant un bouton dendritique (en vert).

Le système olfactif périphérique est constitué de l'épithélium olfactif, un neuroépithélium sensoriel qui tapisse le fond des cavités nasales. L'avant des cavités nasales est recouvert d'un épithélium respiratoire, composé d'une monocouche de cellules ciliées qui filtrent, humidifient, réchauffent et dépolluent l'air inspiré. L'épithélium respiratoire est recouvert d'une couche de mucus sécrétée par les cellules à mucus. Dans l'épithélium olfactif, le mucus est sécrété par les glandes de Bowman.

L'épithélium olfactif, reposant sur une *lamina propria*, est composé de trois types de cellules (Figure 2A): Les neurorécepteurs olfactifs, les cellules basales et les cellules de soutien (Schwob, 2002).

Les neurorécepteurs olfactifs sont les neurones bipolaires responsables de la transduction de l'information olfactive. Les neurorécepteurs olfactifs traversent la totalité de l'épithélium olfactif (Figure 2B1). Leur corps cellulaire se situe dans la partie médiane de l'épithélium et envoie une dendrite vers le pôle apical, dont l'extrémité émet un bouton dendritique pourvu de nombreux cils olfactifs baignant dans le mucus (Figure 2B2). Les récepteurs moléculaires des odeurs sont localisés au niveau de la membrane ciliaire (Menco et al., 1997). Le corps cellulaire des neurorécepteurs olfactif émet, vers le pôle basal, un axone non-myélinisé qui achemine l'information olfactive vers le système nerveux central. Dès leur passage à travers la lame basale, séparant l'épithélium de la *lamina propria*, les axones des neurorécepteurs olfactifs se regroupent en faisceaux entourés de cellules gliales engainantes, traversent la lame criblée de l'ethmoïde au fond de la cavité nasale et contactent le bulbe olfactif, premier relais central de l'information olfactive (Astic and Saucier, 1986; Saucier and Astic, 1986; Astic et al., 1987).

Les neurorécepteurs olfactifs sont les seuls neurones de l'organisme en contact direct avec l'environnement. Leur emplacement superficiel les expose aux molécules odorantes mais également à toutes les molécules nocives ainsi qu'aux agents pathogènes en suspension dans l'air (Schwob, 2002). Face à ces agressions, l'intégrité du tissu épithélial est maintenue par un renouvellement continu des neurorécepteurs olfactifs, dont la durée de vie varie entre 30 et 120 jours (Crews and Hunter, 1994). Ainsi, au sein de l'épithélium cohabitent des neurorécepteurs matures et immatures. Le renouvellement des neurorécepteurs olfactifs est rendu possible par le maintien, à la base de l'épithélium olfactif, d'une population de cellules

souches qui se divisent pour donner naissance à de nouveaux neurones (Graziadei and Graziadei, 1979). Ces cellules souches basales sont de deux natures : *les cellules horizontales*, les plus profondes, en contact direct avec la lame basale ; et *les cellules globulaires*, qui se positionnent juste au dessus des cellules horizontales. Les cellules globulaires présentent un fort taux de prolifération et expriment des marqueurs de différenciation neuronaux (Schwob, 2002; Beites et al., 2005). En revanche, les cellules horizontales semblent être une population relativement quiescente et n'expriment pas de marqueurs neuronaux (Carter et al., 2004). Ces observations ont conduit au dogme selon lequel les cellules globulaires seraient les seuls progéniteurs multipotents de l'épithélium olfactif (Caggiano et al., 1994; Huard et al., 1998). Cependant, des données récentes indiquent que les cellules horizontales sont également capables de générer tous les types cellulaires, neuronaux et non-neuronaux, de l'épithélium olfactif adulte en conditions physiologiques et lors de lésions massives de l'épithélium (Leung et al., 2007; Iwai et al., 2008).

Les cellules de soutien sont des cellules pourvues de microvillosités qui participent au maintien de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'épithélium olfactif. En effet, les cellules de soutien assurent la cohésion cellulaire de l'épithélium grâce à la présence de jonctions serrées à leur pôle apical. De plus, par leurs activités enzymatiques et phagocytaires, les cellules de soutien assurent la détoxification et la clairance des neurorécepteurs apoptotiques (Schwob, 2002).

1.2) La transduction du message olfactif

Lors d'une inspiration, les molécules odorantes portées par l'air entrent et circulent dans la cavité nasale. Les odeurs sont des molécules volatiles et hydrophobes. Avant d'atteindre les récepteurs moléculaires aux odeurs portés par les cils des neurorécepteurs olfactifs (Menco et al., 1997), les molécules odorantes doivent traverser une couche aqueuse de mucus. C'est dans ce mucus que sont sécrétées les « olfactory binding proteins » (OBPs), de petites protéines hydrophiles capables de se lier de manière réversible aux molécules odorantes et de les transporter dans le mucus aqueux afin de faciliter leur accès aux récepteurs moléculaires aux odeurs (Tegoni et al., 2000; Breer, 2003). Notons toutefois, que les molécules odorantes les plus hydrophiles sont capables de traverser le mucus sans l'aide des OBPs. Plusieurs sous-types d'OBPs ont été identifiés et chacun de ses sous-types semble

avoir un profil d'affinité unique permettant de reconnaître un répertoire particulier d'odorants (Pevsner et al., 1988; Pes and Pelosi, 1995; Lobel et al., 2002). Ainsi, les OBPs jouent certainement un rôle plus important que le simple transport passif des odorants à travers le mucus et semblent constituer un filtre permettant la présélection des molécules odorantes avant l'accès aux récepteurs moléculaires aux odeurs (Tegoni et al., 2000; Breer, 2003).

Les récepteurs moléculaires aux odeurs, composés de sept domaines transmembranaires, sont couplés aux protéines G. Chez les mammifères, les récepteurs aux odeurs sont codés par plus de 1000 gènes disséminés sur un grand nombre de chromosomes et appartiennent à la plus large famille de récepteurs couplés aux protéines G, et probablement à la plus grande famille multigénique du génome (Buck and Axel, 1991; Zhang and Firestein, 2002). Il existe plusieurs voies de transduction chimioélectriques du message olfactif, mettant en jeu divers second messagers : les voies de l'AMPc, de l'IP3, du monoxyde de carbone et du monoxyde d'azote (Schild and Restrepo, 1998). Plusieurs études fonctionnelles chez la souris ont montré sans équivoque que l'inactivation des gènes impliqués dans la voie de l'AMPc conduisent à une anosmie totale (Brunet et al., 1996; Belluscio et al., 1998; Wong et al., 2000). Ainsi, nous nous focaliserons désormais sur l'indispensable voie de l'AMPc dont l'importance fonctionnelle est clairement avérée (Figure 3).

Les neurorécepteurs olfactifs expriment une protéine G spécifique à la voie olfactive, la protéine $G_{\alpha olf}$, qui est activée par la fixation d'une molécule odorante à son récepteur (Jones and Reed, 1989; Belluscio et al., 1998). La protéine $G_{\alpha olf}$ activée convertit le GDP en GTP. Le GTP active à son tour une adénylyl cyclase de type III, qui engendre la production d'AMPc à partir d'ATP (Wong et al., 2000). L'augmentation subséquente du taux d'AMPc intracellulaire entraîne l'ouverture d'un canal cationique aspécifique sensible aux nucléotides cycliques, qui permet l'entrée de calcium et de sodium ainsi que la sortie de potassium, et dépoliarise ainsi le neurorécepteur olfactif (Brunet et al., 1996; Frings, 2001).

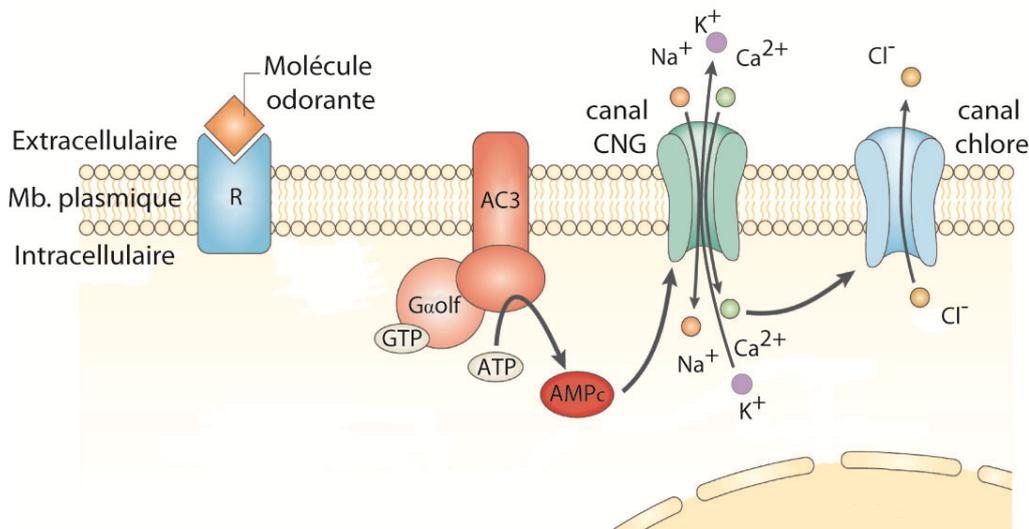


Figure 3 : La voie principale de transduction chimio-électrique olfactive (D'après Zou 2009)

La fixation d'une molécule odorante à son récepteur (R) active la protéine G α olf, qui provoque la conversion de l'ATP en AMPc par l'adénylyl cyclase de type III (AC3). L'AMPc permet l'ouverture d'un canal cationique sensible aux nucléotides cycliques (CNG), l'entrée d'ions Na⁺ et Ca²⁺ et la sortie d'ions K⁺. La dépolarisation du neurorécepteur olfactif ainsi générée est amplifiée par la sortie d'ions Cl⁻ rendue possible par l'ouverture d'un canal chlore activé par le Ca²⁺.

Cette dépolarisation est par ailleurs amplifiée par un courant sortant de chlore activé par le calcium (Kleene and Gesteland, 1991). La dépolarisation du neurorécepteur olfactif est transmise passivement de la dendrite apicale jusqu'au segment initial de l'axone, où sont émis des potentiels d'action en direction du bulbe olfactif (Firestein, 2001).

2) Les connexions épithélio-bulbaires

Bien qu'il existe plus de 1000 gènes codants pour les récepteurs moléculaires aux odeurs, il a été démontré que chaque neurorécepteur olfactif exprime un seul ou un tout petit nombre de récepteurs moléculaires aux odeurs. En effet, dans un neurorécepteur olfactif donné, l'expression d'un allèle d'un récepteur moléculaire aux odeurs réprime l'expression des autres gènes de la même famille (Chess et al., 1994; Serizawa et al., 2000). Face à l'étonnante diversité des récepteurs olfactifs, on peut se demander si leur répartition au sein de l'épithélium se fait selon une règle précise ou de manière aléatoire. Bénéficiant du séquençage des gènes codants pour les récepteurs moléculaires aux odeurs, ce sont des

études d'hybridation *in situ* réalisées avec un panel de sondes d'hybridation spécifiques à plusieurs récepteurs moléculaires qui ont permis de répondre à cette question. En effet, il apparaît que l'épithélium olfactif du rongeur est divisé en quatre zones topographiques symétriques selon l'axe rostro-caudal de la cavité nasale. Les nombreux neurorécepteurs olfactifs exprimant le même récepteur moléculaire aux odeurs sont confinés dans l'une de ces quatre zones et répartis de manière aléatoire au sein de cette même zone (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). La répartition spatiale de ces récepteurs est donc grossière avec seulement quatre domaines d'expression pour plus de 1000 récepteurs différents. Par le jeu des connexions épithélio-bulbaires, cette répartition spatiale relativement distribuée au niveau périphérique va devenir hautement organisée et stéréotypée au niveau du bulbe olfactif.

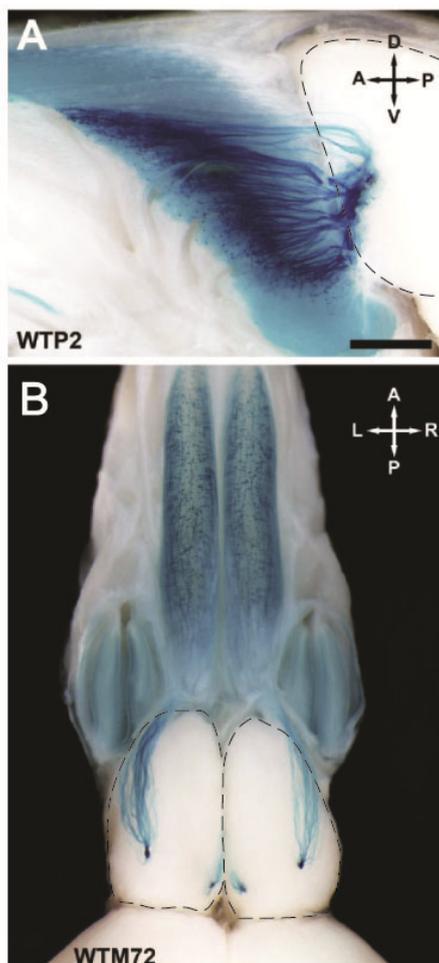


Figure 4 : Les connexions épithélio-bulbaires

(D'après Biju 2008)

(A) Photographie d'une vue sagittale du système olfactif d'une souris transgénique exprimant la protéine reportrice LacZ sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le récepteur moléculaire aux odeurs P2. Les neurorécepteurs olfactifs exprimant P2 (en bleu) sont disséminés sur une large portion de l'épithélium olfactif et leurs axones convergent sur un nombre limité de glomérules dans le bulbe olfactif (délimités par des pointillés).

(B) Photographie d'une vue dorsale du système olfactif d'une souris transgénique analogue, exprimant la protéine reportrice LacZ sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le récepteur moléculaire aux odeurs M72. Les neurorécepteurs olfactifs exprimant M72 (en bleu) sont disséminés sur une grande surface des deux cavités nasales et leurs axones convergent sur une paire de glomérules symétrique, un glomérule médian et un glomérule dorsal, dans chaque bulbe olfactif (délimités par des pointillés).

Orientation : A=antérieur, P=postérieur, D=dorsal, V=ventral, L=gauche, R=droite.

En effet, les quelques milliers de neurorécepteurs olfactifs exprimant un même récepteur moléculaire aux odeurs projettent sur un ou deux glomérules du bulbe olfactif (Figure 4) (voir le détail de l'anatomie bulbaire ci-après). Ces projections sont symétriques entre les deux bulbes olfactifs et reproductibles entre individus d'une même espèce (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Mombaerts et al., 1996; Biju et al., 2008). Lorsque le gène d'un récepteur moléculaire aux odeurs est génétiquement éteint, les axones des neurorécepteurs olfactifs sensés exprimer ce gène errent à la surface du bulbe sans jamais converger au sein d'un glomérule (Wang et al., 1998a). De plus l'altération ou la substitution du gène d'un récepteur moléculaire aux odeurs donné par le gène d'un autre récepteur moléculaire aux odeurs conduit à l'apparition de projections glomérulaires anormales (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998a; Feinstein et al., 2004). Bien que d'autres facteurs soient impliqués, il apparaît donc que les récepteurs moléculaires aux odeurs jouent un rôle important dans le guidage des axones des neurorécepteurs olfactifs jusqu'à leur cible glomérulaire au sein du bulbe olfactif (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998a; Zou et al., 2009).

3) Le bulbe olfactif principal

3.1) Organisation anatomique et histologique

Le bulbe olfactif est une structure paire formant, chez le rongeur, l'extrémité la plus rostrale du système nerveux central et constitue le premier relais central de l'information olfactive (Figure 1). Le bulbe olfactif présente une structure laminaire concentrique au sein de laquelle s'individualisent six couches de cellules et de fibres où se font la réception, le traitement et le relai des messages olfactifs (Figure 5).

De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve (Figures 5 et 6) :

- *La couche des nerfs*, une couche d'épaisseur variable constituée des faisceaux d'axones non-myélinisés des neurorécepteurs de l'épithélium olfactif (Shepherd, 1972; Whitman and Greer, 2009).

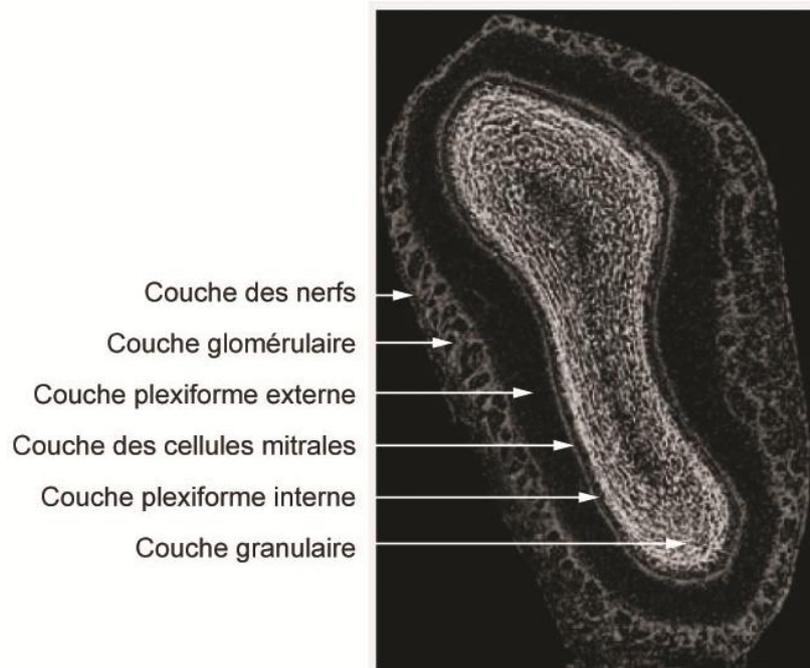


Figure 5 : La structure laminaire du bulbe olfactif principal (D'après Zou 2009)

Photographie en microscopie à fluorescence d'une coupe frontale de bulbe olfactif de rat. Les noyaux ont été marqués par un marqueur DAPI fluorescent. Le bulbe olfactif comporte six couches concentriques : la couche des nerfs, la plus externe ; la couche glomérulaire ; la couche plexiforme externe ; la couche des cellules mitrales ; la couche plexiforme interne ; et la couche granulaire, la plus profonde.

- *La couche glomérulaire*, constituée de structures sphériques d'environ 100µm de diamètre : les glomérules. Le bulbe olfactif contient environ 1800 glomérules chez la souris et, selon les estimations, jusqu'à 4000 glomérules chez le rat (Royet et al., 1988; Royet et al., 1998). Les glomérules sont les zones de contacts synaptiques entre les axones des neurorécepteurs de l'épithélium olfactif, les dendrites des cellules relais du bulbe olfactif, ainsi que les dendrites des cellules périglomérulaires (Pinching and Powell, 1971b). Il existe deux catégories de cellules relais : les cellules mitrales et les cellules à panache. On distingue trois types de cellules à panache en fonction de la position de leurs corps cellulaires : les cellules à panache externes, médianes et profondes. Les cellules à panache externes sont situées au niveau de la couche glomérulaire (Pinching and Powell, 1971a). Elles ont la particularité de ne pas être des neurones relais de l'information olfactive et semblent être impliquées dans des réseaux d'association intrabulbaires (Schoenfeld et al., 1985; Liu and Shipley, 1994; Belluscio et al., 2002). Chaque glomérule reçoit les dendrites d'environ 25 cellules mitrales et 50 cellules à

panache (Shepherd, 1972; Royet et al., 1998). Deux types d'interneurones juxta-glomérulaires cohabitent au sein de la couche glomérulaire : les cellules périglomérulaires et les cellules à axone court superficielles (Pinching and Powell, 1971a). Les cellules périglomérulaires sont des cellules de petit diamètre (8-10 μ m) dont l'arborisation dendritique se ramifie au sein d'un glomérule et dont l'axone se termine dans ou autour des glomérules adjacents. Les cellules à axone court superficielles, dont le diamètre moyen avoisine 15 μ m, disposent, contrairement à ce qu'indique leur nom, d'un axone long et ramifié qui peut s'étendre sur plusieurs centaines de micromètres et contacter plusieurs glomérules distants (Pinching and Powell, 1971b; Aungst et al., 2003; Hayar et al., 2004).

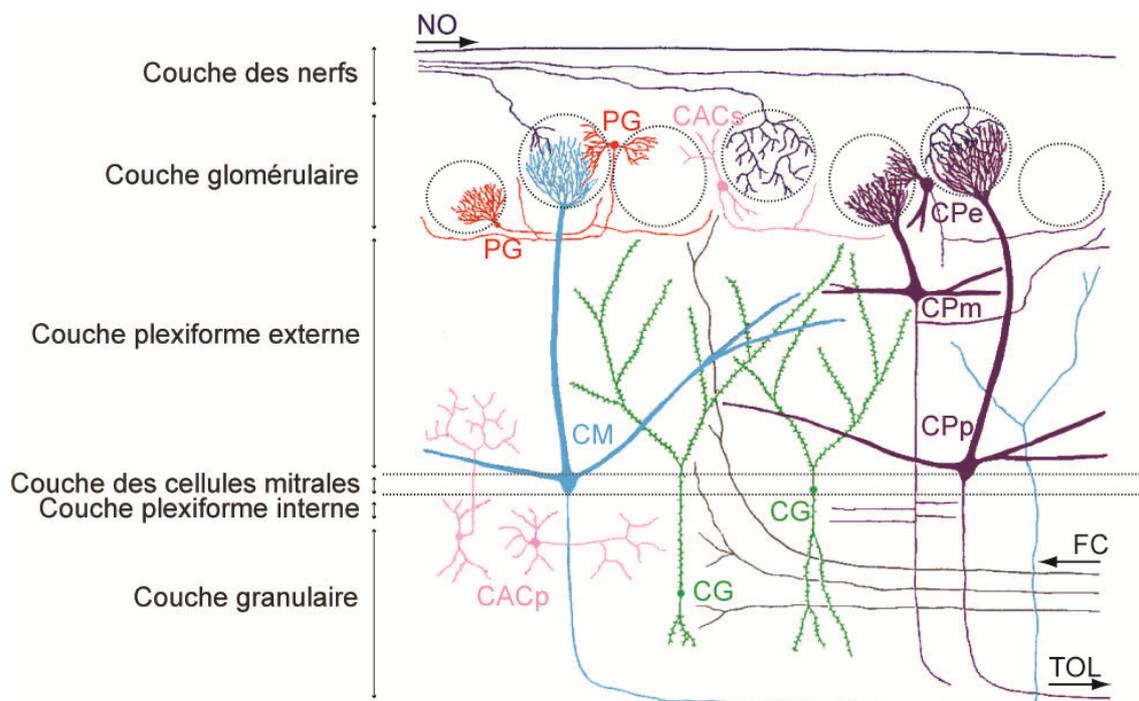


Figure 6 : Histologie du bulbe olfactif principal (D'après coloration de Golgi selon Shepherd 1972)

La couche des nerfs est composée des axones des neurorécepteurs olfactifs (NO) en provenance de l'épithélium olfactif. La couche glomérulaire est identifiable par la présence de structures sphériques : les glomérules (cercles en pointillés). Elle comporte diverses catégories cellulaires : les cellules périglomérulaires (PG), les cellules à axone court superficielles (CACs) et les cellules à panache externe (CPE). La couche plexiforme externe est composée de fibres et des corps cellulaires des cellules à panache médianes (CPM) et profondes (CPP). La couche des cellules mitrales est principalement constituée par l'alignement des corps cellulaires des cellules mitrales (CM). Les axones des cellules relais (les cellules mitrales et les cellules à panache) sortent du bulbe olfactif en formant le tractus olfactif latéral (TOL). La couche granulaire contient les corps cellulaires des cellules granulaires (CG) et des cellules à axone court profondes (CACp). Les fibres centrifuges (FC) en provenance d'autres régions cérébrales innervent la plupart des couches du bulbe olfactif.

Ce sont les corps cellulaires des interneurons juxta-glomérulaires ainsi que de fines lamelles gliales qui délimitent la structure sphérique du neuropile glomérulaire (Pinching and Powell, 1971b, a; Shepherd, 1972).

- *La couche plexiforme externe* est composée essentiellement de fibres et de contacts synaptiques. Elle est traversée radialement par les dendrites apicales (ou primaires) des cellules mitrales et des cellules à panache qui contactent les glomérules, et horizontalement par leurs dendrites latérales (ou secondaires) (Price and Powell, 1970a; Mori et al., 1983). La couche plexiforme externe comporte également les dendrites apicales des cellules granulaires ainsi que les terminaisons axonales de fibres centrifuges (Pinching and Powell, 1971b). C'est dans cette couche que l'on trouve le corps cellulaire des cellules à panache profondes et médianes (Shepherd, 1972; Mori et al., 1983; Whitman and Greer, 2009).

- *La couche des cellules mitrales* est composée des corps cellulaires des cellules mitrales disposés en une fine et unique rangée. Cette couche comporte également les corps cellulaires de cellules granulaires superficielles. Le nom des cellules mitrales fait référence à la ressemblance existant entre la forme de leur soma et une mitre, la coiffure liturgique des évêques et des abbés. Chez le rat, on compte entre 50 et 70000 cellules mitrales dont le diamètre moyen est compris entre 10 et 30µm (Price and Powell, 1970b; Shepherd, 1972; Royet et al., 1998; Whitman and Greer, 2009).

- *La couche plexiforme interne* est une fine couche dépourvue de corps cellulaires et composée de fibres. Elle est traversée par les axones et les collatérales d'axones des cellules relais, par les axones et les ramifications axonales de fibres centrifuges, ainsi que par les dendrites des cellules granulaires (Shepherd, 1972).

- *La couche granulaire* est la couche la plus profonde du bulbe olfactif, composée de grappes de corps cellulaires d'une autre catégorie d'interneurones : les cellules granulaires, qui représentent, de loin, les neurones les plus nombreux du bulbe olfactif. Les cellules granulaires ont un petit soma dont le diamètre est compris entre 6 et 10µm. Elles émettent deux types d'arborisations dendritiques : une large arborisation dendritique superficielle qui s'étend jusque dans la couche plexiforme externe, ainsi que des dendrites profondes plus fines qui s'étendent dans la couche granulaire (Price and Powell, 1970c). Les dendrites des

cellules granulaires sont pourvues de gemmules, de varicosités et d'épines sur lesquelles s'effectuent de nombreux contacts synaptiques avec les dendrites des neurones relais et les terminaisons axonales de fibres centrifuges en provenance d'autres régions cérébrales (Price and Powell, 1970a, b). C'est dans la couche granulaire que l'on trouve également les cellules à axone court profondes, dont le diamètre moyen du soma approche 15 μ m et dont l'axone se ramifie soit au sein de la couche granulaire, soit jusque dans la couche plexiforme externe (Price and Powell, 1970a). La couche granulaire est traversée par les axones des cellules relais qui se regroupent au cœur du bulbe olfactif pour former le tractus olfactif latéral, principale voie de sortie de cette structure (Shepherd, 1972; Whitman and Greer, 2009).

Contrairement aux neurones relais (les cellules mitrales et les cellules à panache), les interneurones périglomérulaires et granulaires ainsi que les cellules à axone court superficielles sont renouvelés tout au long de la vie de l'individu (Mizrahi and Katz, 2003; Lledo et al., 2006; Yang, 2008). Les astrocytes de la zone sous ventriculaire, qui borde les ventricules latéraux, se comportent comme des cellules souches neurales et sont capables de générer des précurseurs de neuroblastes (Doetsch et al., 1999). Les neuroblastes ainsi produits empruntent le flux rostral migratoire, une voie de migration tangentielle en direction du bulbe olfactif. Lorsque les neuroblastes arrivent au cœur du bulbe olfactif, ils migrent alors de manière radiale jusqu'à leur destination finale, au sein des couches glomérulaires ou granulaires (Lledo et al., 2006; Whitman and Greer, 2009).

3.2) Synaptologie

L'information olfactive issue de la périphérie est modulée principalement à deux niveaux du bulbe olfactif. D'une part, à l'entrée, par les nombreuses interactions entre les différents types cellulaires qui ont lieu au niveau du glomérule. D'autre part, au niveau de la couche plexiforme externe, par les interactions entre les dendrites des cellules relais et les dendrites des interneurones granulaires.

Chaque glomérule reçoit plusieurs milliers d'axones de neurorécepteurs olfactifs, formant des synapses asymétriques excitatrices glutamatergiques sur les dendrites des cellules mitrales, les dendrites des cellules à panache (externes, médianes et profondes) ainsi que sur les dendrites de certaines (20%) cellules périglomérulaires (Pinching and Powell, 1971a;

Didier et al., 1994; Ennis et al., 1996; Giustetto et al., 1997; Hayar et al., 2004; Wachowiak and Shipley, 2006). Les contacts axo-dendritiques qui s'établissent au sein des glomérules ont été largement décrits en microscopie électronique à transmission par Pinching et Powell dans les années 70 (Pinching and Powell, 1971b). Alors qu'il est très facile de reconnaître, sur un cliché de microscopie électronique, les terminaisons axonales des neurorécepteurs olfactifs, très denses aux électrons et très riches en vésicules synaptiques, la nature des dendrites impliquées dans ces contacts axo-dendritiques est beaucoup plus difficile à déterminer. C'est donc la combinaison d'études ultrastructurales et d'études électrophysiologiques qui permettent de révéler la nature des contacts axo-dendritiques qui s'établissent dans le neuropile glomérulaire et dont la multiplicité est encore l'objet de nombreuses études.

Les cellules mitrales et les cellules à panache reçoivent des contacts monosynaptiques des axones des neurorécepteurs olfactif (Figure 7) (Wachowiak and Shipley, 2006).

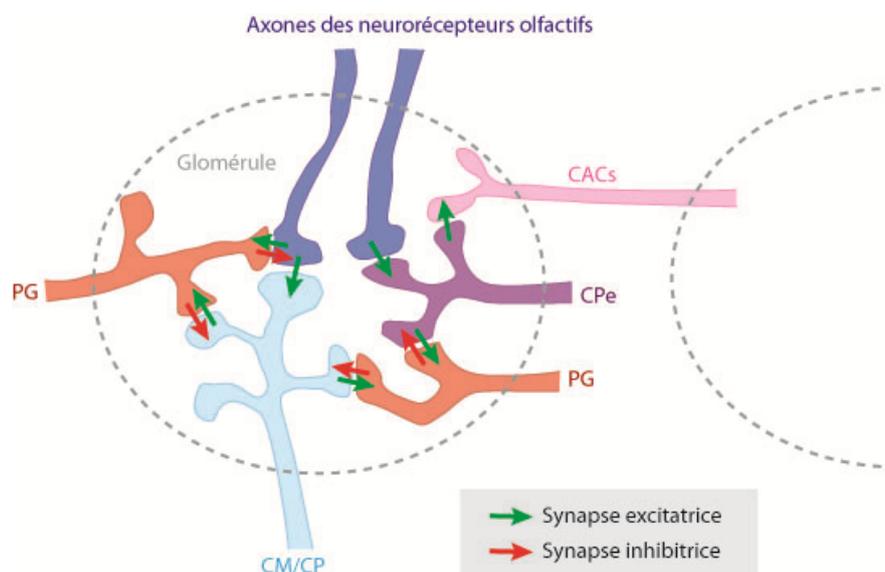


Figure 7 : Les interactions synaptiques glomérulaires.

Les glomérules (cercles en pointillés) sont constitués par les axones des neurorécepteurs olfactifs, les dendrites des cellules péri-glomérulaires (PG), des cellules à axone court superficielles (CACs), des cellules à panache externe (CPe), des cellules à panache médianes et profondes (CP) et des cellules mitrales (CM). Les synapses excitatrices glutamatergiques sont figurées par des flèches vertes et les synapses inhibitrices gabaergiques et dopaminergiques sont figurées par des flèches rouges.

Les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache forment des synapses asymétriques excitatrices glutamatergiques avec les dendrites des cellules périglomérulaires (Pinching and Powell, 1971a; Giustetto et al., 1997; Wachowiak and Shipley, 2006). Les cellules périglomérulaires forment en retour des synapses symétriques inhibitrices gabaergiques, souvent réciproques, sur les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache (Pinching and Powell, 1971a; Mugnaini et al., 1984; Wachowiak and Shipley, 2006). Les cellules périglomérulaires forment également des synapses GABAergiques et dopaminergiques inhibitrices sur les terminaisons axonales des neurorécepteurs olfactifs (Nickell et al., 1994; Bonino et al., 1999; Koster et al., 1999; Aroniadou-Anderjaska et al., 2000; Ennis et al., 2001; Wachowiak and Shipley, 2006). Les interneurons périglomérulaires sont donc capables de limiter la quantité d'information olfactive entrant dans le glomérule mais également de modérer la réponse des neurones relais à cette information. La majorité (80%) des cellules périglomérulaires et la totalité des cellules à axone court ne reçoivent pas de contacts direct mais des afférences di- ou polysynaptiques des neurorécepteurs olfactifs. Les cellules à panache externe reçoivent des afférences monosynaptiques des neurorécepteurs olfactifs et contactent par des synapses glutamatergiques excitatrices les cellules périglomérulaires et les cellules à axone court. Les cellules à panache externe sont donc les seules cellules de la couche glomérulaire capables d'exciter les cellules à axone court superficielles (Hayar et al., 2004). A leur tour, les cellules à axone court superficielles ont une action excitatrice glutamatergique sur les cellules périglomérulaires d'un ou de plusieurs glomérules voisins et distants (Aungst et al., 2003; Hayar et al., 2004; Wachowiak and Shipley, 2006). Ainsi, en favorisant l'activité inhibitrice des cellules périglomérulaires dans les glomérules voisins, les cellules à panache externe et les cellules à axone court sont impliquées dans des phénomènes d'inhibition latérale et restreignent l'étendue spatiale de l'activation glomérulaire en réponse aux odeurs (Aungst et al., 2003; Wachowiak and Shipley, 2006).

Dans la couche plexiforme externe, les dendrites latérales des cellules mitrales et des cellules à panache, s'étendent horizontalement sur plusieurs centaines de micromètres et établissent de nombreux contacts synaptiques dendro-dendritiques réciproques avec les dendrites des interneurons granulaires (Price and Powell, 1970a, b, c; Jahr and Nicoll, 1980; Mori et al., 1983; Sassoe-Pognetto and Ottersen, 2000). Ces contacts synaptiques sont constitués d'une

synapse asymétrique mitrale/granule directement adjacente à une synapse symétrique granule/mitrale (Price and Powell, 1970b, c). Ainsi, les dendrites latérales des cellules mitrales activées libèrent du glutamate sur les dendrites des cellules granulaires (Trombley and Shepherd, 1992; Isaacson and Strowbridge, 1998; Sassoe-Pognetto and Ottersen, 2000). Les cellules granulaires ainsi activées vont en retour libérer du GABA et inhiber les dendrites latérales des cellules mitrales (Jahr and Nicoll, 1982; Sassoe-Pognetto and Ottersen, 2000). Par ailleurs, compte tenu de leur supériorité numérique, une cellule granulaire excitée peut contacter et inhiber de nombreuses cellules mitrales adjacentes à la cellule mitrale responsable de son excitation. Ce phénomène d'inhibition latérale va permettre de restreindre l'étendue spatiale de l'activation des cellules mitrales en réponse aux odeurs (Yokoi et al., 1995).

Les différents types cellulaires du bulbe olfactif semblent s'organiser en colonnes fonctionnelles. En effet, chaque glomérule reçoit les terminaisons axonales de neurorécepteurs olfactifs portant le même récepteur moléculaire aux odeurs ; et les cellules mitrales connectées à un même glomérule ainsi que les interneurons qui en modulent l'activité sont regroupés spatialement (Buonviso and Chaput, 1990; Willhite et al., 2006). Ainsi, les phénomènes d'inhibition latérale engendrés au niveau de la couche glomérulaire par les cellules à panache externe, les cellules à axone court et les cellules périglomérulaires ainsi qu'au niveau de la couche plexiforme externe par l'interaction entre les cellules mitrales et les cellules granulaires vont permettre d'affiner et d'augmenter le contraste de la réponse évoquée par les odeurs au sein de chaque colonne fonctionnelle, qui est ensuite transmise aux étages cérébraux supérieurs (Mori et al., 1999; Wachowiak and Shipley, 2006).

3.3) Projections centripètes du bulbe olfactif principal

En sortie du bulbe olfactif, les projections glutamatergiques excitatrices des cellules relais suivent deux voies principales : une voie latérale et une voie médiane (Figure 8).

- Par la voie latérale, les axones myélinisés des cellules mitrales et des cellules à panaches forment le tractus olfactif latéral et se projettent directement sur plusieurs structures cérébrales : sur le tubercule olfactif, le cortex piriforme, mais également le cortex entorhinal,

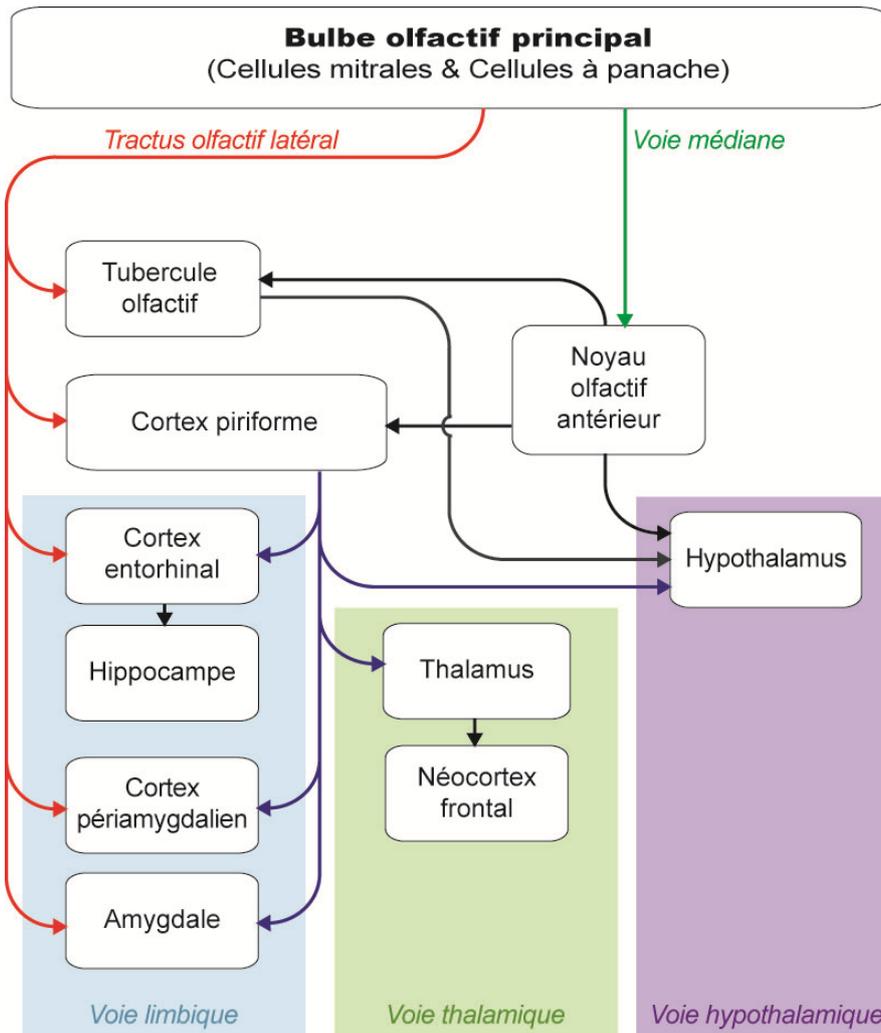


Figure 8 : Les projections centripètes ipsilatérales du bulbe olfactif principal.

Les axones des cellules relais du bulbe olfactif principal, les cellules mitrales et les cellules à panache, empruntent deux voies principales : par une voie latérale (en rouge), elles se projettent sur le tubercule olfactif, le cortex piriforme, le cortex entorhinal, le cortex péri-amygdalien et l'amygdale. Par une voie médiane (en vert), elles se projettent sur le noyau olfactif antérieur. Les projections vers le cortex entorhinal et l'hippocampe, le cortex péri-amygdalien et l'amygdale constituent la voie limbique. Les projections secondaires vers le thalamus et le néocortex constituent la voie thalamique et les projections secondaires vers l'hypothalamus forment la voie hypothalamique.

1972; Haberly and Price, 1977; Scott et al., 1980; Scott, 1981; Buonviso et al., 1991b; Astic et al., 1993; Zou et al., 2001; Ennis et al., 2007). La topographie fonctionnelle qui existe au sein du bulbe olfactif, à travers une organisation en colonnes, est conservée jusqu'au cortex olfactif. En effet, les cellules mitrales voisines et connectées au même glomérule, c'est-à-dire les cellules mitrales qui reçoivent de l'information des neurorécepteurs olfactifs portant le même récepteur moléculaire aux odeurs, conservent des zones de projections groupées au niveau

du cortex piriforme (Buonviso et al., 1991a; Buonviso et al., 1991b; Zou et al., 2001). En sortie du cortex piriforme, les axones des neurones efférents de ce cortex, les cellules pyramidales, se projettent bilatéralement vers le cortex entorhinal, l'amygdale, le thalamus et l'hypothalamus (Barone et al., 1981; Price et al., 1991; Astic et al., 1993). Le cortex entorhinal est la principale source d'entrée d'information dans l'hippocampe (Steward, 1976; Wyss, 1981). Les projections vers l'amygdale, le cortex entorhinal puis l'hippocampe constituent la composante limbique des projections du système olfactif, associée à la confrontation de l'environnement olfactif à l'expérience cognitive mnésique et émotionnelle passée. La composante thalamique des projections du système olfactif est constituée par les projections du cortex piriforme qui atteignent le thalamus et se projettent ensuite vers le néocortex frontal (Giachetti and MacLeod, 1977; Price and Slotnick, 1983; Price et al., 1991). Cette voie thalamo-corticale est associée à une analyse fine et aux diverses capacités de traitement de l'information olfactive. Ainsi, à la différence des autres voies sensorielles, le système olfactif possède la caractéristique unique de se projeter sur un cortex primaire avant de se projeter vers le thalamus.

- Par la voie médiane, les collatérales d'axones des cellules mitrales et des cellules à panache se projettent principalement sur le noyau olfactif antérieur (Heimer, 1968; Price and Powell, 1971; Shepherd, 1972; Haberly and Price, 1977; Scott et al., 1985; Buonviso et al., 1991b; Astic et al., 1993; Zou et al., 2001; Ennis et al., 2007). Le noyau olfactif antérieur constitue notamment une voie d'association interbulbaire, en se projetant au niveau du bulbe controlatéral par la commissure antérieure et le noyau olfactif antérieur controlatéral (Heimer, 1968; Price and Powell, 1971; Astic et al., 1993). Le noyau olfactif antérieur se projette également au niveau du cortex piriforme, du tubercule olfactif et de l'hypothalamus (Newman and Winans, 1980; Barone et al., 1981; Price et al., 1991; Astic et al., 1993). Les projections du noyau olfactif antérieur vers l'hypothalamus, additionnées à celle du tubercule olfactif et du cortex piriforme, forment la composante hypothalamique des projections du système olfactif (Ennis et al., 2007). Il est intéressant de noter ici la relation privilégiée que le système olfactif entretient avec l'hypothalamus. En effet, seulement deux synapses séparent l'entrée olfactive de cette région d'encéphalique (Astic et al., 1993). La composante hypothalamique est associée à la confrontation de l'environnement olfactif à

l'état interne, et en particulier, comme nous le verrons plus en détail par la suite, avec l'état alimentaire et métabolique de l'organisme.

3.4) Projections centrifuges

Les projections centrifuges du bulbe olfactif sont de trois natures : i) Les rétroprojections des structures centrales olfactives sur lesquelles se projette le bulbe olfactif ; ii) Les projections des systèmes neuromodulateurs constituées d'afférences cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques ; iii) Les projections de l'hypothalamus (Figure 9).

D'une manière générale, toutes les structures cérébrales sur lesquelles se projette le bulbe olfactif, l'innervent en retour. Ainsi le bulbe olfactif reçoit des projections centrifuges massives du cortex piriforme et du noyau olfactif antérieur ; modérées du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du cortex périamygdalien, de l'amygdale, ainsi que de plusieurs noyaux hypothalamiques (De Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984; Ennis et al., 2007). En particulier, le bulbe olfactif est la cible directe de fibres orexinergiques issues de l'hypothalamus latéral (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). Compte tenu de l'importance de l'orexine dans la régulation de la prise alimentaire et de l'interaction particulière du système orexinergique avec le bulbe olfactif, nous reviendrons sur ce point dans les autres parties de l'introduction.

Le bulbe olfactif est la cible de projections noradrénergiques issues du locus coeruleus (Broadwell and Jacobowitz, 1976; De Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984; Ennis et al., 2007). Il a été estimé qu'environ 40% des fibres noradrénergiques issues du locus coeruleus se projette au niveau du bulbe olfactif (Shipley et al., 1985). Environ un quart de ces fibres noradrénergiques contiennent également du neuropeptide Y (Bouna et al., 1994), un peptide largement impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et dont la fonction sera décrite dans la deuxième partie de l'introduction. Les fibres noradrénergiques innervent massivement les couches granulaire et plexiforme interne ; et plus modérément les couches des cellules mitrales et plexiforme externe (McLean et al., 1989). Le bulbe olfactif reçoit également de nombreuses fibres sérotoninergiques en provenance des noyaux du raphé médian et dorsal (Broadwell and Jacobowitz, 1976; De Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984; Astic et al., 1993; Ennis et al., 2007).

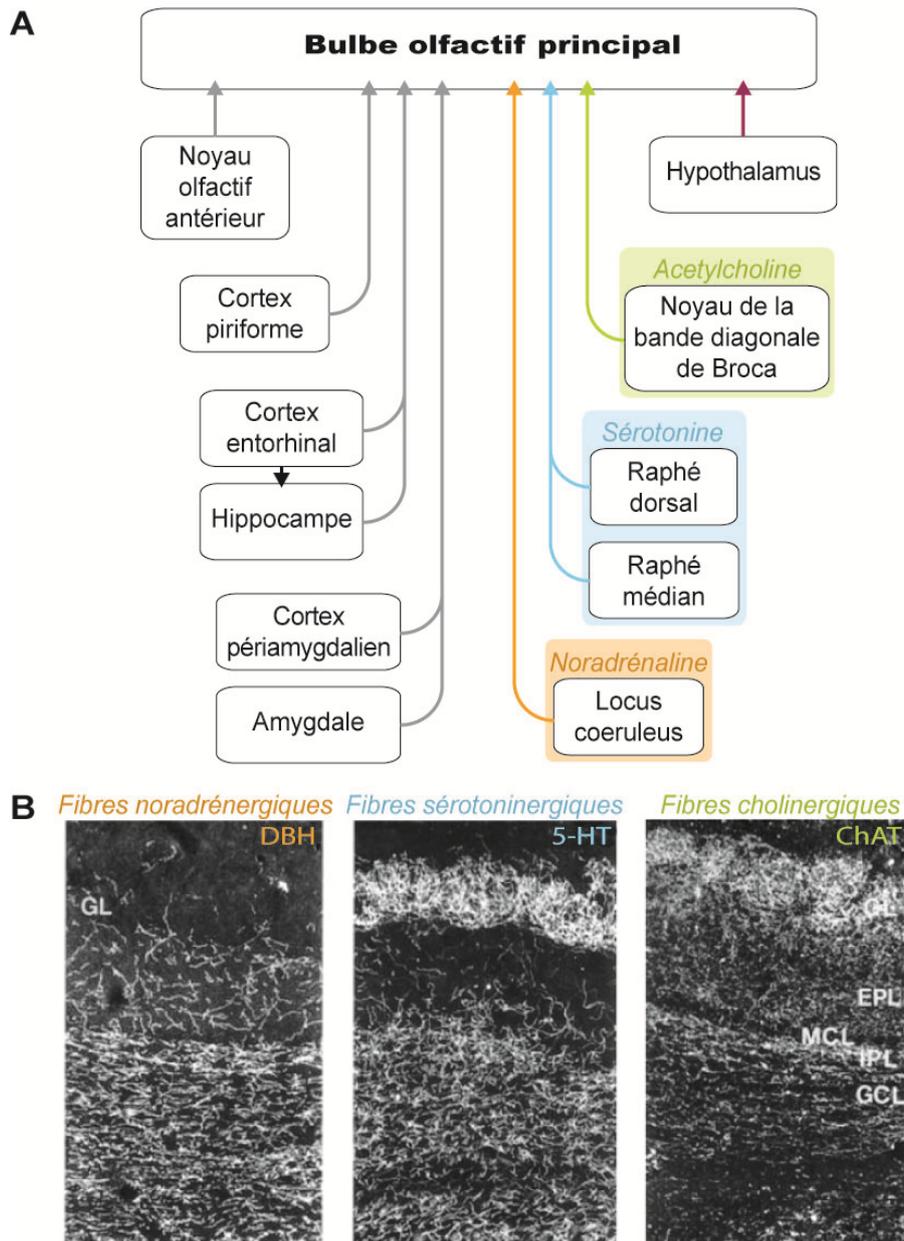


Figure 9 : Les projections centrifuges sur le bulbe olfactif principal (D'après Ennis 2007)

A) Représentation schématique des projections centrifuges vers le bulbe olfactif. Les rétroprojections des structures centrales olfactives sur lesquelles se projette le bulbe olfactif sont figurées en gris ; les afférences noradrénergiques issues du locus coeruleus sont figurées en orange ; les afférences sérotoninergiques issues du noyau du raphé sont figurées en bleu ; les afférences cholinergiques issues du noyau de la bande diagonale de Broca sont figurées en vert ; les projections hypothalamiques sont figurées en violet. **B)** Photos en microscopie à fluorescence de la répartition des fibres neuromodulatrices noradrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques révélées respectivement par une immunohistochimie pour la dopamine- β -hydroxylase (DBH), la sérotonine (5-HT) et la choline acetyltransferase (ChAT) au niveau des couches glomérulaire (GL), plexiforme externe (EPL), mitrale (MCL), plexiforme interne (IPL) et granulaire (GCL) du bulbe olfactif principal.

Les fibres sérotoninergiques atteignent massivement la couche glomérulaire ; et plus modérément les couches des cellules mitrales, plexiforme interne et granulaire (Broadwell and Jacobowitz, 1976; Ennis et al., 2007). Enfin, le bulbe olfactif est la cible de projections cholinergiques en provenance du noyau de la bande diagonale de Broca, un noyau du complexe du télencéphale basal (Broadwell and Jacobowitz, 1976; De Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984; Astic et al., 1993; Ennis et al., 2007). A l'exception de la couche des nerfs, les fibres cholinergiques atteignent la plupart des couches du bulbe olfactif, mais plus massivement les couches glomérulaires et plexiformes (Carson and Burd, 1980). D'un point de vue fonctionnel, ces trois systèmes neuromodulateurs semblent être largement impliqués dans les phénomènes d'apprentissage et de mise en mémoire des informations olfactives (Moriizumi et al., 1994; Ravel et al., 2003; Ennis et al., 2007; Veyrac et al., 2007).

B/ Aparté méthodologique : Les tests comportementaux pour l'étude de l'olfaction.

Les rongeurs sont des animaux macrosmates qui possèdent, en conséquence, un système olfactif particulièrement développé par rapport à la taille de leur cerveau. Chez ces animaux, l'odorat est une modalité sensorielle majeure qui intervient dans de nombreux comportements naturels tels que la recherche de nourriture, l'anticipation des dangers ou encore la communication entre individus. En laboratoire, les rats et les souris conservent un système olfactif particulièrement performant qui leur permet de réaliser des tâches cognitives complexes sur la base d'indices olfactifs (Slotnick, 2001). Ainsi, les rongeurs représentent un modèle de choix pour l'étude de l'olfaction. Comme de nombreux résultats qui seront exposés dans cette thèse reposent sur l'étude de la modalité olfactive au niveau comportemental, il convient à présent d'exposer la diversité des tests comportementaux classiquement décrits, afin de mettre en avant les éléments qui nous ont poussés à développer un paradigme comportemental original pour tester de manière fine et sélective la capacité de détection olfactive des rongeurs. La plupart des tests comportementaux utilisés à l'heure actuelle pour l'étude de la fonction olfactive permettent de tester les performances de discrimination et de détection olfactives. La discrimination olfactive représente la capacité à analyser l'aspect qualitatif des odeurs. En d'autres termes, c'est ce qui permet à un animal de différencier deux odeurs (par exemple, une odeur de banane et une odeur de menthe). En revanche, la détection olfactive est la capacité qu'a l'animal à analyser l'aspect quantitatif des odeurs, lui permettant de percevoir qu'une odeur est plus ou moins concentrée.

1) La tâche d'habituation / déshabituation

Ce test comportemental est classiquement utilisé pour déterminer la capacité de discrimination des rongeurs, en analysant les temps d'exploration pour une odeur B après habituation à une odeur A. Les animaux sont testés dans une cage expérimentale comportant en son centre un trou odorisé (Figure 10 A).

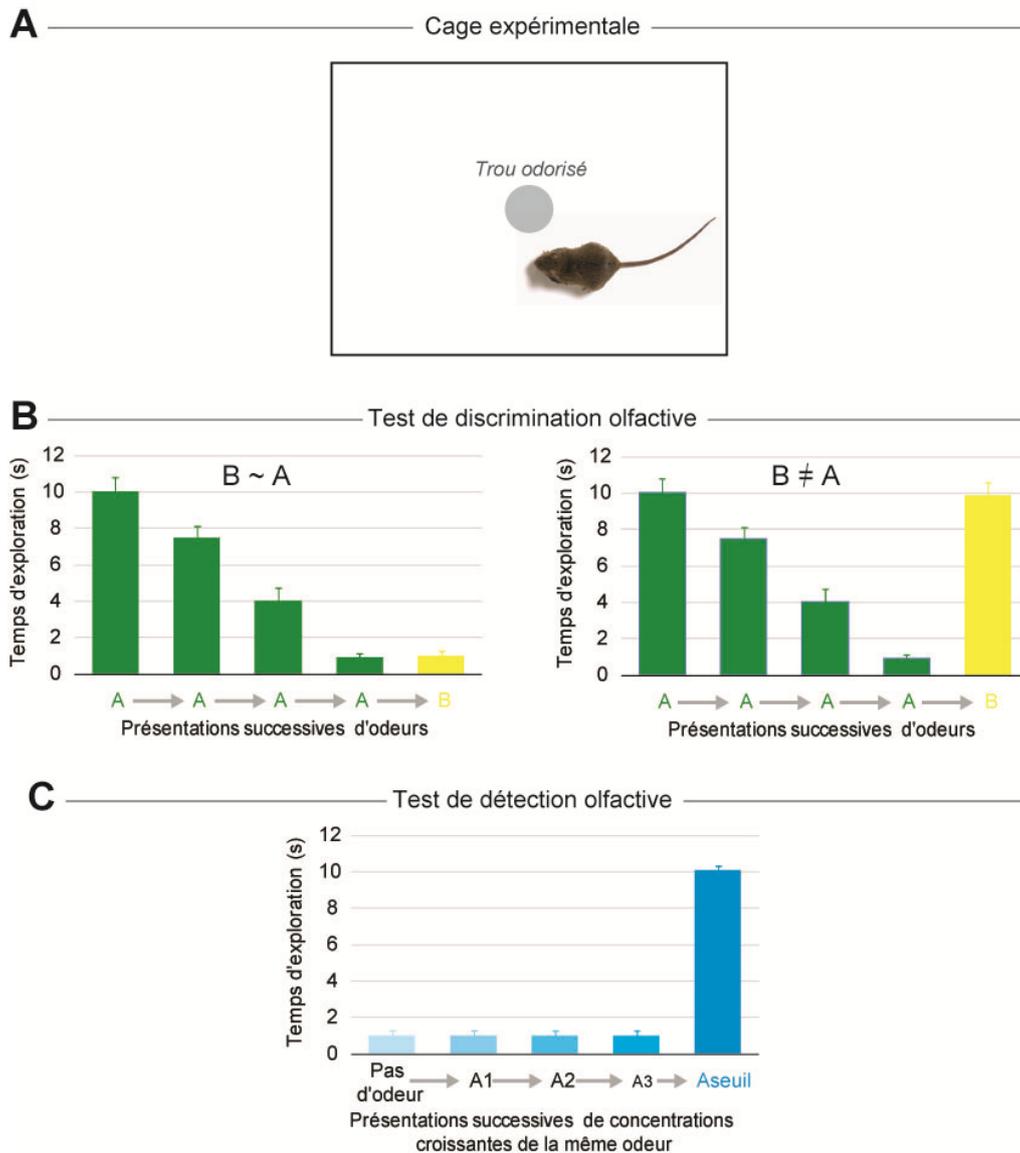


Figure 10 : La tâche d'habituation / déshabituation

(A) Représentation schématique de l'arène expérimentale. **(B) Discrimination olfactive.** Exemple de résultats obtenus pour la tâche d'habituation / déshabituation utilisée pour tester la capacité de discrimination olfactive des rongeurs. Lorsque les odeurs A et B sont perceptivement proches ($B \sim A$) et qu'elles ne sont pas discriminées (à gauche), le temps d'exploration de l'odeur B est faible. Lorsque les odeurs A et B sont perceptivement éloignées ($B \neq A$) et qu'elles sont discriminées (à droite), le temps d'exploration de l'odeur B est élevé. **(C) Détection olfactive.** Exemple de résultats pouvant être obtenus pour la tâche d'habituation / déshabituation utilisée pour tester la capacité de détection olfactive des rongeurs. L'odeur A est présentée successivement à des concentrations croissantes (A1, A2 et A3) qui ne sont pas détectées et Aseuil représente la concentration d'odeur A détectée. Les résultats sont exprimés en temps d'exploration (en secondes) mesuré lors de chaque présentation d'odeur.

L'animal est placé dans la cage et le temps d'exploration de l'odeur, correspondant au temps de flairage actif à moins de 1cm du trou odorisé, est mesuré. Lorsque l'odeur A est présentée pour la première fois, le temps d'exploration de cette odeur est très élevé (Figure 10 B). Puis, au fur et à mesure des présentations lors de plusieurs essais successifs, le temps d'exploration de l'odeur A diminue pour atteindre un niveau basal : c'est le processus d'habituation olfactive. Au cours de l'essai suivant, on propose à l'animal une odeur B (Figure 10 B). Si le temps de l'exploration de l'odeur B est très bas et égal au temps d'exploration de l'odeur A en fin d'habituation, alors l'animal ne discrimine pas les deux odeurs. Si au contraire, le temps de l'exploration de l'odeur B est très élevé et retourne au niveau du temps d'exploration de l'odeur A lors de sa première présentation, il y a alors déshabitude indiquant que l'animal discrimine les deux odeurs (Linster et al., 2001; Mandairon et al., 2009). Ce test est particulièrement intéressant pour étudier la capacité de discrimination d'un rongeur pour des paires d'odeurs structurellement très proches, comme c'est le cas pour les énantiomères de la carvone et du limonène. Il apparaît qu'un rat n'est pas capable de faire la différence entre deux énantiomères induisant des cartes d'activation glomérulaires similaires (Limonène (+) et Limonène (-)) alors qu'il discrimine deux énantiomères induisant des cartes d'activation glomérulaires distinctes (Carvone (+) et Carvone (-) ; (Linster et al., 2001). Ce test d'habituation/déshabitude olfactive est réalisable chez le rat (Linster et al., 2001) et la souris (Mandairon et al., 2009).

En outre, la tâche d'habituation / déshabitude peut être adaptée pour mesurer la capacité de détection olfactive des rongeurs. Pour cela, l'animal est placé dans la même arène expérimentale (Figure 10 A). Lors des deux premiers essais, ce trou ne comporte pas d'odeur et le temps d'exploration du trou est mesuré. Lors des essais suivants, le trou va être progressivement odorisé par des concentrations croissantes d'odorant (A1, A2, A3...). Tant que la concentration d'odeur est faible et en dessous du seuil de détection de l'animal, le temps d'exploration du trou odorisé reste identique au temps d'exploration du trou lorsqu'il était non-odorisé (Figure 10 C). Lorsque la concentration d'odeur atteint le seuil de détection olfactive de l'animal (Aseuil), l'animal va percevoir l'odeur et le temps d'exploration du trou odorisé va brusquement augmenter (Mandairon et al., 2009).

2) La tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel

Ce paradigme est basé sur un apprentissage associatif et permet d'étudier l'évolution de la capacité de discrimination des rongeurs au cours du temps. Les animaux sont confrontés à des paires d'odeur dont une odeur (S+) est systématiquement associée à une récompense et l'autre odeur (S-) n'est jamais associée à une récompense. La cage expérimentale contient deux trous (Figure 11 A1): un trou comportant un coton imbibé d'odeur S+ et une récompense alimentaire palatable (un gâteau sucré) enfouie dans de la litière ; un autre trou contenant un coton imbibé d'odeur S-, sans récompense et simplement rempli de litière. A chaque essai, l'animal est placé dans la cage expérimentale et l'on note le trou dans lequel il décide de creuser en premier. Si le premier trou exploré est le trou contenant la récompense et l'odeur S+, alors c'est une réponse correcte. S'il s'agit du trou sans récompense et contenant l'odeur S-, alors c'est un échec. Ainsi, par essais et erreurs, l'animal va apprendre à associer l'odeur S+ à la récompense, jusqu'à obtenir plus de 90% de bonnes réponses (Linster and Hasselmo, 1999; Mandairon et al., 2009). En fonction de la similarité des odeurs S+ et S-, l'augmentation des performances au cours des essais est plus ou moins rapide (Figure 11 B). Pour des odeurs très différentes, les animaux atteignent des scores de 90% de réponses correctes en quelques essais. En revanche, pour des odeurs perceptivement similaires, cet apprentissage nécessite de plus nombreux essais. Avec la tâche d'habituation/déshabituation, nous avons vu que les énantiomères de la carvone sont spontanément discriminés alors que les énantiomères du limonène ne le sont pas (Linster et al., 2001). L'apport d'un renforcement différentiel, associé à l'un des énantiomères du limonène, va permettre aux rats d'apprendre à discriminer le limonène (+) du limonène (-) (Linster et al., 2002). Cet apprentissage sera beaucoup plus court pour les odeurs dont les énantiomères sont spontanément discriminés (carvone (+) et carvone (-)) que pour des énantiomères qui ne sont pas spontanément discriminés (limonène (+) et limonène (-)) (Linster et al., 2002). Ce test permet donc d'étudier et de comparer un phénomène dynamique d'apprentissage olfactif associatif chez le rat, pour différentes paires d'odeurs (Linster and Hasselmo, 1999; Linster et al., 2002) et la souris (Mandairon et al., 2009).

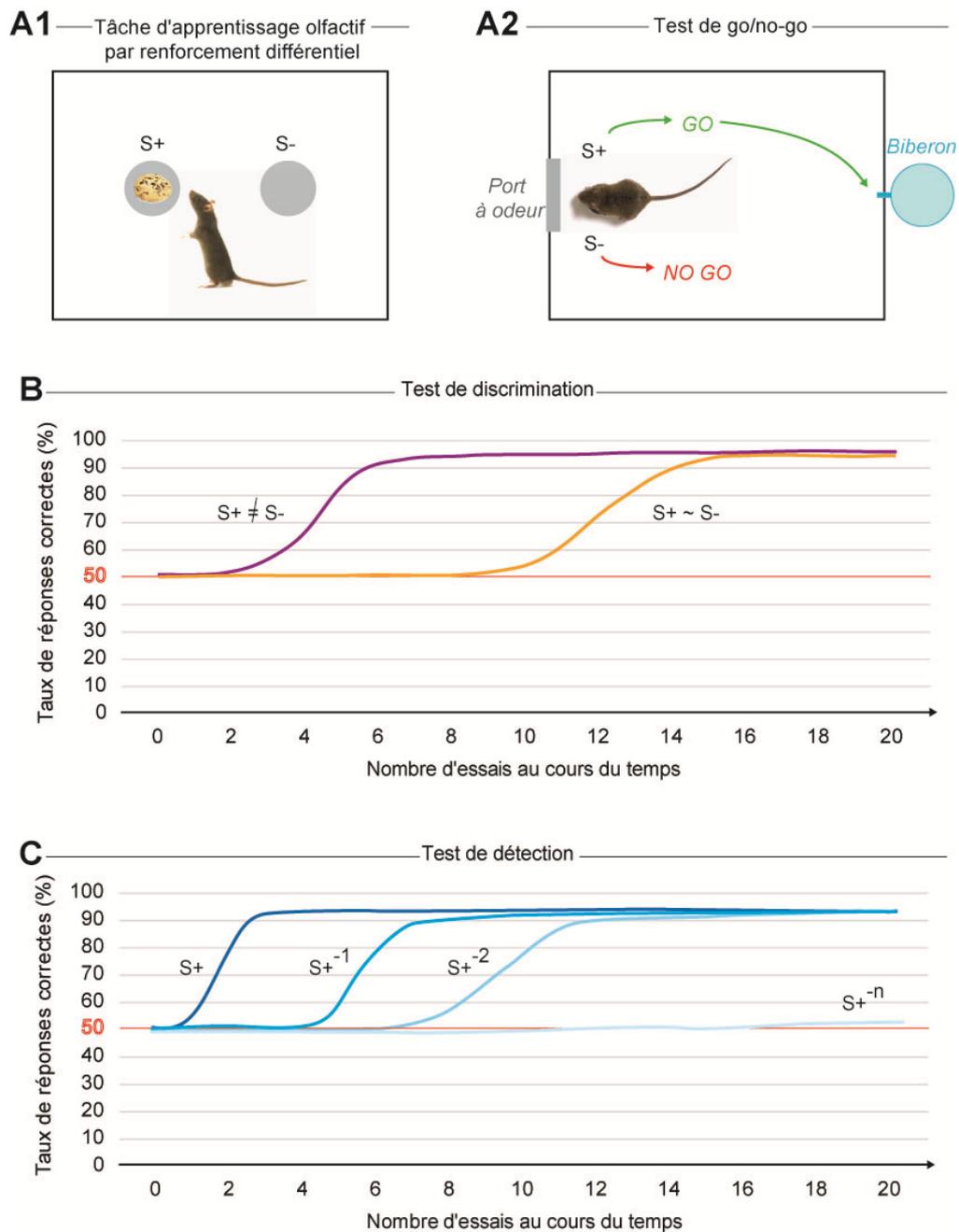


Figure 11 : La tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel et le test de go/no-go.

(A1) Représentation schématique de l'arène expérimentale. **(A2)** Représentation schématique de l'arène expérimentale utilisée pour le test de go/no-go. **(B)** Exemple de résultats obtenus pour la tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel et le test de go/no-go utilisés pour tester la capacité de discrimination olfactive des rongeurs, lorsque les odeurs S+ et S- sont perceptivement éloignées ($S+ \neq S-$) et qu'elles sont discriminées ; et lorsque les odeurs S+ et S- sont perceptivement proches ($S+ \sim S-$) et qu'elles ne sont pas discriminées. **(C)** Exemple de résultats obtenus pour la tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel et le test de go/no-go utilisés pour tester la capacité de détection olfactive des rongeurs. L'odeur S+ est présentée successivement à des concentrations décroissantes ($S+^{-1}$, $S+^{-2}$...) qui sont détectées par l'animal et $S+^{-n}$ représente une concentration d'odeur S+ qui n'est pas détectée par l'animal. Les résultats sont exprimés en taux de réponses correctes mesuré au fur et à mesure des essais successifs.

La tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel peut être adaptée à l'étude de la capacité de détection olfactive des rongeurs. Pour ce faire, l'animal est placé dans la même arène expérimentale comportant un trou avec une récompense alimentaire palatable enfouie dans de la litière et un coton imbibé d'odeur S+ ; et un autre trou ne contenant ni odeur ni récompense mais simplement de la litière (S-, Figure 11 A1). Par essais et erreurs, l'animal doit apprendre à creuser en premier le trou associé à l'odeur S+ et à la présence de la récompense, jusqu'à obtenir près de 100% de réponses correctes. Lorsque ce niveau de performance est atteint, alors la concentration de l'odeur S+ est graduellement diminuée au cours des essais successifs (Figure 11 C). Si pour une concentration plus faible (S⁺¹), le taux de réponses correctes est compris entre 80% et 100% de réponses correctes en quelques essais, alors les animaux sont encore capables de détecter l'odeur et une concentration encore plus faible (S⁺²) leur est proposée pour le bloc d'essais suivants. Lorsque, pour une concentration S⁺ⁿ, le taux de réponse correctes stagne autour du niveau de chance (50%) après un certain nombre d'essais, alors l'odeur S+ n'est plus détectée et la concentration S⁺ⁿ se trouve en dessous du seuil de détection olfactive des animaux (Fadool et al., 2004; Marks et al., 2009).

3) Le test de go/no-go

Le test de go/no-go repose sur un conditionnement opérant et permet d'étudier l'évolution de la capacité de discrimination des rongeurs au cours d'un apprentissage olfactif associatif. Dans le test de go/no-go, les animaux sont confrontés à des paires d'odeur dont une odeur (S+) est systématiquement associée à une récompense (une boisson sucrée : une solution de sucrose) et une odeur (S-) systématiquement associée à une punition (une boisson amère : une solution de quinine) (Martin et al., 2004). La cage expérimentale comporte un port à odeur par lequel circule un flux d'air pur permanent qui est séquentiellement remplacé par un flux d'air odorisé soit avec l'odeur S+, soit avec l'odeur S- (Figure 11 A2). Lorsque le rat explore le port à odeur, une odeur est délivrée par un olfactomètre qui contrôle de manière précise la durée de la stimulation. La cage expérimentale est également équipée d'un biberon par lequel sont délivrées les boissons sucrée et amère. Au cours de son apprentissage, l'animal doit apprendre à échantillonner le

trou odorisé puis à adapter sa réponse comportementale en fonction de l'odeur sentie. S'il s'agit de l'odeur S+, alors l'animal doit rejoindre le biberon pour boire sa récompense sucrée, c'est la réponse « go ». En revanche, s'il s'agit de l'odeur S-, alors la boisson amère punitive est délivrée et l'animal ne doit pas rejoindre le biberon, c'est la réponse « no-go ». Pour les rats naïfs, le taux de réponses correctes est très faible. Si les stimulations S+ et S- sont très différentes, au fur et à mesure de l'apprentissage, le taux de réponses correctes évolue rapidement pour atteindre 90% (Figure 11 B). A l'inverse, plus les odeurs S+ et S- sont similaires, plus cet apprentissage est long.

Le test de go/no-go existe sous plusieurs déclinaisons. La stimulation S- peut être associée à une punition (Martin et al., 2004), ou simplement à une absence de récompense (Lu and Slotnick, 1998; Bodyak and Slotnick, 1999; Ravel et al., 2003; Abraham et al., 2004). La récompense peut être sous forme de boisson pour des animaux soumis à une restriction hydrique (Lu and Slotnick, 1998; Bodyak and Slotnick, 1999; Abraham et al., 2004; Martin et al., 2004) ou sous forme de nourriture pour des animaux soumis à une restriction alimentaire (Ravel et al., 2003). De plus, la récompense peut être délivrée à divers endroits de la cage expérimentale par rapport au port à odeur : soit sur la face opposée (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004), soit juste à côté (Lu and Slotnick, 1998; Bodyak and Slotnick, 1999), soit dans le même trou (test de « stay/no-stay » (Abraham et al., 2004)), soit de part et d'autre par deux biberons distincts (Uchida and Mainen, 2003). Enfin le test de go/no-go peut être utilisé pour tester la capacité de discrimination des rats (Lu and Slotnick, 1998; Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004) et des souris (Bodyak and Slotnick, 1999; Abraham et al., 2004).

Le test de go/no-go peut également être utilisé pour tester la capacité de détection olfactive des rats (Lu and Slotnick, 1998) et des souris (Bodyak and Slotnick, 1999) (Figure 11 A2). Dans ce paradigme, les animaux doivent apprendre à générer la réponse « go » lorsqu'ils échantillonnent l'odeur (S+) délivrée par un olfactomètre et associée à une récompense hydrique ; et à générer la réponse « no-go » lorsqu'ils échantillonnent de l'air pur non-odorisé (S-), qui n'est pas associé à une récompense. Lorsque les animaux ont acquis cet apprentissage et que leur taux de réponses correctes dépasse les 90%, alors la concentration de l'odeur S+ est graduellement réduite au cours des sessions expérimentales (Figure 11 C). Si pour une concentration plus faible (S⁺¹) le critère de réussite de 90% est

atteint, cela indique que les animaux sont toujours capables de détecter cette odeur et une concentration encore plus faible (S^{+2}) est proposée lors de la session suivante. Lorsque, pour une concentration S^{+n} , le taux de réponse correcte reste stable autour de 50% (le niveau de chance) pour un grand nombre d'essais, cela indique que cette concentration d'odeur se trouve en dessous du seuil de détection olfactive des animaux (Lu and Slotnick, 1998; Bodyak and Slotnick, 1999).

4) Bilan sur les tests olfactifs

4.1) Test psychophysiques et tests éthologiques

L'ensemble des études comportementales peut être divisé en deux types : les études psychophysiques et les études éthologiques. Les études psychophysiques ont pour but de contrôler et de quantifier précisément tous les paramètres sensoriels, ainsi que les performances de l'animal par divers conditionnements (Exemple : le test de go/no-go). Les études éthologiques s'intéressent plus au comportement naturel de l'animal, au détriment du contrôle des paramètres expérimentaux (Exemple : La tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel). En effet, bien qu'il soit possible de mesurer précisément la durée de la stimulation ainsi que la concentration d'odeur délivrée par un olfactomètre utilisé pour les tests psychophysiques automatisés, il est beaucoup plus difficile d'évaluer la quantité de molécules odorantes qui s'échappe d'un pot rempli de litière flairé par un animal.

4.2) Tests spontanés et tests renforcés

Dans la quasi-totalité des études comportementales, c'est le renforcement (récompense ou punition) qui motive le comportement au cours de l'apprentissage. Il faut absolument prendre en compte l'impact potentiel de ces « instructions » sur les performances de l'animal. L'étude de la capacité de discrimination des rats pour une même paire d'odeur peut apporter deux réponses opposées en fonction de l'apport ou non d'un renforcement. En effet, la tâche d'habituation/déshabituation indique que les rats ne peuvent pas discriminer les énantiomères du limonène (Linster et al., 2001). En revanche, lorsqu'un renforcement est apporté à l'un des énantiomères, les rats deviennent capables de discriminer les énantiomères du limonène (Linster et al., 2002). C'est l'apport d'un renforcement qui va

permettre aux rats d'acquérir par apprentissage la capacité de discrimination de ces énantiomères. Ainsi, les performances olfactives peuvent changer drastiquement lorsqu'une récompense alimentaire est mise en jeu et ces différences sont exacerbées lorsque les états alimentaires et métaboliques des animaux sont manipulés. Un animal affamé sera beaucoup plus motivé à retrouver une récompense alimentaire qu'un animal rassasié. Ainsi, dans le cadre de notre thématique de recherche sur les interactions entre l'alimentation et la perception olfactive, l'apport d'une récompense alimentaire est évidemment à proscrire.

4.3) Tests symétriques et tests asymétriques

Les tests comportementaux peuvent être répartis en deux catégories : les tests asymétriques pour lesquels l'animal n'est confronté qu'à un seul et unique choix (la tâche d'habituation/déshabitude et la plupart des tests de go/no-go) et les tests symétriques pour lesquels l'animal a le choix entre plusieurs alternatives (comme la tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel). Dans un test comportemental asymétrique, les temps de réponse pour les stimuli récompensés et les stimuli non récompensés sont biaisés par l'anticipation de la récompense (Mainen, 2006; Quirk et al., 2009). Ainsi, il est préférable d'utiliser un test comportemental symétrique avec une tâche de choix à deux alternatives offrant à l'animal une récompense à chaque essai (Uchida and Mainen, 2003), car il permet de dissocier les effets propres de la difficulté de la tâche, des effets motivationnels (Mainen, 2006).

Ainsi, pour étudier l'influence des états alimentaires et métaboliques sur les capacités olfactives des rongeurs, nous avons choisi 1) de ne pas faire intervenir de renforcement alimentaire comme cela est le cas dans la tâche d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel ; 2) de ne pas utiliser un test asymétrique tel que la tâche d'habituation/déshabitude et la plupart des tests de go/no-go ; 3) de ne pas utiliser de paradigme de conditionnement opérant. En effet, les conditionnements opérants représentent des tâches complexes qui sont particulièrement intéressantes pour étudier l'évolution des capacités d'apprentissage olfactif au cours du temps, mais qui ne font pas partie de nos intérêts expérimentaux. De plus, les conditionnements opérants reposent généralement sur une réponse motrice (go/no-go) et nous souhaitons nous affranchir d'un éventuel biais de l'activité locomotrice. Ainsi, pour motiver le comportement de nos

animaux, nous avons choisi d'utiliser un conditionnement simple, rapide à induire et durable dans le temps : l'aversion olfactive conditionnée.

5) L'aversion olfactive conditionnée

Le terme « aversion » est issu du latin *aversio* qui signifie « action de se détourner ». L'aversion fait référence à la capacité d'un animal à associer les attributs sensoriels de la nourriture qu'il consomme aux conséquences de son ingestion. Si la consommation de nourriture engendre simplement un apport énergétique, alors cet aliment est évalué positivement, mémorisé et sera à nouveau consommé. En revanche, si la nourriture induit un malaise, alors cet aliment est évalué négativement, mémorisé et sera par la suite évité. D'un point de vue éthologique, l'aversion joue un rôle fondamental pour la survie de l'espèce, en permettant la sélection de nourritures comestibles et en garantissant l'évitement d'aliments toxiques. Ce comportement naturel est reproductible dans les conditions de laboratoire et constitue un modèle particulièrement pertinent pour étudier les bases neurobiologiques de la mémoire. Le principe de l'aversion conditionnée repose sur un conditionnement de type Pavlovien, qui consiste à présenter à l'animal une boisson ou une nourriture (stimulus conditionnel = SC) identifiable par ses caractéristiques sensorielles, et à faire suivre sa consommation par un malaise gastrique provoqué par une injection intrapéritonéale de chlorure de lithium (LiCl, stimulus inconditionnel = SI). Lorsque la nourriture est à nouveau présentée, l'association entre le SC et le SI se traduit par la manifestation de l'aversion, c'est-à-dire un refus total ou partiel de consommer à nouveau la boisson ou la nourriture. Contrairement aux conditionnements opérants, l'aversion conditionnée est un apprentissage rapide pour lequel une seule association entre le SC et le SI est suffisante pour induire une aversion robuste. L'aversion conditionnée est également un apprentissage durable, qui peut perdurer pendant plusieurs mois ou même plusieurs années. Différents paramètres influencent directement la force de l'aversion :

- 1) La nouveauté du SC. Plus le SC sera familier et plus les expériences d'ingestion passées auront été dénuées de conséquences négatives, plus il sera difficile d'induire

une aversion pour ce stimulus particulier. Ce phénomène porte le nom d'inhibition latente (Lubow and Moore, 1959).

- 2) L'intensité du SI. Plus la concentration de la solution de chlorure de lithium injectée sera forte, plus le malaise gastrique sera important et plus l'aversion sera forte (Miranda et al., 2002).
- 3) Le délai entre le SC et le SI. Plus le délai entre le SC et le SI sera long, plus l'aversion sera faible (Garcia et al., 1966).
- 4) Les caractéristiques sensorielles du SC. Toutes les caractéristiques sensorielles du SC ne sont pas équivalentes pour induire une aversion, et nous comparerons ci-après la capacité de deux caractéristiques sensorielles, le goût et l'odeur, à induire une aversion conditionnée.

Le goût est une caractéristique sensorielle particulièrement fiable pour l'établissement d'une aversion conditionnée. En effet, l'association entre une boisson présentant un goût (sucré, pour une solution de saccharine) et un malaise gastrique donne lieu à une aversion forte et durable en un seul conditionnement, même lorsqu'un délai de plusieurs heures sépare le SC du SI (Garcia et al., 1966). Ainsi, l'aversion gustative conditionnée représente un modèle de prédilection pour l'étude des mécanismes neurochimiques sous-tendant l'établissement d'une trace mnésique. La capacité de l'odeur à s'associer à un malaise gastrique pour établir une aversion a été évaluée de manière incomplète pendant très longtemps. Les études pionnières portant sur l'étude de l'aversion olfactive conditionnée ont été réalisées en disposant un papier filtre odorisé autour d'un biberon d'eau pure. Ainsi, les animaux reçoivent une stimulation odorante lorsqu'ils s'approchent pour consommer l'eau du biberon. Avec un tel dispositif, il est nécessaire de répéter l'appariement SC/SI plusieurs fois avant d'obtenir une aversion. De plus, l'aversion olfactive conditionnée se manifeste uniquement dans le cas où le SI est présenté en contiguïté temporelle du SC (Palmerino et al., 1980). Ces données laissent penser que l'odeur serait un stimulus moins efficace pour permettre la mise en place d'une aversion conditionnée. Cependant, d'autres études ont complété ces premières observations. Lorsque l'odeur est directement diluée dans l'eau de boisson, à une concentration qui ne confère pas de propriétés gustatives à la boisson, il

devient possible de générer une aversion olfactive conditionnée puissante et durable, équivalente à l'aversion gustative conditionnée obtenue lors de la présentation d'une solution sucrée. En effet, en utilisant une boisson odorisée, l'aversion olfactive conditionnée s'établie en un seul conditionnement, supporte un délai SC/SI de plusieurs heures et dure plusieurs semaines (Slotnick et al., 1997; Chapuis et al., 2007; Desgranges et al., 2009).

Chapitre II - Le système de régulation de l'homéostasie énergétique

Le système de régulation de l'homéostasie énergétique est un système distribué qui implique une relation étroite entre plusieurs structures cérébrales et de nombreux organes périphériques. Il est également redondant, faisant intervenir plusieurs sens, nutriments, hormones et neuropeptides. Cette organisation permet d'assurer la régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle, à court et à long terme.

Afin d'assurer la régulation de l'homéostasie énergétique, le cerveau doit recevoir des informations continues sur 1) la quantité d'énergie disponible sous forme de nutriments stockés dans divers organes ; 2) la composition quantitative et qualitative de la nourriture qui vient d'être ingérée ; 3) la quantité de nutriments présents dans la circulation sanguine ; 4) ainsi que les besoins énergétiques chroniques et aigus de tous les tissus de l'organisme.

Ces informations sont émises sous la forme de nombreux signaux nerveux et humoraux qui sont intégrés par le cerveau. En retour, le cerveau permet la sécrétion de neuropeptides et d'hormones clés du métabolisme énergétique et active certaines voies neurales qui auront pour but de garantir la stabilité de la masse corporelle malgré des apports et des dépenses énergétiques imprévisibles et irréguliers.

1) Les signaux de la régulation de l'homéostasie énergétique

1.1) La mécanosensibilité

La distension du tractus gastro-intestinal qui a lieu lors du passage du bol alimentaire est détectée par les terminaisons nerveuses du nerf vague et participe à la mise en place de la sensation de satiété (Berthoud and Powley, 1992; Bado et al., 1998; Phillips and Powley, 2000). Cette information est relayée dans le système nerveux central au niveau du noyau du tractus solitaire qui communique de façon réciproque avec l'hypothalamus. La

mécanosensibilité permet d'évaluer la quantité d'aliments consommés, c'est ensuite un mécanisme de détection des nutriments qui va permettre d'évaluer la composition qualitative de la nourriture ingérée.

1.2) Les nutriments

Conjointement à l'évaluation de la qualité sensorielle, le système gustatif semble jouer un rôle dans l'évaluation de la composition énergétique de la nourriture ingérée. En effet, en plus d'une sensibilité classiquement décrite aux saveurs amères, sucrées, salées et acides (Chandrashekar et al., 2000; Nelson et al., 2001; DeSimone and Lyall, 2006) ; il existe des familles de récepteurs gustatifs spécifiques capables de reconnaître les acides aminés, les acides gras et les glucides complexes (Nelson et al., 2002; Sclafani, 2004; Matsumura et al., 2009; Wellendorph et al., 2009). De tels récepteurs sont localisés au niveau des bourgeons du goût à la surface de la langue, mais également tout le long du tractus gastro-intestinal, ainsi qu'au niveau de divers organes comme le foie, le pancréas, le muscle et le tissu adipeux (Figure 12, Wellendorph et al., 2009).

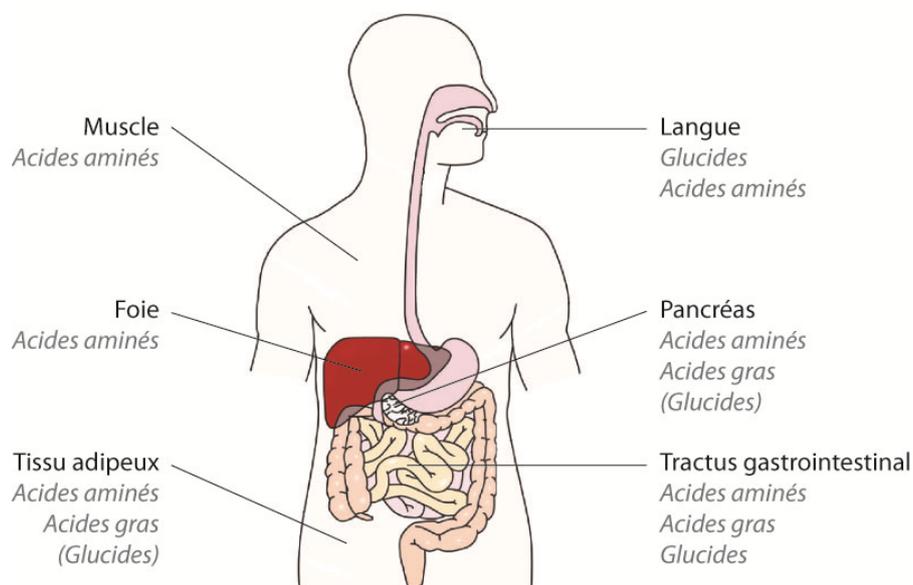


Figure 12 : La chémosensibilité des nutriments. (D'après Wellendorph 2009)

Représentation schématique de la répartition des chémorécepteurs des nutriments dans le tractus gastro-intestinal et les organes/tissus impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ces récepteurs sont sensibles aux glucides, aux acides aminés et aux acides gras. Les parenthèses indiquent une sensibilité aux produits de dégradation et donc une sensibilité indirecte aux glucides.

Ainsi, aux différentes étapes de la digestion et de l'absorption, ces chémorécepteurs informent le système nerveux central de la présence de nutriments dans le canal alimentaire en activant certains nerfs dont le nerf vague qui innerve largement les chémorécepteurs de la sphère intestinale et qui permet l'intégration de ces signaux au niveau du tronc cérébral (Berthoud and Neuhuber, 2000).

Par ailleurs, les nutriments présents dans la circulation sanguine peuvent eux-mêmes informer le système nerveux central de l'état alimentaire de l'organisme, en traversant la barrière hématoencéphalique pour pouvoir directement modifier le comportement alimentaire (Bado et al., 1998; Berthoud and Morrison, 2008). Les variations de glycémie induisent des changements rapides du comportement alimentaire. En effet, il a été démontré qu'une chute de la glycémie précède le début de chaque repas, participant ainsi à l'initiation de la prise alimentaire (Louis-Sylvestre and Le Magnen, 1980; Campfield et al., 1985). Cet effet est orchestré au niveau central, puisque l'injection dans les ventricules cérébraux de 2-deoxy-D-glucose, un analogue du glucose capable d'inhiber le métabolisme glucidique, induit une augmentation de la prise alimentaire (Miselis and Epstein, 1975; Engeset and Ritter, 1980). Le métabolisme des acides gras est également impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. L'administration centrale d'acide oléique, un acide gras à longue chaîne, induit une diminution de la prise alimentaire (Obici et al., 2002b). Les administrations périphériques et centrales d'inhibiteurs de l'enzyme de synthèse des acides gras, en induisant l'accumulation de malonyl CoA (un métabolite de synthèse des acides gras), conduisent à une diminution drastique et dose-dépendante de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Loftus et al., 2000; Clegg et al., 2002; Sandoval et al., 2008). De la même manière, la composition de la nourriture en acides aminés et en protéines semble avoir un impact important sur la régulation de la prise alimentaire. Les régimes hypo-protéinés augmentent la prise alimentaire alors que les régimes hyper-protéinés la diminuent (White et al., 1994; Zhang et al., 2007; Sandoval et al., 2008). Au niveau central, l'injection intracérébroventriculaire d'un acide-aminé, la leucine, diminue efficacement la prise alimentaire et la masse corporelle (Cota et al., 2006).

Les nutriments représentent donc des signaux d'abondance énergétique qui sont intégrés par le système nerveux central pour réguler la prise alimentaire. Les nutriments

jouent également un autre rôle fondamental, en stimulant la libération d'hormones clés de la régulation de l'homéostasie énergétique.

1.3) Les hormones

De multiples hormones participent à la régulation de l'homéostasie énergétique. Nous n'en présenterons ici que les principaux exemples afin d'illustrer la richesse de ce système et de permettre sa compréhension globale, sans toutefois en fournir une liste exhaustive, par soucis de clarté. La figure 13 présente une vue d'ensemble de ce système hormonal.

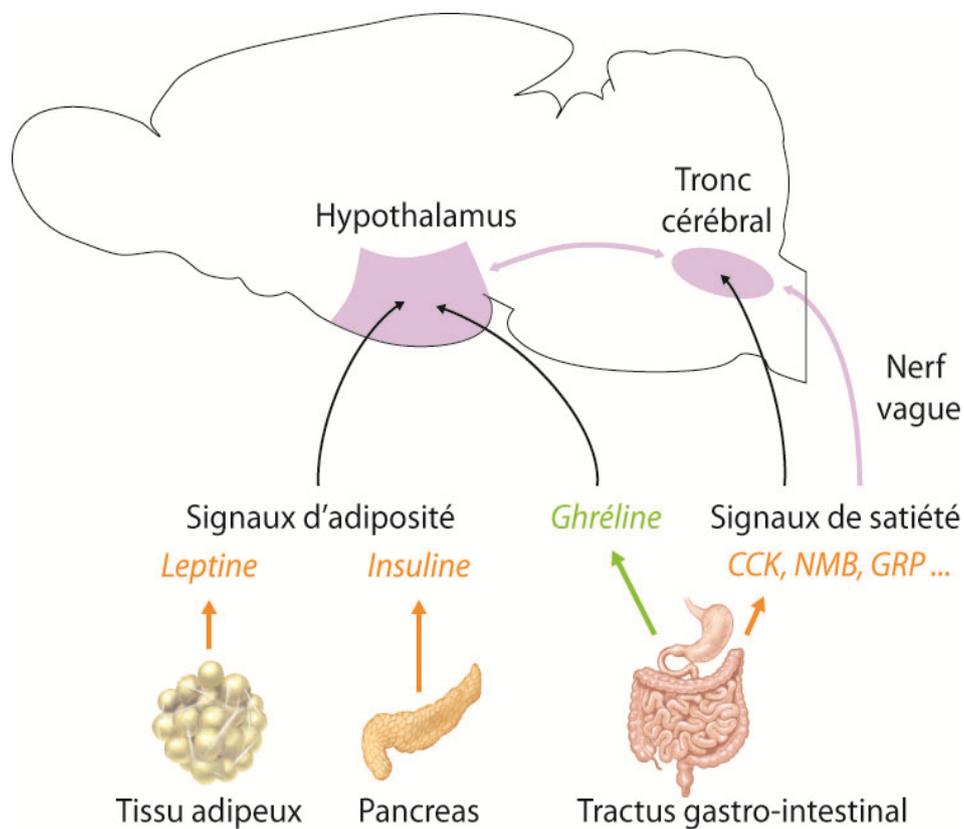


Figure 13 : Vue d'ensemble du système hormonal de régulation de l'homéostasie énergétique

Les signaux anorexigènes sont représentés en orange : leptine, insuline, cholecystokinine (CCK), neuroméline B (NMB) et gastrin-releasing peptide (GRP). L'unique signal orexigène, la ghréline, est représenté en vert. Les principales voies nerveuses sont représentées par des flèches violettes et les principales voies humorales sont représentées par des flèches noires.

Les hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire seront divisées en deux catégories : 1) les hormones du tractus gastro-intestinal qui régulent principalement l'homéostasie énergétique à court terme en informant le système nerveux central des nutriments qui viennent d'être ingérés. Nous nous intéresserons dans cette partie à la cholecystokinine, l'hormone de satiété prototypique ; les bombésines, des hormones de satiété qui présentent une relation intéressante avec le système olfactif que nous évoquerons par la suite ; la ghréline, l'unique hormone orexigène du tractus gastro-intestinal. 2) Les signaux d'adiposité, tels que la leptine et l'insuline, qui régulent principalement l'homéostasie énergétique à long terme en informant le système nerveux central de l'état des stocks énergétiques périphériques. Comme la leptine et tout particulièrement l'insuline sont des hormones qui ont fait l'objet de mes travaux de thèse, nous les décrirons de manière approfondie.

1.3.1) Les hormones du tractus gastro-intestinal

Ces hormones sont sécrétées par des cellules entéro-endocrines localisées tout le long de la paroi du tractus gastro-intestinal en réponse à l'ingestion, à la digestion et à l'absorption des repas. Elles disposent de plusieurs voies d'action pour être intégrées au niveau du système nerveux central : i) certaines peuvent stimuler leurs récepteurs localisés sur les terminaisons locales du nerf vague qui relaient ces informations au niveau du tronc cérébral ; ii) certaines peuvent également traverser la barrière hématoencéphalique pour agir directement au niveau de leurs récepteurs centraux.

La plupart des hormones du tractus gastro-intestinal (la cholecystokinine, le Glucagon like peptide-1 et 2, l'oxyntomoduline, le peptide tyrosine-tyrosine, l'apolipoprotéine A-IV, l'enterostatine, l'amyline le glucagon et les bombésines) sont des signaux de satiété (Figure 14). En effet, lorsqu'elles sont administrées de manière exogène, elles ont pour effet de diminuer la taille des repas. En revanche, la ghréline est une exception puisqu'elle est la seule hormone du tractus gastro-intestinal qui contribue à augmenter la taille des repas (Woods and D'Alessio, 2008).

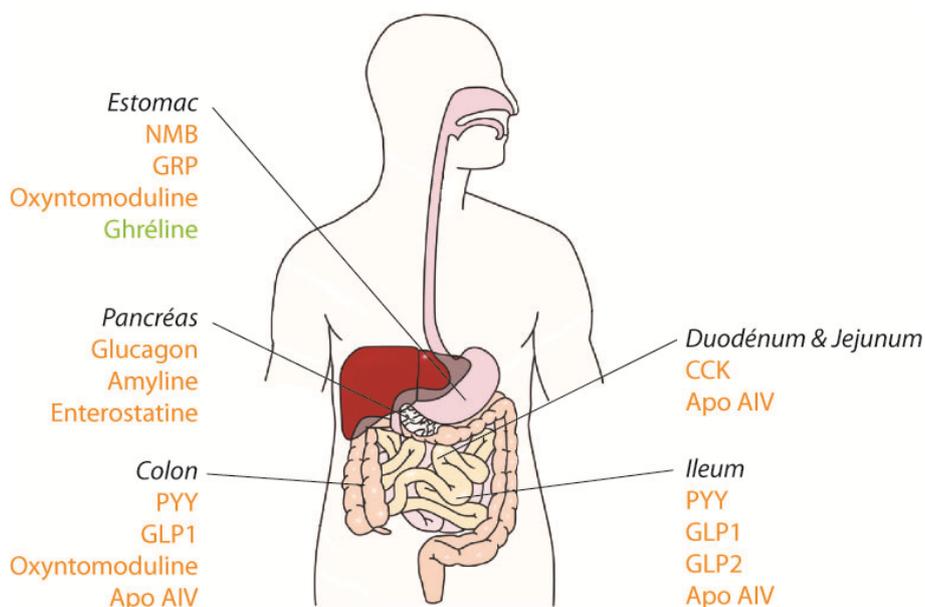


Figure 14 : Les hormones du tractus gastro-intestinal.

Représentation schématique de la répartition des différents sites de production des hormones du tractus gastro-intestinal : La cholecystokinine (CCK), la neuroméline B (NMB), le gastrin-releasing peptide (GRP), le glucagon-like peptide 1 (GLP1) et 2 (GLP2), le peptide tyrosine-tyrosine (PYY), l'apolipoprotéine A-IV (Apo AIV), l'oxyntomoduline, l'enterostatine, l'amyline, le glucagon et la ghréline. Les hormones anorexigènes sont représentées en orange et l'unique hormone orexigène, la ghréline, est indiquée en vert.

1.3.1.1) La cholecystokinine

La cholecystokinine est l'exemple prototypique des hormones de satiété sécrétées par le tractus gastro-intestinal. La cholecystokinine est sécrétée lorsque de la nourriture riche en lipides et en protéines atteint le duodénum et le jejunum (Larsson and Rehfeld, 1978; Liddle et al., 1985; Lin and Chey, 2003). Elle est alors libérée dans le sang et influence la motilité du tractus gastro-intestinal, la sécrétion d'enzymes de digestion et la sécrétion d'acide gastrique (Liddle et al., 1985; Grider, 1994). La cholecystokinine diffuse localement pour stimuler les récepteurs CCK_A et CCK_B situés sur les terminaisons vagales qui innervent le tronc cérébral (Lorenz and Goldman, 1982; Moran et al., 1997). La cholecystokinine peut également traverser la barrière hématoencéphalique pour agir au niveau de récepteurs centraux localisés dans le tronc cérébral et l'hypothalamus et induire une diminution de la prise alimentaire (Blevins et al., 2000; Mercer et al., 2000; Mercer and Beart, 2004; Woods and D'Alessio, 2008). Le taux de cholecystokinine augmente à la fin des repas et reste élevé pendant plusieurs heures (Liddle et al., 1985). L'administration d'un antagoniste des

récepteurs CCK_A conduit à une durée d'ingestion plus longue et une prise de calories plus importante (Beglinger et al., 2001). La cholecystokinine est donc un facteur de satiété, et son administration exogène contribue à diminuer la taille d'un repas une fois qu'il a été initié, en diminuant la faim et en augmentant la sensation de rassasiement (Blevins et al., 2000; Gutzwiller et al., 2004).

1.3.1.2) Les bombésines

La « bombésine » a été initialement isolée à partir de peau de grenouille *Bombina* dans les années 70 (Anastasi et al., 1971). Depuis, deux molécules homologues ont été identifiées chez les mammifères : le GRP ou Gastrin-Releasing Peptide et la neuromédine B (McDonald et al., 1978; Minamino et al., 1983). Les bombésines sont synthétisées par de nombreux tissus de l'organisme et en particulier le tractus gastro-intestinal ainsi que le système nerveux central et périphérique (Wada et al., 1990). Il est particulièrement intéressant de noter que le bulbe olfactif est l'une des structures centrales qui produit la plus grande quantité de neuromédine B (Wada et al., 1990; Ohki-Hamazaki, 2000). Les taux de bombésines diminuent en période pré-prandiale et remontent rapidement en période post-prandiale dans le plasma, l'estomac et l'hypothalamus (Gibbs et al., 1979; Kateb and Merali, 1992; Merali and Kateb, 1993). Les récepteurs du GRP et de la neuromédine B sont exprimés dans des structures cérébrales largement impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique telles que l'hypothalamus et le tronc cérébral (Wada et al., 1992; Ohki-Hamazaki, 2000). L'administration exogène périphérique ou centrale de bombésines diminue la prise alimentaire de manière dose-dépendante (Gibbs et al., 1979; Gibbs et al., 1981; Kulkosky et al., 1982). L'injection de bombésines dans le quatrième ventricule, à proximité du tronc cérébral, est particulièrement efficace pour diminuer la prise alimentaire (Flynn, 1989). Alors que l'administration périphérique agit de manière sélective et spécifique sur la prise alimentaire, l'infusion centrale de bombésines modifie la prise alimentaire, mais également les séquences comportementales normalement associées à la période de satiété en allongeant les durées de toilettage et en diminuant les périodes de repos (Gibbs et al., 1981; Kulkosky et al., 1982).

1.3.1.3) La ghréline

La ghréline est produite majoritairement par les cellules endothéliales de la paroi de l'estomac. Elle a la particularité d'être l'unique hormone orexigène sécrétée par les cellules endocrines du tractus gastro-intestinal (Sakata et al., 2002). La ghréline est également produite localement dans le système nerveux central par les neurones du cortex et de l'hypothalamus (Mondal et al., 2005; Hou et al., 2006). Le taux circulant de ghréline est élevé chez les animaux à jeun par rapport aux animaux nourris (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001). Chez l'humain et chez des animaux habitués à recevoir un repas quotidien et ponctuel, l'augmentation drastique du taux sanguin de ghréline qui précède chaque repas participe à l'anticipation et à l'initiation de la prise alimentaire (Cummings et al., 2001; Drazen et al., 2006). La composition qualitative de la nourriture influence la diminution post-prandiale du taux de ghréline. En effet, cette diminution est très forte suite à l'ingestion de protéines et plus faible suite à l'ingestion de lipides (Foster-Schubert et al., 2008). L'administration exogène périphérique ou centrale de ghréline induit une augmentation de la prise alimentaire et de la masse adipeuse (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001). A l'inverse des autres hormones du tractus gastro-intestinal, le rôle de la ghréline dans l'induction de la prise alimentaire passe majoritairement par une action au niveau de ses récepteurs hypothalamiques (Cowley et al., 2003; Mondal et al., 2005; Hou et al., 2006; Harrold et al., 2008).

1.3.2) Les signaux d'adiposité : L'insuline et la leptine

Dans les années 50, Kennedy a émis l'hypothèse selon laquelle le maintien de l'homéostasie énergétique à long terme serait assuré par la régulation de la masse adipeuse et que des signaux émergents des tissus adipeux seraient détectés par le cerveau (Kennedy, 1953). Vers la fin des années 50, Hervey, inspiré par l'hypothèse de Kennedy, a mené des expériences de parabioses, consistant à joindre la circulation sanguine de deux organismes, en utilisant des paires d'animaux composées d'un animal intact et d'un animal portant une lésion de l'hypothalamus ventromédian (Hervey, 1959). Ainsi, il a observé que les animaux comportant une telle lésion devenaient hyperphagiques et obèses alors que leurs partenaires parabiotiques non-lésés devenaient dramatiquement maigres. Fort de ces observations, Hervey a donc suggéré que les animaux parabiotiques lésés, comportant un excès de masse

adipeuse, émettaient une grande quantité de signaux d'adiposité. Ces signaux ne pouvaient fournir un rétrocontrôle de satiété chez les animaux lésés qui entraient alors dans le cercle vicieux de l'obésité. En revanche, l'excès de signaux d'adiposité produit était transféré aux partenaires parabiologiques dont le centre de satiété était resté intact, et qui dès lors répondaient drastiquement à ces facteurs de satiété en cessant de s'alimenter et en perdant du poids (Hervey, 1959).

Les taux circulants de leptine et d'insuline, deux hormones anorexigènes, sont fortement corrélés à la quantité de masse adipeuse présente dans l'organisme (Polonsky et al., 1988; Considine et al., 1996). Ces deux hormones périphériques sont donc les principaux signaux d'adiposité, qui informent le système nerveux central de l'état des stocks adipeux et participent à la régulation à long terme de la masse corporelle.

1.3.2.1) L'insuline

- *Découverte*: Ce sont les travaux fondateurs d'Oskar Von Minkowski réalisés en 1889, sur des chiens ayant subi une ablation du pancréas et produisant une urine sucrée, qui ont permis d'établir le concept selon lequel le pancréas produirait une substance permettant de réguler le taux de glucose circulant. Trente années plus tard, en 1921, l'insuline a été isolée et purifiée à partir d'extraits de pancréas par Banting, Best, MacLeod et Collip. En 1922, les injections de cet extrait pancréatique chez un patient diabétique ont efficacement atténué son hyperglycémie, ouvrant la voie du traitement thérapeutique du diabète, et inscrivant l'insuline comme une découverte majeure du 20^{ème} siècle. Banting et MacLeod ont obtenu le prix Nobel de médecine en 1923.

- *Biosynthèse*: En périphérie, l'insuline est produite dans le pancréas par les cellules β des îlots de Langerhans sous la forme d'une pré-pro-insuline constituée d'une seule chaîne peptidique dont deux fragments, le peptide signal et le peptide C, sont éliminés pour produire la forme active de l'insuline. L'insuline mature est constituée de 51 acides aminés et a un poids moléculaire de 5734 Da. Une fois synthétisée, la demi-vie de l'insuline dans la circulation sanguine est de l'ordre de 10 minutes (Thissen et al., 1994). Dans le système nerveux central, la présence du transcrit de l'insuline a été identifiée dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le subiculum, le gyrus denté, le cortex préfrontal, le thalamus et le bulbe

olfactif, démontrant la possibilité de sources locales de production d'insuline (Young, 1986; Devaskar et al., 1994). Cependant, l'expression de l'insuline dans le cerveau semble très faible et il est communément admis que la production neuronale d'insuline est négligeable par rapport à la production pancréatique périphérique (Giddings et al., 1985; Coker et al., 1990; Schwartz et al., 1992b; Woods and D'Alessio, 2008).

- *Sécrétion*: Le glucose circulant est le stimulus principal provoquant l'exocytose d'insuline des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Le glucose pénètre dans la cellule β par un transporteur non saturable GLUT2 puis il est phosphorylé par une glucokinase. Le métabolisme glycolytique augmente le rapport ATP/ADP dans la cellule β , ce qui entraîne la fermeture d'un canal potassique, qui contribue à la dépolarisation de la cellule β . Ce changement de potentiel de membrane permet l'ouverture de canaux calciques sensibles au voltage. Le calcium entre dans la cellule et déclenche l'exocytose de vésicules contenant l'insuline (Henquin, 2009).

L'insuline est sécrétée de manière tonique par le pancréas. A cette quantité basale d'insuline vient s'ajouter une sécrétion phasique, largement corrélée au décours temporel de chaque repas. La sécrétion phasique d'insuline peut être divisée en plusieurs pics de sécrétion : 1) La phase céphalique pré-prandiale est un pic de sécrétion d'insuline de faible amplitude et de courte durée qui est provoquée par la vue, l'odeur et le goût des aliments avant même que les nutriments ne soient absorbés. Elle est relayée par l'innervation vagale du pancréas. La phase céphalique de libération d'insuline induit une hypoglycémie légère qui participe à l'initiation de la prise alimentaire et favorise la régulation de la glycémie post-prandiale (Louis-Sylvestre, 1976; Louis-Sylvestre and Le Magnen, 1980; Bellisle et al., 1985; Ahren and Holst, 2001). 2) La phase post-prandiale correspond à un pic de sécrétion d'insuline de forte amplitude et de longue durée qui est provoqué par l'arrivée de glucose à proximité des cellules β -pancréatiques lors de l'augmentation majeure de la glycémie induite par l'ingestion, l'absorption et la digestion des nutriments. La phase post-prandiale de sécrétion d'insuline a pour but de promouvoir l'utilisation tissulaire de glucose afin de diminuer la glycémie post-prandiale. La sécrétion totale d'insuline, basale et phasique, est directement proportionnelle à la masse adipeuse de l'organisme. Ainsi, les individus obèses possèdent un taux circulant d'insuline supérieur aux individus sains (Polonsky et al., 1988).

D'une part, l'insuline est un signal de régulation de la prise alimentaire à court terme, qui agit en réponse à la quantité d'énergie en circulation dans le sang sous la forme de glucose. D'autre part, l'insuline est un signal de régulation de la masse corporelle à long terme, qui reflète la quantité d'énergie stockée dans les tissus adipeux.

- *Récepteurs*: Les récepteurs de l'insuline appartiennent à la famille des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. Ils sont constitués de 4 sous unités : deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux chaînes β transmembranaires. Chaque sous unité α possède un domaine complet de liaison à l'hormone. Cependant, par encombrement stérique, une seule molécule d'insuline permet d'activer complètement le récepteur. L'épissage alternatif de l'unique gène codant pour le récepteur de l'insuline permet de générer deux isoformes différentes. Une forme courte, l'IR_A, et une forme longue, l'IR_B. La forme longue est caractérisée par la présence de 12 acides aminés supplémentaires situés sur l'extrémité C-terminale de la sous-unité α (Seino and Bell, 1989). Ces deux isoformes ont toutes les deux une activité tyrosine-kinase mais présentent des différences fonctionnelles: la forme longue (IR_B) lie l'insuline avec moins d'affinité que la forme courte (IR_A). Elle est internalisée plus lentement que la forme courte (IR_A) et n'est pas recyclée (Mosthaf et al., 1990; Joost, 1995). Les ratios d'expression de ces deux isoformes varient en fonction des tissus : les muscles et les adipocytes expriment les deux isoformes avec une légère prédominance de la forme longue ; le foie exprime majoritairement la forme longue alors que le cerveau exprime préférentiellement la forme courte (Moller et al., 1989; Breiner et al., 1993; Joost, 1995).

- *Voies de signalisation intracellulaires* (Figure 15): En se fixant sur la sous-unité α extracellulaire, l'insuline provoque un changement de conformation de son récepteur et une levée d'inhibition de l'activité tyrosine kinase de la sous-unité β , qui initie la transphosphorylation des sous-unités β et l'activation du récepteur. Les résidus tyrosine phosphorylés se présentent alors comme des sites de liaison pour les protéines IRSs (insulin receptor substrates). Les protéines IRSs s'engagent ensuite dans diverses cascades moléculaires, mais nous nous attarderons ici seulement sur la voie de la kinase PI3K qui est fondamentalement impliquée dans l'action de l'insuline sur le métabolisme (Saltiel and Kahn, 2001; Niswender et al., 2003). La protéine IRS est reconnue par la sous-unité

régulatrice de la kinase PI3K. La sous-unité catalytique de la kinase PI3K est responsable de la phosphorylation de phosphoinositides membranaires (PIP2), générant ainsi des seconds messagers phosphatidylinositol-3-phosphates (PIP3) qui sont ensuite reconnus par de nombreuses kinases cellulaires, et en particulier les protéines kinases B et C (PKB/Akt et PKC). Ces kinases phosphorylent et activent à leur tour d'autres relais intracellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'hormone sur le transport du glucose, la synthèse de glycogène, de lipides et de protéines, mais également sur la régulation de l'expression de gènes spécifiques du métabolisme (Saltiel and Kahn, 2001).

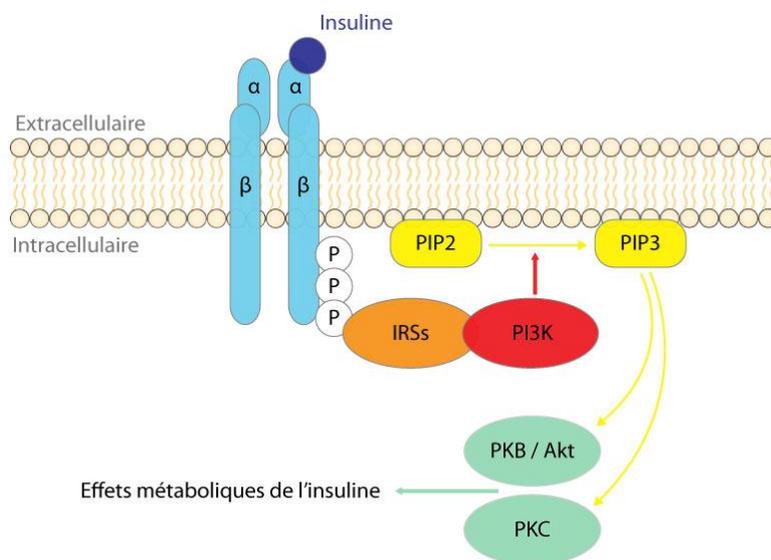


Figure 15 : La voie de signalisation intracellulaire impliquée dans les effets métaboliques de l'insuline.

Représentation schématique de la voie de la kinase PI3K. La fixation d'insuline provoque la phosphorylation du récepteur. Les sites phosphorylés sont reconnus par les protéines IRSs (insulin receptor substrates) qui se lient à la kinase PI3K. PI3K phosphoryle des phosphoinositides membranaires (PIP2) générant ainsi des phosphatidylinositol-3-phosphates (PIP3), qui activent les protéines kinases B et C (PKB/Akt et PKC). Ces kinases sont à l'origine des effets métaboliques de l'insuline.

Après leur formation à la surface cellulaire, les complexes insuline/récepteur se concentrent dans des invaginations de la membrane plasmique puis ils sont transférés à l'intérieur de la cellule par endocytose. Ils sont ensuite transportés au sein des endosomes dans lesquels un pH acide facilite la dissociation du complexe insuline/récepteur. Cette dissociation pré-lysosomale permet à une partie des récepteurs intacts d'être recyclés vers la surface cellulaire. L'insuline et la fraction des récepteurs qui ne sont pas recyclés sont transportés jusqu'aux lysosomes où ils sont dégradés (Knutson, 1991; McClain, 1992).

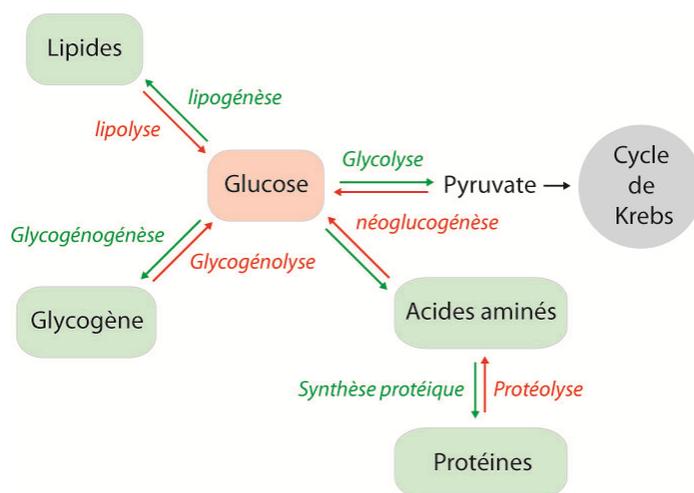


Figure 16 : Résumé de l'action périphérique hypoglycémiante de l'insuline.

Représentation schématique des voies d'utilisation et de production du glucose. Les voies activées par l'insuline sont figurées en vert. Les voies inhibées par l'insuline sont figurées en rouge.

- *Rôles périphériques* : En périphérie, l'insuline joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique à court terme en favorisant la synthèse et le stockage des glucides, des lipides et des protéines (Figure 16). L'insuline favorise la capture et le stockage du glucose par certains tissus comme le muscle squelettique et le tissu adipeux. En effet, en se fixant à son récepteur, l'insuline provoque la migration des transporteurs du glucose GLUT4 intracytoplasmiques (i.e. inactifs) vers la membrane plasmique à laquelle ils s'incorporent pour assurer la pénétration du glucose dans la cellule. De plus, l'insuline favorise le stockage du glucose en activant la synthèse d'enzymes impliquées dans la glycogénogénèse musculaire et hépatique. L'insuline assure également la diminution de la libération du glucose par le foie en inhibant la glycogénolyse. D'autre part, l'insuline favorise la capture des acides aminés par les tissus ainsi que la synthèse protéique. Elle inhibe la dégradation protéique et la néoglucogénèse hépatique à partir d'acides aminés. Enfin, l'insuline favorise la capture des acides gras à l'intérieur des cellules ainsi que la lipogénèse adipeuse et hépatique et inhibe la lipolyse au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles striés (Saltiel and Kahn, 2001).

Ainsi, l'insuline favorise le stockage du glucose et en inhibe sa production, contribuant en périphérie à une action globale hypoglycémiante. L'administration exogène périphérique d'insuline induit une diminution drastique de la glycémie et initie la prise alimentaire (Booth and Brookover, 1968; Banks et al., 1997a). Lorsque l'hypoglycémie induite par l'administration d'insuline est évitée, soit par l'utilisation de faibles doses d'insuline, soit en

co-injectant du glucose, alors l'insuline provoque paradoxalement une diminution de la prise alimentaire (Nicolaidis and Rowland, 1976; Anika et al., 1980; Woods et al., 1984; Oetting and Vanderweele, 1985; Woods et al., 2006). Avec de tels paradigmes d'injections, l'insuline n'a pas d'effet périphérique sur la glycémie, et la diminution de la prise alimentaire observée est due à la traversée de la barrière hématoencéphalique par l'insuline et à son action au niveau du système nerveux central.

- *Traversée de la barrière hématoencéphalique*: L'insuline libérée dans la circulation sanguine par le pancréas est capable d'atteindre le système nerveux central. En effet, après une heure d'administration continue d'insuline dans la circulation sanguine, une augmentation dose-dépendante du taux d'insuline est observée dans le liquide céphalo-rachidien (Schwartz et al., 1990b; Banks et al., 1997a). Les récepteurs de l'insuline sont exprimés au niveau des capillaires cérébraux et des plexus choroïdes formant la barrière hémato-encéphalique mais également au niveau des organes circonventriculaires, présentant une barrière hémato-encéphalique incomplète (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990). Au niveau des capillaires cérébraux, l'insuline liée à son récepteur est endocytée puis amenée du sang vers le liquide céphalo-rachidien par un transport intravésiculaire à travers les cellules endothéliales (Frank et al., 1986; Duffy and Pardridge, 1987). L'insuline traverse efficacement la barrière hémato-encéphalique dans le sens sang/cerveau grâce à un système de transport saturable ce qui n'est pas le cas dans le sens cerveau/sang (Cashion et al., 1996; Banks et al., 1997b). Ainsi, la clairance de l'insuline est lente et sa demi-vie dans le cerveau varie entre une demi-heure et plus de deux heures (Schwartz et al., 1990b; Cashion et al., 1996). L'influx et l'efflux d'insuline dans le système nerveux central sont régulés par l'état alimentaire et semblent être réduits en période de jeûne (Strubbe et al., 1988; Cashion et al., 1996).

- *Rôles centraux dans la régulation de l'homéostasie énergétique*: Diverses études d'autoradiographie, d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ* ont permis d'identifier une forte concentration de récepteurs de l'insuline et de leurs transcrits au niveau de l'hypothalamus et du bulbe olfactif ; ainsi qu'une concentration plus faible au niveau de l'hippocampe, du cervelet et du cortex (Werther et al., 1987; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990; Schwartz et al., 1992a). Ainsi, les récepteurs de l'insuline sont localisés dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique mais

également au niveau de structures impliquées dans des fonctions sensorielles et cognitives. L'abondance du récepteur de l'insuline au niveau du bulbe olfactif, suggère un rôle fondamental de l'insuline dans la fonction olfactive. Nous reviendrons en détail sur ce rôle dans la troisième partie de cette introduction.

L'insuline, libérée en proportion directe de la quantité de tissu adipeux présente dans l'organisme, traverse la barrière hématoencéphalique pour atteindre ses récepteurs hypothalamiques où elle fournit un signal de régulation de la masse corporelle. Lorsque, par des infusions chroniques, le niveau d'insuline dans le cerveau est imposé à un niveau stable sur une longue période la masse corporelle est également maintenue à un niveau d'équilibre déterminé par la dose d'insuline infusée (Chavez et al., 1995). Dans l'hypothalamus, les récepteurs de l'insuline sont concentrés fortement au niveau du noyau arqué, du noyau paraventriculaire et du noyau dorsomédian; et plus modérément au niveau de l'hypothalamus latéral et du noyau ventromédian (Corp et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990; Schwartz et al., 1992a). Ainsi, l'administration d'insuline dans ou à proximité de l'hypothalamus, induit une diminution dose-dépendante de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Woods et al., 1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman and Oomura, 1986; Plata-Salaman et al., 1986; Air et al., 2002). A l'inverse, le blocage de la voie de signalisation insulinique dans le système nerveux central ou de manière ciblée dans l'hypothalamus induit une hyperphagie et une augmentation de la masse adipeuse et conduit au développement d'un phénotype obèse (Bruning et al., 2000; Obici et al., 2002a).

1.3.2.2) La leptine

- *Découverte*: Deux décennies après les travaux de parabiose d'Hervey (Hervey, 1959), Coleman a conduit des études similaires en utilisant des combinaisons de paires parabiotiques avec des souris normales ou obèses *ob/ob* et *db/db*, porteuses de mutations spontanées des gènes *ob* et *db*, dont les produits n'étaient pas encore identifiés à cette époque (Coleman, 1973). Les souris *ob/ob*, de la même manière que les souris normales, perdaient du poids lorsqu'elles étaient placées en parabiose avec des souris *db/db*. En revanche, le poids des souris normales placées en parabiose avec les souris *ob/ob*, n'était pas affecté. Ainsi, les souris *ob/ob* étaient incapables de produire le signal de satiété normalement encodé par le gène *ob*, et les souris *db/db* produisaient ce signal mais en étaient insensibles. Il aura fallu

attendre deux décennies supplémentaires pour qu'une étude de clonage révèle que le gène *ob* encode une hormone, la leptine (du grec leptos = maigre), exprimée et sécrétée par le tissu adipeux (Zhang et al., 1994). L'année suivante, les injections de leptine recombinante ont démontré que le produit du gène *ob* permettait de réduire efficacement la masse corporelle (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). Simultanément, le produit du gène *db*, codant pour le récepteur de la leptine a été caractérisé et localisé au niveau de l'hypothalamus (Tartaglia et al., 1995).

- *Biosynthèse et sécrétion*: La leptine est une hormone peptidique de 16KDa composée d'une séquence de 146 acides aminés encodée par le gène *ob* (Zhang et al., 1997). La leptine est produite principalement par le tissu adipeux, mais également en faible quantité par d'autres tissus périphériques comme le placenta, l'estomac et le muscle (Zhang et al., 1994; Masuzaki et al., 1997; Bado et al., 1998; Wang et al., 1998b). Dans le système nerveux central, la leptine est également produite dans le cortex, le cervelet, l'hypophyse et l'hypothalamus (Morash et al., 1999). Toutefois, la production ectopique de leptine, dont le rôle demeure inconnu, est négligeable par rapport à la production massive de leptine par le tissu adipeux, qui est donc le principal déterminant du taux circulant de leptine. La libération basale de leptine dans le sang par les adipocytes est proportionnelle à la masse adipeuse de l'organisme (Considine et al., 1996). En plus d'une régulation de la libération chronique, de nombreux facteurs interviennent pour réguler la sécrétion aiguë de leptine. Tout d'abord, le taux circulant de leptine suit un rythme circadien. Ce taux augmente constamment dès le début de la phase active lors la consommation des premiers repas pour atteindre un niveau paroxytique après plusieurs heures (Saladin et al., 1995; Schoeller et al., 1997). De plus, la transcription du gène *ob* ainsi que le taux circulant de leptine diminue en période de jeûne indépendamment de la masse adipeuse de l'organisme (Saladin et al., 1995; Boden et al., 1996). En revanche, la transcription du gène *ob* et le taux circulant de leptine sont fortement augmentés en cas de surconsommation de nourriture aiguë ou chronique (Saladin et al., 1995; Kolaczynski et al., 1996). Enfin, l'insuline semble réguler le taux circulant de leptine en stimulant efficacement la biosynthèse et la sécrétion de leptine par le tissu adipeux (Saladin et al., 1995; Barr et al., 1997).

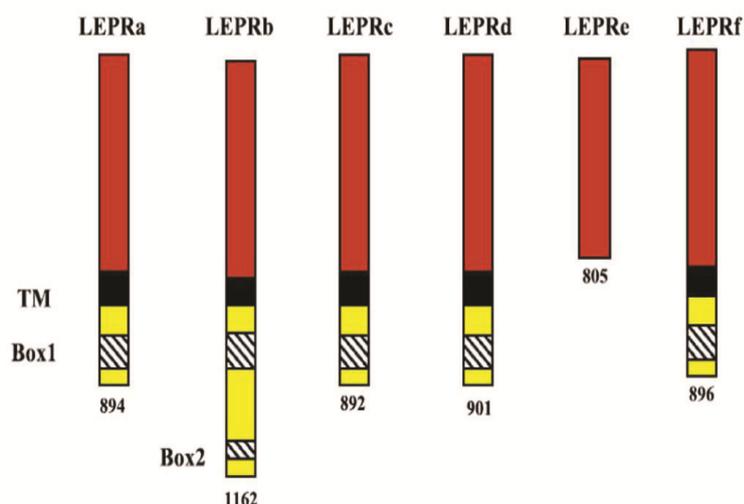


Figure 17 : Les différentes isoformes du récepteur de la leptine

(D'après Ahima & Osei 2004)

Les six isoformes du récepteur de la leptine, de LepRa à LepRf, possèdent un domaine extracellulaire commun de liaison à la leptine (en rouge). Seule l'isoforme soluble LepRe ne possède pas le domaine transmembranaire TM (en noir). Seule l'isoforme longue LepRb possède le motif intracellulaire nécessaire pour la voie de signalisation JAK-STAT (Box2).

- **Récepteurs:** Il existe six isoformes du récepteur de la leptine (Figure 17, LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe et LepRf) générées par épissage alternatif du transcrite du gène *db* (Lee et al., 1996; Fei et al., 1997). Les différentes isoformes présentent toutes un domaine de liaison à la leptine similaire au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire. Ces isoformes possèdent un domaine transmembranaire à l'exception de l'isoforme LepRe qui est sécrétée sous la forme d'un récepteur soluble et n'active aucune voie de signalisation (Fei et al., 1997; Li et al., 1998). Une grande variabilité est observée entre les différentes isoformes au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire (Fei et al., 1997). Le LepRb, l'isoforme longue du récepteur de la leptine, est particulièrement impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, la mutation du gène codant pour l'isoforme LepRb chez les souris *db/db* conduit à la production d'une isoforme LepRb tronquée similaire à l'isoforme LepRa ce qui instaure un phénotype hyperphagique et obèse (Chua et al., 1996; Lee et al., 1996). De plus, la substitution d'une glutamine par une proline dans le domaine extracellulaire de l'isoforme LepRb diminue l'affinité de la leptine pour son récepteur. Cette mutation est responsable du phénotype hyperphagique et obèse des rats mutants Zucker *fa/fa* (Chua et al., 1996). Le LepRa est quantitativement l'isoforme la plus répandue et est présente majoritairement en périphérie dans le muscle, le tissu adipeux, le pancréas, le foie, la rate, le cœur, le poumon et le rein. Une quantité beaucoup plus faible du LepRb est retrouvée dans ces mêmes organes, alors que les isoformes LepRc, LepRd, LepRe et LepRf ne sont pas détectées (Fei et al., 1997; De Matteis et al., 1998). Dans le système nerveux central, le LepRa est abondamment exprimé

au niveau des plexus choroïdes. Le LepRb est exprimé majoritairement au niveau du système nerveux central, de manière abondante dans l'hypothalamus mais également dans le tronc cérébral, le bulbe olfactif, le cervelet, le néocortex, l'hippocampe et le thalamus (Tartaglia et al., 1995; Mercer et al., 1996; Fei et al., 1997; Shioda et al., 1998; Burguera et al., 2000).

- *Voies de signalisation intracellulaires* : Seule l'isoforme LepRb, la forme longue du récepteur de la leptine, présente les motifs intracellulaires nécessaires pour l'activation de la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT (Figure 17). La fixation de la leptine sur son récepteur LepRb provoque l'autophosphorylation et l'activation d'une protéine JAK2 (Figure 18) (Li and Friedman, 1999; Bates et al., 2003). Cette kinase phosphoryle à son tour les tyrosines du domaine intracellulaire du LepRb et génère ainsi un site de liaison pour la molécule STAT3 (Li and Friedman, 1999; Bates et al., 2003). Suite à la fixation de leptine à son récepteur, la protéine STAT3 activée se dirige ensuite dans le noyau pour activer la transcription de gènes spécifiques responsables des effets métaboliques de la leptine. Le signal généré par la fixation de la leptine à son récepteur est éteint par l'induction de SOCS3, une protéine qui inhibe la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT (Banks et al., 2000a).

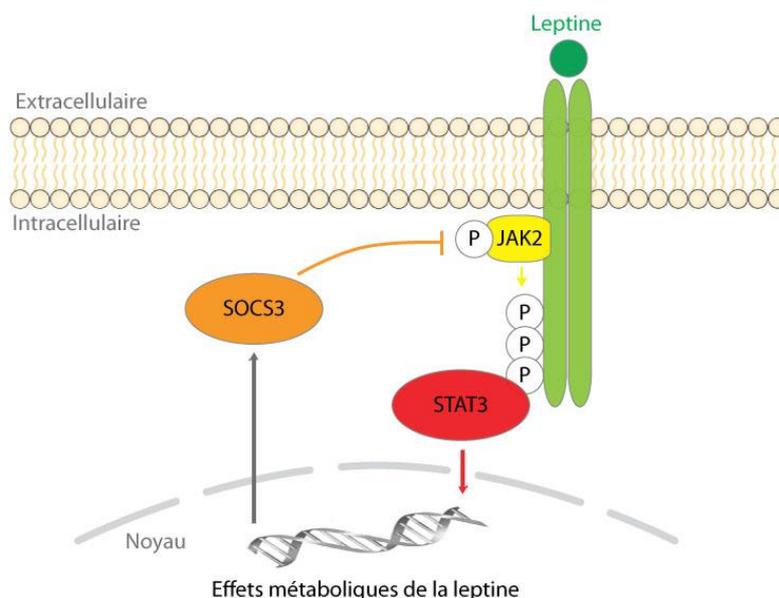


Figure 18 : La voie de signalisation intracellulaire impliquée dans les effets métaboliques de la leptine.

Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT. La fixation de la leptine à la forme longue de son récepteur (LepRb) induit la phosphorylation de JAK2. JAK2 phosphoryle à son tour le domaine intracellulaire du récepteur, qui est ensuite lié par STAT3. STAT3 activé permet la transcription de gènes responsables des effets métaboliques de la leptine. STAT3 active également la protéine SOCS3 qui inhibe la voie de signalisation JAK/STAT.

- *Traversée de la barrière hématoencéphalique* : La leptine, libérée dans la circulation sanguine par les adipocytes, traverse la barrière hématoencéphalique et entre dans le système nerveux central par un système de transport saturable (Banks et al., 1996). Les isoformes courtes du récepteur de la leptine, fortement exprimées dans les microvaisseaux cérébraux et les plexus choroïdes, jouent un rôle déterminant dans le transport de la leptine à travers la barrière hématoencéphalique (Bjorbaek et al., 1998; Kastin et al., 1999). Ce transport est régulé par l'état alimentaire et l'état métabolique de l'organisme. En effet, il est drastiquement diminué par une restriction alimentaire et il est augmenté lorsque les animaux sont nourris à nouveau (Kastin and Akerstrom, 2000). Pour une leptinémie physiologique, le transport de la leptine à travers la barrière hématoencéphalique reste efficace tout en étant partiellement saturé. Il devient complètement saturé et inefficace pour la leptinémie supra-physiologique d'une souris obèse (Banks et al., 2000b). De fait, certains animaux obèses deviennent résistants à la leptine administrée en périphérie, mais restent capables de répondre à la leptine administrée directement dans le système nerveux central. Ce résultat démontre ainsi que le transport de la leptine à travers la barrière hématoencéphalique est altéré chez les animaux obèses (Banks et al., 1997b; Halaas et al., 1997; Banks et al., 2000b).

- *Rôles dans la régulation de l'homéostasie énergétique* : Administrée de manière exogène dans la circulation sanguine ou directement dans le système nerveux central, la leptine diminue radicalement la prise alimentaire et la masse corporelle (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995). Les premières études du rôle de la leptine dans la régulation de la masse corporelle ont rapidement démontré que les injections centrales étaient beaucoup plus efficaces que les injections périphériques, suggérant que le site principal d'action de la leptine se trouvait dans le cerveau (Campfield et al., 1995). En effet, le LepRb est exprimé abondamment au niveau du système nerveux central et tout particulièrement dans les noyaux hypothalamiques arqué, paraventriculaire, dorsomédian, ventromédian et latéral, largement impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Tartaglia et al., 1995; Mercer et al., 1996; Fei et al., 1997; Shioda et al., 1998; Burguera et al., 2000).

2) Les centres intégrateurs de la régulation de la prise alimentaire

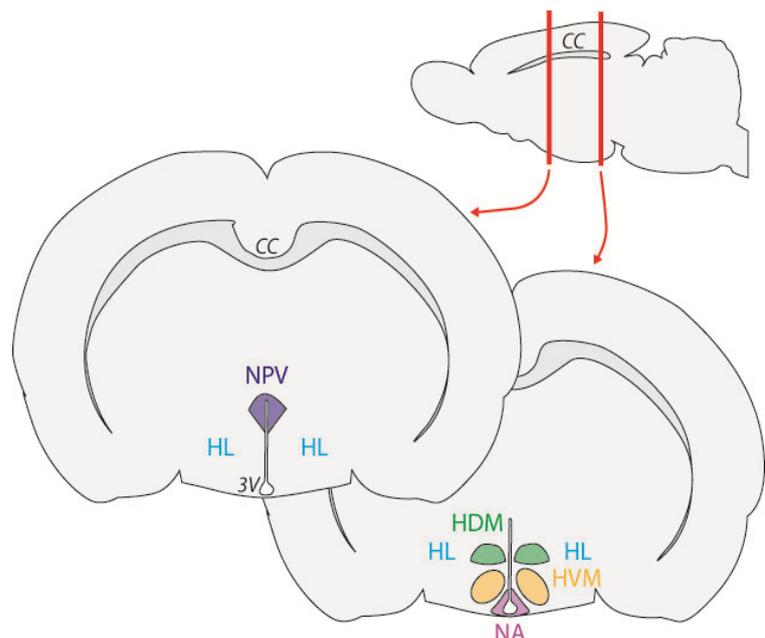
L'intégration des signaux de régulation de l'homéostasie énergétique est réalisée principalement dans deux structures. D'une part, dans l'hypothalamus qui joue un rôle primordial dans l'intégration des signaux d'adiposité à long terme. D'autre part, dans le tronc cérébral, qui permet préférentiellement l'intégration des signaux de régulation de la prise alimentaire à court terme.

2.1) L'hypothalamus

Le rôle de « chef d'orchestre » du système de régulation de la prise alimentaire a été attribué à l'hypothalamus dans les années 40, par les travaux pionniers de Hetherington et Ranson ainsi que d'Anand et Brobeck. En effet, ils ont observé que les lésions de l'hypothalamus ventromédian provoquaient une hyperphagie et une obésité, alors que les lésions de l'hypothalamus latéral induisaient une anorexie et une perte de poids (Hetherington and Ranson, 1942a; Hetherington and Ranson, 1942b; Anand and Brobeck, 1951). Ces auteurs ont alors défini l'hypothalamus ventromédian comme étant le « centre de satiété » et l'hypothalamus latéral comme étant le « centre de la faim » (Hetherington and Ranson, 1942a; Hetherington and Ranson, 1942b; Anand and Brobeck, 1951).

Figure 19 : Organisation anatomique des noyaux hypothalamiques.

Représentation schématique de la localisation et de l'organisation anatomique de l'hypothalamus de rat. Repères anatomiques : corps calleux (CC) et troisième ventricule (3V). **(haut)** Coupe sagittale de cerveau de rat montrant le niveau de section des coupes présentées en dessous. **(bas)** Coupes frontales de rat présentant les différents noyaux hypothalamiques : le noyau paraventriculaire (NPV), l'hypothalamus latéral (HL), l'hypothalamus dorsomédian (HDM), l'hypothalamus ventromédian (HVM) et le noyau arqué (NA). L'hypothalamus latéral est une structure diffuse sans contour délimité.



Cette vue fonctionnelle de l'hypothalamus, divisé grossièrement en deux « centres » fonctionnels aux actions antagonistes, a été progressivement remplacée par la délimitation de différents noyaux hypothalamiques composés de populations de neurones particuliers, sensibles aux signaux de régulation de l'homéostasie énergétique et exprimant des neurotransmetteurs présentant des rôles anaboliques et cataboliques spécifiques (Figure 19).

2.1.1) Le noyau arqué et le système des mélanocortines

Le noyau arqué présente une localisation stratégique pour être en contact privilégié avec les signaux de la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, il est situé autour de la base du troisième ventricule et il s'étend au dessus de l'éminence médiane. Comme cet organe circonventriculaire présente une barrière hématoencéphalique incomplète, les divers signaux circulants atteignent aisément le noyau arqué en passant par l'éminence médiane ou en diffusant à travers l'épendyme du troisième ventricule (Peruzzo et al., 2000).

Le noyau arqué comporte deux populations de neurones particulièrement importantes. La première synthétise deux neuropeptides anorexigènes (Figure 20): CART (Cocaine- and Amphetamine- Regulated Transcript) et POMC (Pro-Opiomelanocortine), le précurseur de l' α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone) (Elias et al., 1998; Bagnol et al., 1999). L' α -MSH appartient à la famille des mélanocortines et agit sur les récepteurs des mélanocortines 3 et 4 (MC3R et MC4R), localisés dans d'autres noyaux hypothalamiques, en particulier le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus latéral ainsi que dans le tronc cérébral, pour diminuer la prise alimentaire (Jacobowitz and O'Donohue, 1978; Oohara et al., 1993; Roselli-Rehfuss et al., 1993; Mountjoy et al., 1994). En effet, l'administration exogène d' α -MSH mais également de CART dans le système nerveux central diminue la prise alimentaire. De plus, les taux d'expression de POMC et de CART sont diminués en période de jeûne (Oohara et al., 1993; Kristensen et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Benoit et al., 2002).

La deuxième population de neurones du noyau arqué co-expriment deux peptides orexigènes, l'AgRP (Agouti Related Protein) et le NPY (Neuropeptide Y) (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998).

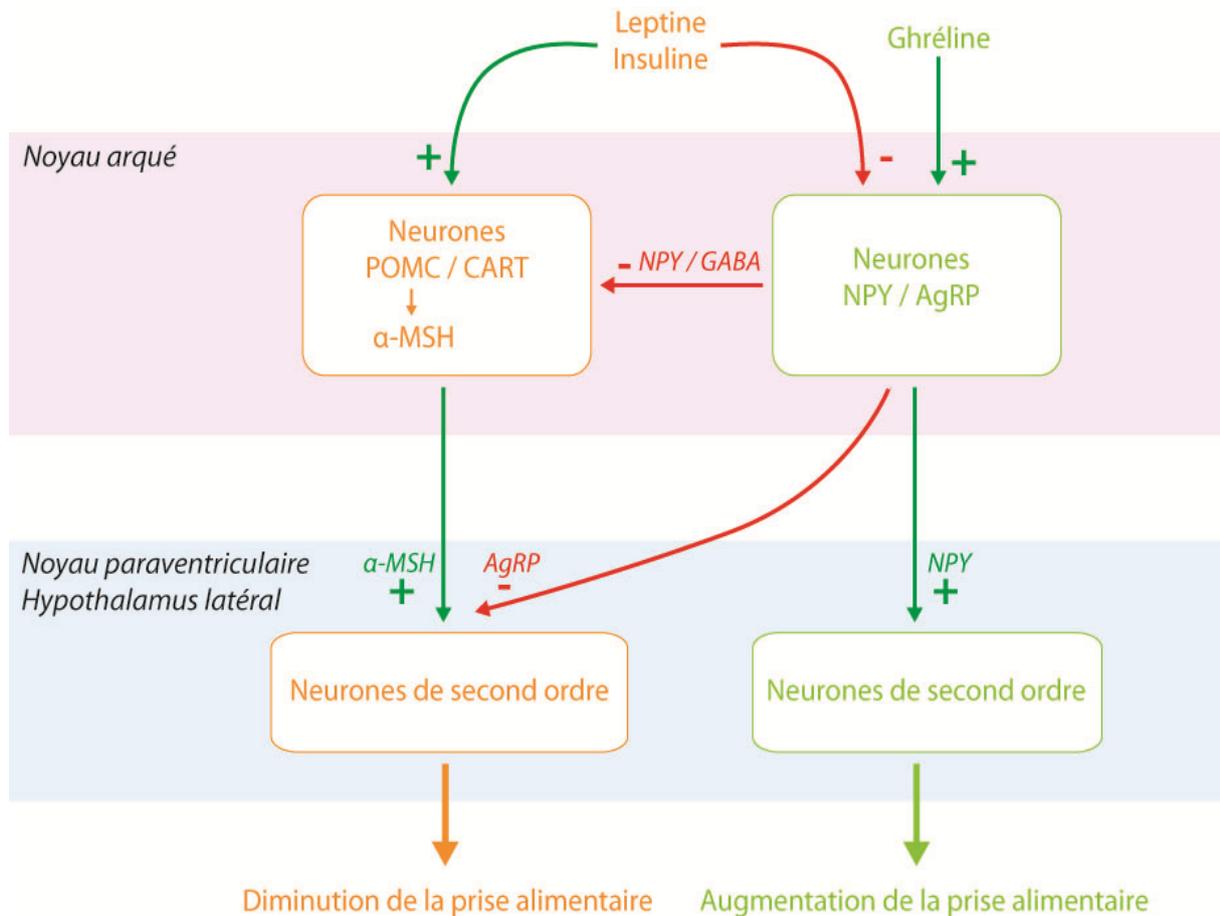


Figure 20 : Les effets principaux de la leptine, de l'insuline et de la ghréline sur l'hypothalamus.

Lorsque les taux de leptine et d'insuline sont élevés, les neurones POMC/CART sont activés et les neurones NPY/AgRP sont inhibés. Ainsi, l'inhibition tonique des neurones POMC/CART, la libération de NPY et de GABA par les neurones NPY/AgRP, est levée. L' α -MSH est libérée et agit au niveau des récepteurs MC3R/MC4R sur les neurones de second ordre du noyau paraventriculaire et de l'hypothalamus latéral et active la libération de neuropeptides anorexigènes qui diminuent la prise alimentaire. A l'inverse, lorsque la ghréline est sécrétée, les neurones NPY/AgRP sont activés et les neurones POMC/CART sont indirectement inhibés. L'AgRP libérée agit comme antagoniste des récepteurs MC3R/MC4R au niveau des neurones cibles des neurones POMC/CART, qui ne peuvent plus être activés par l' α -MSH. Le NPY libéré agit au niveau de ses récepteurs portés par les neurones de second ordre du noyau paraventriculaire et de l'hypothalamus latéral et active la libération de neuropeptides orexigènes qui augmentent la prise alimentaire.

Les neurones AgRP/NPY se projettent principalement sur d'autres noyaux hypothalamiques tels que l'hypothalamus latéral et le noyau paraventriculaire (Bai et al., 1985; Broberger et al., 1998). L'AgRP est un antagoniste des récepteurs MC3R/MC4R. Par cette action antagoniste, il inhibe l'effet des neurones POMC/CART sur les neurones de second ordre (Ollmann et al., 1997; Cowley et al., 2001). De plus, les neurones NPY/AGRP inhibent les neurones POMC/CART en libérant du NPY et du GABA au niveau de leurs corps cellulaires (Cowley

et al., 2001). Les neurones NPY/AgRP ont donc une action antagoniste à celle des neurones POMC/CART. Ainsi, les taux d'expression de l'AgRP et du NPY sont augmentés en période de jeûne et les administrations centrales de ces neuropeptides stimulent la prise alimentaire de manière durable (Beck et al., 1992; Hahn et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Mizuno and Mobbs, 1999; Hagan et al., 2000). Enfin, l'expression ubiquitaire d'AgRP engendre l'établissement d'un phénotype obèse et hyperphagique (Ollmann et al., 1997).

Les neurones POMC/CART et NPY/AgRP sont sensibles aux signaux d'adiposité en provenance de la périphérie. En effet, ces deux populations de neurones expriment les récepteurs de la leptine et de l'insuline (Hakansson et al., 1996; Cheung et al., 1997; Benoit et al., 2002). De plus, il a été clairement démontré que les rôles anorexigènes et cataboliques de la leptine et de l'insuline dépendent du système des mélanocortines puisqu'ils sont bloqués par l'administration d'antagonistes des récepteurs MC3R et MC4R (Seeley et al., 1997; Benoit et al., 2002). Ainsi, la leptine et l'insuline modulent l'activité électrique des neurones POMC/CART et NPY/AgRP (Spanswick et al., 2000; Cowley et al., 2001; Plum et al., 2006); inhibent la production des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (Schwartz et al., 1992b; Sipols et al., 1995; Stephens et al., 1995; Mizuno and Mobbs, 1999; Havel et al., 2000) et favorisent la production des neuropeptides anorexigènes POMC et CART (Kristensen et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Benoit et al., 2002; Li et al., 2002). L'action de la leptine et de l'insuline au niveau du système des mélanocortines conduit donc à une action globale anorexigène.

Les neurones POMC/CART et NPY/AgRP sont également sensibles à la ghréline, l'unique hormone orexigène libérée par le tractus gastro-intestinal. Les récepteurs de la ghréline sont exprimés majoritairement par les neurones NPY/AgRP (Willesen et al., 1999; Mondal et al., 2005). En agissant au niveau du noyau arqué, la ghréline active l'expression des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (Kamegai et al., 2000; Nakazato et al., 2001) et inhibe indirectement les neurones POMC/CART en augmentant la libération de GABA sur leurs corps cellulaires, contribuant ainsi à augmenter la prise alimentaire (Cowley et al., 2003).

Par ailleurs, les neurones du noyau arqué sont également sensibles aux nutriments libérés dans la circulation sanguine lors de la digestion du bol alimentaire. Pour mesurer le taux de glucose circulant, le noyau arqué dispose de neurones glucosensibles qui adaptent leur

fréquence de décharge aux fluctuations de la concentration locale extracellulaire de glucose (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969). Les neurones orexigènes NPY/AgRP sont activés par une faible concentration de glucose alors que les neurones anorexigènes POMC/CART sont inhibés par une faible concentration de glucose ; et inversement en présence d'une forte concentration de glucose (Muroya et al., 1999; Ibrahim et al., 2003). Les acides gras et les acides aminés ont également la capacité de moduler l'activité neuronale en agissant certaines voies de signalisation intracellulaires telles que les voies de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) et de la mTOR (mammalian target of rapamycin) dont les activités sont directement corrélées aux flux énergétiques périphériques (Obici et al., 2002b; Cota et al., 2006; Sandoval et al., 2008). Ainsi, les neurones du noyau arqué utilisent des mécanismes de signalisation spécifiques pour mesurer les taux de glucose, d'acides gras et d'acides aminés circulants, qui agissent conjointement pour diminuer la prise alimentaire en période d'abondance énergétique.

A l'exception du tronc cérébral, les neurones NPY/AgRP se projettent globalement au niveau des mêmes cibles cérébrales que les neurones POMC/CART, et notamment au niveau du noyau paraventriculaire et de l'hypothalamus latéral (Broberger et al., 1998; Cone, 2005). Les neurones de ces deux noyaux hypothalamiques possèdent une forte densité de récepteur Y₅, connu pour être responsable des effets orexinerigiques du neuropeptide Y (Hu et al., 1996; Durkin et al., 2000)

2.1.2) L'hypothalamus latéral et les orexines

L'hypothalamus latéral est une structure diffuse composée de sous-populations de neurones distinctes exprimant des neuropeptides orexigènes : la MCH (Melanin-Concentrating Hormone) et les orexines (Broberger et al., 1998). Le taux d'expression de la MCH est augmenté en période de jeûne et l'injection intracérébroventriculaire de MCH induit une augmentation de la prise alimentaire (Qu et al., 1996). L'orexine A est une molécule qui a fait l'objet de certains travaux de l'équipe, nous développerons donc ici une description succincte du système orexinerigique.

- *Biosynthèse et sécrétion* : L'orexine A et l'orexine B sont deux neuropeptides de 33 (3,562 KDa) et de 28 acides aminés (2,937 KDa) respectivement, sécrétés par clivage protéolytique

du produit du gène de la préproorexine (Sakurai et al., 1998). Les orexines A et B sont produites par une sous-population de neurones de l'hypothalamus latéral adjacente mais distincte de la sous-population de neurones produisant la MCH (Broberger et al., 1998; De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). Les neurones sécrétant les orexines A et B projettent vers de nombreuses structures cérébrales et notamment vers la plupart des noyaux hypothalamiques, ainsi que vers le tronc cérébral. Il est par ailleurs particulièrement intéressant de noter ici que les structures olfactives sont des cibles privilégiées de projection des fibres orexinergiques (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999; Shibata et al., 2008). Au sein de l'hypothalamus, les neurones orexinergiques se projettent sur les noyaux ventro- et dorso-médian, sur le noyau paraventriculaire (Peyron et al., 1998; Mondal et al., 1999; Nambu et al., 1999) ainsi que sur les neurones NPY/AgRP et POMC/CART du noyau arqué (Peyron et al., 1998; Horvath et al., 1999; Mondal et al., 1999; Nambu et al., 1999) qui se projettent en retour massivement sur l'hypothalamus latéral (Broberger et al., 1998).

- *Récepteurs* : Les orexines possèdent deux types de récepteurs : OX1R et OX2R. Alors que l'orexine B présente beaucoup d'affinité pour le récepteur OX2R et peu pour le récepteur OX1R ; l'orexine A semble se fixer avec des affinités importantes et équivalentes sur les deux types de récepteurs (Sakurai et al., 1998). Les récepteurs OX1R et OX2R présentent des répartitions différentes dans le système nerveux central, mais sont exprimés abondamment dans la plupart des noyaux hypothalamiques tels que le noyau arqué, le noyau ventromédian, l'hypothalamus latéral et le noyau paraventriculaire (Trivedi et al., 1998; Hervieu et al., 2001).

- *Rôles dans la régulation de l'homéostasie énergétique* : Les orexines jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique à court terme. En effet, le taux d'expression de la préproorexine dans l'hypothalamus latéral est grandement augmenté en période de jeûne et lors d'une hypoglycémie aigue (Sakurai et al., 1998; Cai et al., 1999). L'orexine A est particulièrement efficace pour stimuler la prise alimentaire. Initialement, il a été montré que les administrations intracérébroventriculaires des deux orexines augmentaient la prise alimentaire mais que l'orexine A semblait être plus efficace que l'orexine B pour maintenir cet effet de manière durable (Sakurai et al., 1998). Par la suite, d'autres auteurs ont démontré que seule l'orexine A était capable d'augmenter la prise alimentaire de manière aigue

(Haynes et al., 1999). En effet, les injections chroniques d'orexine A augmentent la prise alimentaire pendant la phase active et diminuent la prise alimentaire pendant la phase de repos alors que l'orexine B reste sans effet. Globalement, l'administration centrale chronique d'orexine A ne modifie pas la prise alimentaire quotidienne totale et, en conséquence n'induit pas d'augmentation de la masse corporelle à long terme (Haynes et al., 1999; Yamanaka et al., 2003).

L'orexine A stimule l'activité des neurones NPY/AgRP du noyau arqué. En effet, les neurones orexinergiques se projettent massivement dans le noyau arqué (Horvath et al., 1999; Mondal et al., 1999). De plus, l'orexine A induit l'expression du marqueur d'activité neuronal *c-fos* au sein des neurones NPY/AgRP et l'augmentation de la prise alimentaire induite par l'orexine A est partiellement abolie par l'injection d'un antagoniste des récepteurs du NPY (Yamanaka et al., 2000). Ces données indiquent qu'au moins une partie des effets des neurones orexinergiques est prise en charge par les neurones NPY/AgRP du noyau arqué et que ces deux systèmes contribuent ensemble à augmenter la prise alimentaire.

Tout comme les neurones POMC/CART et NPY/AgRP du noyau arqué, les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral interagissent avec les hormones et les nutriments libérés en périphérie. En effet, les neurones orexinergiques sont pourvus de récepteurs de la leptine (Horvath et al., 1999) et l'administration centrale de ce signal d'adiposité induit une diminution de l'expression d'orexine A ainsi qu'une diminution de l'activité électrique de ces neurones (Beck and Richey, 1999; Yamanaka et al., 2003). De plus, l'activité électrique des neurones orexinergiques est augmentée par l'application de ghréline (Yamanaka et al., 2003).

Plusieurs données indiquent que les neurones de l'hypothalamus latéral ne sont pas directement sensibles à l'insuline, mais qu'ils sont en revanche particulièrement sensibles aux fluctuations du taux de glucose circulant. L'expression d'orexine est stimulée une injection périphérique et hypoglycémiant de l'insuline, mais cet effet est aboli lors d'injections conjointes d'insuline et de glucose non-hypoglycémiantes (Griffond et al., 1999). Il a par ailleurs été avéré que l'application d'insuline sur les neurones orexinergiques ne semble pas en moduler l'activité électrique (Yamanaka et al., 2003). L'hypothalamus latéral est une structure centrale composée de neurones glucosensibles (Anand et al., 1964; Oomura et al.,

1969). Ainsi la vaste majorité des neurones orexinergiques glucosensibles diminuent leur activité électrique en réponse à l'application de glucose (Yamanaka et al., 2003; Burdakov et al., 2005). L'ensemble de ces données indique que les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral participent à stimuler la prise alimentaire en période de jeûne et à diminuer la prise alimentaire en période d'abondance énergétique.

2.1.3) Le noyau paraventriculaire et le CRF

Le noyau paraventriculaire est situé autour de la partie supérieure du troisième ventricule et il représente une structure d'intégration de la régulation de l'homéostasie énergétique au cœur de l'hypothalamus. En effet, ce noyau est richement innervé par les neurones POMC/CART et NPY/Agrp du noyau arqué et les neurones à orexine de l'hypothalamus latéral (Jacobowitz and O'Donohue, 1978; Bai et al., 1985; Mountjoy et al., 1994; Peyron et al., 1998). Le noyau paraventriculaire est sensible aux signaux de satiété périphérique. En effet les récepteurs de la cholecystokinine sont exprimés dans le noyau paraventriculaire, et l'infusion de cholecystokinine dans cette structure induit une diminution de la prise alimentaire (Blevins et al., 2000; Mercer et al., 2000; Mercer and Beart, 2004; Wynne et al., 2005). Ce noyau synthétise en retour des neuropeptides anorexigènes, tels que le CRF (Corticotropin-Releasing Factor), dont l'administration exogène dans le système nerveux central diminue la prise alimentaire et la masse corporelle (Cummings et al., 1983; Hotta et al., 1991).

2.2) Le tronc cérébral

Le tronc cérébral est classiquement décrit comme étant le centre intégrateur des signaux à court terme de faim et de satiété. D'une part, le tronc cérébral reçoit de la périphérie des informations nerveuses transmises par le nerf vague qui est activé i) par la distension du tractus gastro-intestinal lors du passage du bol alimentaire ii) par l'action des nutriments et des hormones du tractus gastro-intestinal sur les terminaisons vagales locales. D'autre part, le tronc cérébral reçoit directement les nutriments et les hormones qui atteignent le système nerveux central. En particulier, les noyaux du tronc cérébral impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, tel que le noyau du tractus solitaire, sont situés à proximité de l'*area postrema*, un organe circonventriculaire dépourvu de barrière hémato-

encéphalique, qui permet au tronc cérébral de collecter les signaux de régulation de l'homéostasie énergétique présents dans la circulation sanguine.

Le noyau du tractus solitaire est un noyau du tronc cérébral particulièrement impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Il est une cible privilégiée de fibres en provenance de l'hypothalamus et il envoie en retour d'importantes projections au niveau des noyaux hypothalamiques tels que le noyau arqué (Ricardo and Koh, 1978). Une sous-population de neurones du noyau du tractus solitaire exprime le neuropeptide anorexigène POMC (Palkovits et al., 1987; Cowley et al., 2001). De plus, les récepteurs des mélanocortines MC4R sont également exprimés dans le noyau du tractus solitaire ainsi que dans le noyau moteur dorsal du nerf vague, situé plus ventralement et à l'origine des efférences vagales en direction du tractus gastro-intestinal (Liu et al., 2003). Ainsi, les injections d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs des mélanocortines dans le quatrième ventricule diminuent et augmentent respectivement la prise alimentaire et la masse corporelle (Grill et al., 1998).

Les neurones POMC du noyau du tractus solitaire sont sensibles aux signaux de satiété libérés par le tractus gastro-intestinal et aux nutriments présents dans la circulation sanguine après l'ingestion d'un repas. Cet effet est partiellement dû à la libération de cholecystokinine, car l'administration périphérique de cholecystokinine diminue la prise alimentaire et active certains neurones POMC du noyau du tractus solitaire. De plus, les neurones du noyau du tractus solitaire expriment les récepteurs CCK_A et CCK_B de la cholecystokinine et l'administration de cholecystokinine directement dans le noyau du tractus solitaire ou dans le quatrième ventricule induit une diminution de la prise alimentaire (Blevins et al., 2000; Mercer et al., 2000; Mercer and Beart, 2004) ; et l'effet satiétogène de la cholecystokinine est inhibé en présence d'un inhibiteur du récepteur des mélanocortines MC4R (Fan et al., 2004). Enfin, tout comme les neurones du noyau arqué et de l'hypothalamus, les neurones du noyau du tractus solitaire sont également capables d'adapter leurs fréquences de décharge en fonction des variations du taux de glucose circulant (Mizuno and Oomura, 1984).

Ensemble, les informations sur les changements de la quantité d'énergie disponible portés par le nerf vague, les nutriments, les hormones du tractus gastro-intestinal, les

signaux d'adiposité sont donc intégrés dans le tronc cérébral et l'hypothalamus pour contrôler la prise alimentaire et la masse corporelle. Ces centres intégrateurs contrôlent à leur tour les tissus et les organes importants dans la régulation de l'homéostasie énergétique tels que le foie, le pancréas, le tissu adipeux et les muscles squelettiques. Ils induisent alors la sécrétion d'hormones clés dans la régulation du métabolisme énergétique, en activant le système nerveux autonome et l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ces centres intégrateurs permettent également à l'organisme de fournir une réponse comportementale adaptée en initiant ou en inhibant le comportement alimentaire. Ainsi, par une action coordonnée entre tous les acteurs du système de régulation de l'homéostasie énergétique, ces centres intégrateurs sont capables de répondre aux besoins énergétiques chroniques de l'organisme mais sont également capables de s'adapter aux besoins aigus pour assurer l'équilibre énergétique de l'organisme à court et à long terme. L'équilibre énergétique repose principalement sur l'égalité entre les apports et les dépenses énergétiques. Les déséquilibres du système de régulation de l'homéostasie énergétique entraînent l'établissement de pathologies métaboliques telles que l'obésité, pour laquelle les apports énergétiques dépassent de manière chronique la dépense énergétique globale.

Chapitre III - Problématique de recherche : Les interactions entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique

Les interactions entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique représentent le cœur de ma problématique de recherche et nous en développerons les différents aspects dans cette troisième partie de l'introduction.

1) Substrats anatomiques et moléculaires

D'un point de vue anatomique, le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique partagent des voies neuroanatomiques communes et sont connectés réciproquement. D'une part, le système olfactif se projette au niveau de l'hypothalamus. En effet, le bulbe olfactif se projette directement sur le noyau supraoptique de l'hypothalamus (Smithson et al., 1989). De plus, la stimulation électrique du bulbe olfactif induit une réponse électrophysiologique au niveau de l'hypothalamus latéral et du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Guevara-Aguilar et al., 1988; Price et al., 1991). Enfin, de nombreuses structures sur lesquelles se projettent le bulbe olfactif, telles que le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif et le cortex piriforme, se projettent également sur l'hypothalamus latéral (Barone et al., 1981; Price et al., 1991; Astic et al., 1993). D'autre part, le système olfactif reçoit les afférences de divers noyaux hypothalamiques (De Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984). En particulier, nous l'avons déjà évoqué dans les deux premiers chapitres, le bulbe olfactif est la cible directe de fibres orexinergiques originaires de l'hypothalamus latéral (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). De plus, certains neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus se projettent dans le tubercule olfactif (Newman and Winans, 1980).

Neuropeptide ou hormone	Bulbe olfactif	Hypothalamus	Références
ARNm AgRP, AgRP	-	✓	Haskell-Luevano 1999
ARNm POMC, α MSH	-	✓	Jacobowitz & O'Dohonue 1978 ; Gee 1983
ARNm MC3R	-	✓	Roselli-Reh fuss 1993
ARNm MC4R	-	✓	Mountjoy 1994
ARNm Ghreline, Ghreline	-	✓	Mondal 2005 ; Hou 2006
ARNm GR, GR	-	✓	Mondal 2005 ; Zigman 2006 ; Hou 2006
ARNm GRP, GRP	-	✓	Wada 1990 ; Moody 1988
ARNm GRPR	-	✓	Wada 1992
ARNm OXA, OXA	-	✓	De Lecea 1998 ; Peyron 1998 ; Nambu 1999
ARNm OXR, OXR	✓	✓	Trivedi 1998 ; Hervieu 2001 ; Caillol 2003 ; Hardy 2005 ; Prud'Homme 2009
ARNm MCH, MCH	-	✓	Bittencourt 1992 ; Broberger 1998
ARNm MCHR, MCHR	✓	✓	Hervieu 2000
Leptine	-	✓	Morash 1999
ARNm LepR, LepR	✓	✓	Mercer 1996 ; Fei 1997 ; Shioda 1998 ; Prud'Homme 2009
ARNm CRF, CRF	✓	✓	Merchenthaler 1982 ; Cummings 1983 ; Imaki 1989
ARNm CRFR, CRFR	✓	✓	De Souza 1985 ; Chen 2005
ARNm NPY, NPY	✓	✓	Gall 1986 ; Larhammar 1987 ; Danger 1990 ; Broberger 1998 ; Blakemore 2006
ARNm NPYR, NPYR	✓	✓	Giardino 1989 ; Parker & Herzog 1999 ; Migita 2001 ; Blakemore 2006
ARNm CART, CART	✓	✓	Couceyro 1997 ; Koylu 1998 ; Kristensen 1998 ; Elias 2001
Insuline	✓	✓	Young 1986 ; Devaskar 1994
ARNm IR, IR	✓	✓	Hill 1986 ; Unger 1989 ; Marks 1990 ; Fadool 2000
ARNm CCK, CCK	✓	✓	Innis 1979 ; Seroogy 1985 ; Ingram 1999
CCKR	✓	✓	Honda 1993 ; Mercer 2000 ; Mercer 2004
ARNm NMB, NMB	✓	-	Wada 1990 ; Moody 1988
ARNm NMBR	-	✓	Wada 1992

Tableau 1 : Comparaison de l'expression des neuropeptides et des hormones de la régulation de l'homéostasie, ainsi que de leurs récepteurs, dans le bulbe olfactif et l'hypothalamus.

Ce tableau rassemble les données de la littérature concernant la localisation, dans le bulbe olfactif et l'hypothalamus, des sites de production (avec la présence de l'ARNm ou du peptide au niveau des corps cellulaires de neurones) des neuropeptides et des hormones de la régulation de l'homéostasie énergétique ainsi que de leurs récepteurs. Les molécules représentées ici sont : L'agouti-related protein (AgRp) ; la proopiomélanocortine (POMC) ; l' α -mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ; les récepteurs des mélanocortines 3 et 4 (MC3R et MC4R) ; la ghréline et son récepteur (GR) ; le gastrin releasing peptide (GRP) et son récepteur (GRPR) ; l'orexine A (OXA et ses récepteurs (OXR) ; la melanin-concentrating hormone (MCH) et son récepteur (MCHR) ; la leptine et son récepteur (LepR) ; le corticotropin-releasing factor (CRF) et son récepteur (CRFR) ; le neuropeptide Y (NPY) et ses récepteurs (NPYR) ; le cocaïne- and amphetamine-regulated transcript (CART) ; l'insuline et son récepteur (IR) ; la cholecystokinine (CCK) et ses récepteurs (CCKR) ; la neuromédine B (NMB) et son récepteur (NMBR). Les molécules orexigènes sont représentées en vert et les molécules anorexigènes sont représentées en orange. L'ensemble des molécules peut être divisé en quatre catégories : 1) les molécules qui sont exprimées avec leurs récepteurs spécifiquement par l'hypothalamus (zone bleue) ; 2) les molécules qui sont exprimées uniquement par l'hypothalamus et qui partagent leurs récepteurs avec le bulbe olfactif (zone verte) ; 3) les molécules qui sont exprimées avec leurs récepteurs par l'hypothalamus et le bulbe olfactif (zone orange) ; 4) les molécules qui sont exprimées avec leurs récepteurs spécifiquement par le bulbe olfactif (zone violette).

En plus de ces interactions anatomiques, le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique semblent partager plusieurs voies moléculaires communes. En effet, la plupart des hormones et des neuropeptides produits par les organes et les centres intégrateurs de la régulation de l'homéostasie énergétique semblent pouvoir agir au niveau de leurs récepteurs exprimés par le système olfactif. En retour, un certain nombre de ces hormones et de ces neuropeptides sont également produits par des structures olfactives.

Ainsi, le tableau 1 récapitule la répartition des molécules impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle i) dans l'hypothalamus, le cœur du système de régulation de l'homéostasie énergétique ; ii) dans le bulbe olfactif, le premier relais central de l'information olfactive. Bien que de nombreuses molécules et leurs récepteurs soient également exprimés en périphérie, dans le tronc cérébral ainsi que dans de multiples structures olfactives, par souci de clarté, nous limiterons notre comparaison au bulbe olfactif et à l'hypothalamus.

Une première catégorie de molécules semble être spécifique au réseau hypothalamique, à l'image du système des mélanocortines. En effet, l'AgRp et l' α MSH sont deux neuropeptides produits par les neurones de l'hypothalamus mais pas par les neurones du bulbe olfactif (Jacobowitz and O'Donohue, 1978; Gee et al., 1983; Haskell-Luevano et al., 1999).

Parallèlement, les récepteurs de ces deux hormones, MC3R et MC4R, sont exprimés sélectivement dans les noyaux hypothalamiques (Roselli-Reh fuss et al., 1993; Mountjoy et al., 1994). De la même manière, la ghréline et le GRP, deux molécules produites majoritairement par le tractus gastro-intestinal, sont également exprimées, ainsi que leurs récepteurs respectifs, dans l'hypothalamus mais pas dans le réseau bulbaire (Moody et al., 1988; Wada et al., 1990; Wada et al., 1992; Mondal et al., 2005; Hou et al., 2006; Zigman et al., 2006).

Une deuxième catégorie de molécules est exprimée préférentiellement par l'hypothalamus mais semble pouvoir agir au niveau des réseaux bulbaire et hypothalamique. Les deux neuropeptides orexigènes, orexine A et MCH, sont produits spécifiquement par les neurones de l'hypothalamus latéral (Bittencourt et al., 1992; Broberger et al., 1998; De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999) qui projettent sur de nombreuses structures telles que l'hypothalamus et le bulbe olfactif, qui expriment conjointement les récepteurs de ces deux molécules (Trivedi et al., 1998; Hervieu et al., 2000; Hervieu et al., 2001; Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Prud'homme et al., 2009). De plus, la leptine, produite majoritairement en périphérie par le tissu adipeux, est également synthétisée par les neurones de l'hypothalamus (Morash et al., 1999) et possède des récepteurs à la fois dans l'hypothalamus et dans le bulbe olfactif (Mercer et al., 1996; Fei et al., 1997; Shioda et al., 1998; Prud'homme et al., 2009).

Une troisième catégorie de molécules est exprimée parallèlement par les neurones de l'hypothalamus et du bulbe olfactif, et possède des récepteurs dans divers noyaux hypothalamiques tout comme dans le réseau bulbaire. Ainsi, le neuropeptide anorexigène CRF est produit par le noyau paraventriculaire et abondamment par le bulbe olfactif (Merchanthaler et al., 1982; Cummings et al., 1983; Imaki et al., 1989); et les récepteurs de cette molécule sont exprimés par les neurones hypothalamiques comme par les neurones bulbaires (De Souza et al., 1985; Chen et al., 2005). De plus, le NPY et le CART sont produits en abondance par le bulbe olfactif et modérément par l'hypothalamus (Gall et al., 1986; Larhammar et al., 1987; Danger et al., 1990; Couceyro et al., 1997; Broberger et al., 1998; Koylu et al., 1998; Kristensen et al., 1998; Elias et al., 2001; Blakemore et al., 2006) et les récepteurs du NPY sont exprimés de manière équivalente par les neurones hypothalamiques et les neurones bulbaires (Giardino et al., 1989; Parker and Herzog, 1999; Migita et al., 2001;

Blakemore et al., 2006). La répartition des récepteurs du neuropeptide CART demeure inconnue car ces récepteurs n'ont pas encore été identifiés (Vicentic et al., 2006). En plus de leurs productions périphériques majeures, l'insuline et la cholecystokinine sont toutes deux synthétisées par les neurones du bulbe olfactif et de l'hypothalamus (Innis et al., 1979; Seroogy et al., 1985; Young, 1986; Ingram et al., 1989; Devaskar et al., 1994) et leurs récepteurs respectifs sont exprimés conjointement par ces deux structures (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990; Honda et al., 1993; Fadool et al., 2000; Mercer et al., 2000; Mercer and Beart, 2004).

Une quatrième et dernière catégorie de molécules concerne l'unique neuropeptide exprimé de manière sélective par le bulbe olfactif : la neuromédine B. Cette molécule anorexigène est produite par le tractus gastro-intestinal et le système nerveux. De manière surprenante, le bulbe olfactif principal est la structure centrale exprimant la plus grande quantité de neuromédine B (Moody et al., 1988; Wada et al., 1990). Une très faible quantité de récepteur de la neuromédine B est exprimée dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. En revanche, le récepteur de la neuromédine B est exprimé abondamment au niveau de structures olfactives telles que le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif, le cortex piriforme et la tenia tecta, qui sont connues pour être connectées anatomiquement à l'hypothalamus (Wada et al., 1992).

Nous faisons l'hypothèse que ces liens anatomiques et moléculaires bidirectionnels pourraient représenter le support des interactions fonctionnelles entre le système de régulation de l'homéostasie énergétique et le système olfactif.

2) Interactions fonctionnelles

De nombreuses données chez l'homme et l'animal, révèlent les interactions fonctionnelles entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique. D'une part, les informations portées par le système olfactif peuvent influencer la prise alimentaire et la masse corporelle. D'autre part, les états alimentaires et métaboliques, orchestrés par le système de régulation de l'homéostasie énergétique, modulent la perception olfactive.

2.1) Les informations olfactives régulent le comportement alimentaire

La perception de la qualité sensorielle de la nourriture, codée par la plupart des sens et principalement par l'olfaction, joue un rôle essentiel dans la régulation des états alimentaires et métaboliques.

Tout d'abord, la perception sensorielle de la nourriture lors de son arrivée dans la cavité buccale induit des changements métaboliques rapides regroupés sous le terme de « phase céphalique » initialement décrite par Pavlov au début du 20^{ème} siècle. La perception sensorielle de la nourriture initie un réflexe vagal qui stimule la production de salive, la libération d'enzymes et d'hormones gastriques, la sécrétion endocrine et exocrine d'enzymes et d'hormones pancréatiques et la thermogénèse avant même que le bol alimentaire n'entre dans le tractus gastro-intestinal. La libération enzymatique et hormonale lors de la phase céphalique initie le comportement alimentaire, favorise la digestion, l'absorption et l'utilisation optimale des nutriments (Giduck et al., 1987; Zafra et al., 2006). A titre d'exemple, la perception sensorielle de la nourriture induit une sécrétion rapide d'insuline par le pancréas, responsable d'une légère hypoglycémie pré-prandiale qui participe à l'initiation la prise alimentaire et favorise ensuite la tolérance du glucose libéré massivement lors de l'ingestion d'un repas (Louis-Sylvestre, 1976; Louis-Sylvestre and Le Magnen, 1980; Bellisle et al., 1985; Campfield et al., 1985; Ahren and Holst, 2001). La plupart des études portant sur la phase céphalique chez l'Homme reposent sur l'observation des effets métaboliques de la prise alimentaire fictive (« sham-feeding »), consistant à introduire, mâcher puis extraire de la nourriture sans l'avaler. Un tel paradigme ne permet pas de dissocier les effets propres de la vue, du toucher, de la gustation et de l'olfaction (orthonasale et rétronasale) mis en jeu lors de la mise en bouche de la nourriture. Ils sont généralement analysés conjointement. En outre, certains éléments indiquent que l'olfaction, à elle seule, permet d'initier la phase céphalique. En effet, l'odeur de nourriture provoque la sécrétion de salive par les glandes parotides et la sécrétion de gastrine par l'estomac de manière significative sans que le sujet ne mette en bouche la nourriture (Pangborn et al., 1979; Feldman and Richardson, 1986).

De plus, la variété qualitative et sensorielle de la nourriture présentée au cours d'un repas influence quantitativement la prise alimentaire. Le Magnen a initialement démontré en

1956 qu'il était possible d'induire une hyperphagie en faisant varier la qualité sensorielle de la nourriture au cours d'un repas. Pour cela, des rats ont été habitués à recevoir un repas quotidien de deux heures au cours desquelles quatre rations de nourriture odorisées par une même odeur leur étaient proposées. A l'issue de l'habituation, la présentation de quatre rations odorisées par quatre odeurs différentes induit une augmentation de la consommation de nourriture d'au moins 70% au cours du repas (Le Magnen, 1999) (publié pour la première fois en 1956). Trente années plus tard, ce phénomène, dès lors nommé « satiété sensorielle », a été confirmé chez l'Homme par Rolls (1984) qui a également montré que lors d'un repas varié comportant plusieurs plats différents (incluant des odeurs mais aussi des saveurs, des textures et des apparences différentes), le nombre de calories ingérées était de 60% supérieur au nombre de calories consommées lors d'un repas constitué de plusieurs présentations du même plat (Rolls et al., 1984). La palatabilité, qui correspond à l'évaluation hédonique des caractéristiques oro-sensorielles de la nourriture, intervient dans le phénomène de satiété sensorielle. De nombreuses études menées principalement chez l'Homme ont montré que, à valeur énergétique égale, plus la nourriture est palatable, plus elle est consommée en grande quantité (Sorensen et al., 2003). De plus, la palatabilité diminue au fur et à mesure de la présentation d'un plat qui a été préalablement consommé, goûté ou simplement senti alors qu'elle reste inchangée pour les plats qui n'ont pas encore été consommés. Ainsi, la variété sensorielle d'un repas entretient la palatabilité et relance la prise alimentaire lors de la présentation d'un nouveau plat (Rolls et al., 1981; Rolls et al., 1984; Rolls and Rolls, 1997).

Une des approches utilisées pour évaluer le rôle de l'information olfactive sur le métabolisme énergétique consiste à étudier l'impact de lésions du système olfactif sur le comportement alimentaire et la masse corporelle. Le modèle de lésion le plus étudié est sans doute l'ablation bilatérale des bulbes olfactifs, qui a apporté des résultats très contradictoires. Certains auteurs ont rapporté, chez le rat, qu'une telle lésion diminue la taille des repas mais que cet effet est compensé par l'augmentation du nombre de repas et que ces changements du comportement alimentaire s'estompent au bout de quelques semaines (Meguid et al., 1993; Meguid et al., 1997). D'autres auteurs ont montré que la bulbectomie bilatérale augmente la prise alimentaire et conduit à l'obtention d'un phénotype obèse chez le hamster et le primate (Miro et al., 1980; Miro et al., 1982; Seguy and Perret, 2005). De plus, la bulbectomie bilatérale potentialise l'hyperphagie et l'obésité associées à la lésion de

l'hypothalamus ventromédian (Larue and Le Magnen, 1968). Enfin, un article récent a mis en évidence que la bulbectomie augmente la prise alimentaire et l'expression du NPY dans l'hypothalamus de rats susceptibles de développer une obésité et que cette lésion n'a pas d'effet sur les rats résistants à l'obésité (Primeaux et al., 2007).

Ces données suggèrent que l'intégrité du système olfactif semble nécessaire pour permettre une régulation efficace du comportement alimentaire et que son rôle est d'autant plus important chez des animaux obèses. Cependant, les mécanismes sous-tendant une telle régulation demeurent inconnus. En outre, l'existence de résultats contradictoires remet en question la validité du modèle de bulbectomie, qui est par ailleurs à la base d'autres déficits que l'anosmie, comme la mise en place d'une dépression qui affecte de nombreux comportements (Song and Leonard, 2005).

2.2) Les états alimentaires et métaboliques modulent la perception olfactive

L'étude de l'influence de l'état alimentaire sur la perception olfactive remonte au début du 20^{ème} siècle, lorsque plusieurs expériences ont révélé une augmentation marquée de la sensibilité olfactive de sujets humains lors d'une période de jeûne prolongée (Langfeld, 1914; Glaze, 1928, 1929). Une vingtaine d'années plus tard, d'autres études chez l'Homme ont permis d'identifier des variations diurnes de l'acuité olfactive en fonction de l'état alimentaire. Ainsi, ces auteurs ont démontré que la sensibilité olfactive était augmentée en état de faim et diminuée en période de rassasiement (Goetzl and Stone, 1947, 1948; Goetzl et al., 1950; Schneider and Wolf, 1955; Furchtgott and Friedman, 1960). De plus, chez des sujets affamés, la consommation de sucrose ou la distension de l'estomac revient à mimer la sensation de rassasiement et induit une diminution de l'acuité olfactive (Ahokas and Goetzl, 1951; Goetzl et al., 1951). A l'inverse, certaines études n'ont pas permis reproduire les résultats de Goetzl, et n'ont pas réussi à révéler de lien entre les variations de l'acuité olfactive et l'état alimentaire (Janowitz and Grossman, 1949; Zilstorff-Pedersen, 1955; Turner and Patterson, 1967). Plus récemment, Koelega (1994) a montré qu'il y avait effectivement une variation diurne de l'acuité olfactive, mais qu'elle n'était pas liée à la prise alimentaire (Koelega, 1994). Par ailleurs, certains auteurs ont également démontré que les sujets obèses présentaient une moins bonne acuité olfactive que les sujets normaux (Guild, 1956). Une étude plus récente a également indiqué que les patientes obèses présentaient des altérations

de la fonction olfactive (Richardson et al., 2004). A l'inverse, une autre étude a démontré que des enfants atteints d'obésité présentaient une excellente acuité olfactive (Obrebowski et al., 2000). L'ensemble de ces études chez l'Homme ne semble donc pas nous permettre de tirer de conclusions définitives sur la modulation de la sensibilité olfactive par les états alimentaires et métaboliques. Une des raisons principales repose sur la difficulté de contrôler qualitativement et quantitativement les repas de sujets humains pour mettre en évidence les variations subtiles de l'acuité olfactive en fonction d'un état alimentaire précisément caractérisé. Enfin, les études chez l'Homme ne donnent pas accès aux mécanismes sous-tendant la modulation de la sensibilité olfactive par les états alimentaires, contrairement aux modèles animaux qui sont en cela, beaucoup plus informatifs.

L'étude des mécanismes de modulation du traitement de l'information olfactive par les états alimentaires chez des modèles animaux a été initiée dans les années 70 par des études d'électrophysiologie menées dans l'équipe de Le Magnen (Giachetti et al., 1970). Ces travaux, associés aux études d'autres équipes, ont permis de montrer que l'activité électrique du bulbe olfactif est modulée par l'état alimentaire. Chez le rat vigile, la réactivité des cellules mitrales est augmentée en état de faim et diminuée en état de rassasiement (Pager et al., 1972). Ces auteurs indiquent que la modulation de l'activité bulbaire par l'état alimentaire est observée seulement en réponse à des odeurs alimentaires et n'est pas observée pour des odeurs neutres (Pager et al., 1972). Ces auteurs précisent cependant que la réactivité des cellules mitrales à d'autres odeurs peut s'acquérir au cours de l'expérience alimentaire des animaux. En effet, lorsque des animaux sont habitués depuis le sevrage à consommer une nourriture odorisée à l'eucalyptol, alors la réactivité des cellules mitrales à l'odeur d'eucalyptol à l'âge adulte est modulée par l'état alimentaire de la même manière que l'odeur de l'aliment (Pager, 1974). Depuis, plusieurs auteurs ont prouvé que l'état alimentaire modulait également la réactivité des cellules mitrales aux odeurs neutres. En effet, plus récemment, Apelbaum et Chaput (2003) ont démontré que l'activité des cellules mitrales en réponse à des odeurs de nourriture mais également à diverses odeurs neutres étaient augmentées en réponse à un jeûne aigu et à un jeûne chronique, et qu'elle était diminuée chez les animaux nourris. De plus, le degré de réactivité des cellules mitrales est modifié par l'expérience alimentaire et est plus importante chez les animaux soumis à un jeûne aigu que chez les animaux habitués à un jeûne chronique (Apelbaum and Chaput,

2003). L'injection périphérique d'insuline, en induisant une forte hypoglycémie, revient à mimer le jeûne alimentaire et augmente la réactivité des cellules mitrales à une odeur neutre ou à odeur de nourriture de la même manière que l'état de faim physiologique (Pager et al., 1972; Cain, 1975). Suite à l'injection d'insuline, l'administration périphérique de glucose restaure l'activité électrique des cellules mitrales à son niveau basal (Cain, 1975). La distension gastrique obtenue artificiellement par l'introduction d'un ballon gonflable dans l'estomac induit une diminution de l'activité multiunitaire des cellules mitrales du bulbe olfactif, et reproduit fidèlement la sensation de rassasiement due au passage du bol alimentaire dans l'estomac (Chaput and Holley, 1976). Récemment, il a été montré que les cellules mitrales ne sont pas les seules cellules du réseau bulbaire dont l'activité est modulée par l'état alimentaire. En effet, le jeûne induit l'expression du marqueur d'activation neuronal *c-fos* i) dans la couche des cellules mitrales pour les odeurs familières non-alimentaire et les odeurs alimentaires ii) dans la couche des cellules granulaires pour les odeurs neutres, familières non-alimentaires et alimentaires (Prud'homme et al., 2009).

Ces données suggèrent que des signaux périphériques et centraux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire sont libérés en état de faim et en état de rassasiement et viennent agir au niveau du système olfactif, et en particulier au niveau du bulbe olfactif, pour moduler l'acuité olfactive.

2.2.1) Le rôle de l'Orexine A dans la fonction olfactive

L'orexine A est un neuropeptide orexigène synthétisé par les neurones de l'hypothalamus latéral en réponse à un jeûne alimentaire (De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Cai et al., 1999; Haynes et al., 1999; Nambu et al., 1999; Yamanaka et al., 1999). Les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral se projettent massivement sur de nombreuses structures cérébrales et en particulier sur plusieurs structures du système olfactif telles que le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999; Shibata et al., 2008). Au sein du bulbe olfactif, les fibres orexinergiques sont distribuées dans toutes les couches cellulaires : de la couche des nerfs la plus externe, à la couche granulaire la plus interne. Toutefois, les quantités de fibres immunoréactives semblent plus importantes dans la couche glomérulaire et dans les couches des cellules mitrales et granulaires, que dans les autres couches (Caillol et

al., 2003; Shibata et al., 2008). Les récepteurs des orexines (OX1R et OX2R) sont exprimés à tous les étages du système olfactif : dans l'épithélium olfactif, le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme (Caillol et al., 2003). Au sein du bulbe olfactif, les récepteurs des orexines sont exprimés principalement au niveau des corps cellulaires et des zones pré- et post-synaptiques des couches glomérulaire, mitrale et granulaire (Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Prud'homme et al., 2009). De manière intéressante, le récepteur OX2R, moins spécifique de l'orexine A que de l'orexine B, est exprimé plus faiblement que le récepteur OX1R non-sélectif. De plus, les fibres contenant l'orexine B sont moins abondantes que les fibres contenant l'orexine A (Caillol et al., 2003; Prud'homme et al., 2009). Ces données suggèrent que l'orexine A, plus spécifiquement impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique, joue probablement un rôle prépondérant au sein du réseau bulbaire. En effet, il a été démontré *in vivo* chez le rat anesthésié que l'injection intracérébroventriculaire ou l'application sur le bulbe olfactif d'orexine A modifie l'activité spontanée des cellules mitrales : l'orexine A peut soit inhiber, soit stimuler l'activité spontanée des cellules mitrales (Apelbaum et al., 2005). De plus, les enregistrements *in vitro* de cellules mitrales en patch-clamp sur tranches de bulbe olfactif de rat démontrent également que l'application d'orexine A est capable de produire ces deux effets, qui sont annulés par l'application d'un antagoniste des récepteurs OX1R. Sur certaines cellules mitrales, l'orexine A induit une dépolarisation. Cet effet est direct, et repose sur l'activation des récepteurs OX1R portés par les cellules mitrales. Sur d'autres cellules mitrales, l'orexine A provoque une hyperpolarisation. Cet effet est indirect et repose sur l'activation des interneurons GABAergiques granulaires et périglomérulaires, qui inhibent les cellules mitrales en réponse à l'application d'orexine A (Hardy et al., 2005). Pour corroborer ces résultats électrophysiologiques, il a récemment été démontré que l'injection intracérébroventriculaire d'orexine A stimule l'expression du marqueur d'activation neuronal *c-fos* dans les cellules mitrales, mais également dans les cellules granulaires et périglomérulaires en réponse à des odeurs alimentaires. Cet effet est inversé par l'administration d'un antagoniste des récepteurs des orexines (Prud'homme et al., 2009).

Bien que l'influence de l'orexine A sur le système olfactif semble être bien caractérisée au niveau cellulaire et électrophysiologique, très peu de données comportementales sont disponibles. Ainsi, la caractérisation de l'effet de l'injection d'orexine A sur les performances

olfactives a été réalisé lors de travaux menés au sein de l'équipe, et dont les résultats seront présentés dans cette thèse (Julliard et al., 2007).

2.2.2) Le rôle de la leptine dans la fonction olfactive

La leptine est une hormone anorexigène produite principalement par le tissu adipeux blanc (Zhang et al., 1994; Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). Les récepteurs de la leptine sont présents à plusieurs étages du système olfactif : au niveau de la muqueuse olfactive, du bulbe olfactif et du cortex piriforme (Shioda et al., 1998; Getchell et al., 2006; Baly et al., 2007; Prud'homme et al., 2009). Au niveau de l'épithélium olfactif, les récepteurs de la leptine sont exprimés par les neurorécepteurs olfactifs et les cellules de soutien et l'application de leptine module l'activité spontanée des neurorécepteurs olfactifs et diminue la réponse évoquée par une odeur neutre (Baly et al., 2007; Savigner et al., 2009). Au sein du réseau bulbaire, la forme longue du récepteur de la leptine est située sur les corps cellulaires des cellules granulaires et des cellules mitrales (Shioda et al., 1998; Prud'homme et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel, l'administration intracérébroventriculaire de leptine diminue l'expression du marqueur d'activation neuronal *c-fos* dans la couche des cellules mitrales et granulaires en réponse à des odeurs alimentaires (Prud'homme et al., 2009). Il existe actuellement très peu de données concernant l'influence de la leptine sur les performances olfactives au niveau comportemental. Getchell *et al.* (2006) ont mesuré le temps mis par des souris normales, *ob/ob* (ne produisant pas de leptine) et *db/db* (portant un récepteur de la leptine non-fonctionnel) pour retrouver de la nourriture cachée sous la litière. Il s'avère que les souris *ob/ob* et *db/db*, privées de la voie de signalisation de la leptine, sont beaucoup plus rapides que les souris normales pour retrouver la récompense alimentaire. De plus, l'administration de leptine chez les souris *ob/ob* diminue leurs performances, induisant alors un comportement identique à celui de souris normales (Getchell et al., 2006). L'ensemble de ces données électrophysiologiques, cellulaires et comportementales suggère que la leptine agit au niveau du système olfactif pour diminuer les performances olfactives. Cependant, la caractérisation comportementale de cet effet n'est pas satisfaisante, car le test utilisé par Getchell *et al.* (2006) ne permet pas de dissocier un éventuel effet de la leptine sur la sensibilité olfactive d'un effet majeur de la motivation des

souris obèses et hyperphagiques *ob/ob* et *db/db* en restriction alimentaire pour retrouver de la nourriture cachée sous leur litière.

2.2.3) Le rôle de l'insuline dans la fonction olfactive

L'insuline est une hormone d'adiposité produite par les cellules endocrines du pancréas (Polonsky et al., 1988). En périphérie, elle agit sur le premier étage du système olfactif. En effet, son récepteur est exprimé par les neurorécepteurs olfactifs et les cellules de soutien de l'épithélium olfactif et l'application d'insuline module l'activité spontanée des neurorécepteurs olfactifs et diminue la réponse évoquée par des odeurs neutres (Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009; Savigner et al., 2009). Cette hormone traverse la barrière hématoencéphalique pour atteindre le système nerveux central (Frank et al., 1986; Duffy and Pardridge, 1987; Schwartz et al., 1990b; Banks et al., 1997a). De manière intéressante, le taux de transport de l'insuline à travers la barrière hématoencéphalique est deux à huit fois plus important dans le bulbe olfactif que dans le reste du cerveau (Banks et al., 1999). En conséquence, le bulbe olfactif est, aux côtés de l'hypothalamus, la structure cérébrale contenant la plus importante quantité d'insuline (Baskin et al., 1983). Plusieurs études ont démontré que le bulbe olfactif contient également le plus grand nombre de récepteur de l'insuline du système nerveux central. Tout d'abord, une étude d'autoradiographie a permis de démontrer que l'insuline se fixe préférentiellement dans le bulbe olfactif (Hill et al., 1986) où elle semble avoir une affinité i) maximale pour les récepteurs de la couche plexiforme externe, ii) haute pour les récepteurs de la couche granulaire et iii) modérée pour les récepteurs de la couche glomérulaire. De plus, l'insuline se fixe également abondamment à d'autres étages du système olfactif, tels que le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif et le cortex piriforme. Cependant, la technique d'autoradiographie utilisée dans cette étude ne dispose pas d'une résolution spatiale suffisante pour délimiter précisément les couches ou identifier les différentes catégories cellulaires exprimant le récepteur de l'insuline. De plus, l'autoradiographie ne représente qu'une mesure indirecte de la localisation des récepteurs et repose sur la capacité de fixation d'un ligand (*i.e.* l'insuline) à son récepteur dont l'affinité peut présenter des variations régionales, biaisant alors l'interprétation de ces résultats. Une étude d'hybridation *in situ* a également démontré que le bulbe olfactif est la structure centrale exprimant la plus grande quantité de récepteur de l'insuline (Marks et al., 1990). En

effet, l'ARNm du récepteur de l'insuline est présent dans les cellules granulaires, mitrales et périglomérulaires. Le transcrit du récepteur de l'insuline est également retrouvé dans le cortex piriforme. En analysant la répartition de l'ARNm du récepteur de l'insuline, l'hybridation *in situ* possède une meilleure résolution spatiale que l'autoradiographie, mais donne encore une fois une mesure, certes complémentaire, mais indirecte de la localisation et de la quantification des sous-unités protéiques du récepteur de l'insuline. A notre connaissance, seules deux études ont analysé la localisation cellulaire du récepteur de l'insuline par des techniques d'immunohistochimie (Unger et al., 1989; Fadool et al., 2000). Unger *et al.* (1989) ont noté l'abondance de ce dernier dans plusieurs régions olfactives : dans les couches granulaire, plexiforme externe et glomérulaire du bulbe olfactif ainsi que dans le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme. Malheureusement, bien que ces données soient énoncées, aucun résultat au sein du bulbe olfactif n'est présenté. Fadool *et al.* (2000) ont étudié la localisation du récepteur de l'insuline au cours du développement chez le rat et ne présentent que les résultats de la couche des nerfs, de la couche glomérulaire et de la couche plexiforme externe, sans mentionner les autres couches. Enfin, ces études n'apportent pas d'informations sur la quantification et la localisation cellulaire du récepteur de l'insuline au sein du réseau bulbaire. L'ensemble de ces données nous a conduit à analyser la répartition et la quantité de récepteurs de l'insuline présents dans les différentes couches du réseau bulbaire adulte.

D'un point de vue fonctionnel, de plus en plus de données sont disponibles dans la littérature pour tenter de caractériser le rôle de l'insuline dans la fonction olfactive. Dès la fin des années 90, Fadool et ses collaborateurs se sont intéressés aux cibles moléculaires du récepteur de l'insuline dans le bulbe olfactif. Ils ont alors identifié un canal potassique voltage-dépendant, le Kv1.3, comme cible potentielle de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Bowlby et al., 1997). En effet, tout comme le récepteur de l'insuline, le canal Kv1.3 est abondamment exprimé dans le bulbe olfactif. Ainsi, l'application d'insuline sur une culture primaire de neurones du bulbe olfactif induit la phosphorylation du canal Kv1.3 et diminue l'amplitude du courant Kv1.3 (Fadool and Levitan, 1998; Fadool et al., 2000). Ces auteurs ont ensuite étudié une souris transgénique portant une délétion du canal Kv1.3. Ils ont alors observé que les neurones du bulbe olfactif en culture ont une excitabilité altérée et que l'effet de l'insuline sur l'amplitude du courant Kv1.3 est aboli. Le phénotype

olfactif des souris Kv1.3 *-/-* est particulièrement intéressant. En effet, ces souris retrouvent de la nourriture cachée sous la litière deux fois plus rapidement que les souris témoins. Par ailleurs, elles passent beaucoup plus de temps à explorer une odeur nouvelle que les souris témoins et sont capables de retrouver de la nourriture cachée sous de la litière odorisée pour des concentrations d'odorants beaucoup plus faibles que les témoins. Ainsi, les auteurs concluent que les souris Kv1.3 *-/-*, dépourvues de canal Kv1.3, présentent de meilleures capacités de discrimination et de détection olfactives que leurs témoins et les qualifient de « supersmellers » (Fadool et al., 2004). Ces données nous apportent des indices cruciaux sur la compréhension du rôle de l'insuline dans le système olfactif et indiquent que l'altération de la voie de signalisation insulinique conduit à une augmentation des performances olfactives. Cependant, les études de Fadool et de ses collaborateurs présentent plusieurs points faibles. 1) L'effet de l'insuline sur la conductance du canal Kv1.3 a été analysé sur des cultures primaires de bulbe olfactif au sein desquelles il est difficile de distinguer les cellules mitrales, des interneurons gabaergiques. Ainsi, la compréhension fine du rôle de l'insuline sur le fonctionnement du réseau bulbaire est difficile. 2) Le modèle transgénique est un modèle robuste et puissant, mais la délétion du canal Kv1.3 altère la mise en place d'un système olfactif normal au cours du développement. En ce sens, les auteurs ont démontré que les souris Kv1.3 *-/-* développent un système olfactif morphologiquement et fonctionnellement anormal. En effet, ces souris ont moins de neurorécepteurs olfactifs. Ces derniers présentent un nombre anormalement élevé de cils olfactifs et surexpriment les récepteurs moléculaires aux odeurs et la protéine G α olf. Ces souris ont également des bulbes olfactifs de taille réduite, avec des glomérules plus petits et plus nombreux que les souris témoins. Enfin, ces animaux développent des connexions épithélio-bulbaires anormales (Biju et al., 2008). 3) La plupart des tests comportementaux utilisés par ces auteurs font intervenir les performances locomotrices des animaux, or les souris Kv 1.3 *-/-* ont une activité locomotrice près de deux fois supérieure à celle de leurs témoins. 4) La plupart des tests comportementaux utilisés sont motivés par l'apport d'une récompense alimentaire alors que les souris Kv1.3 ont un comportement alimentaire altéré, avec une fréquence de prise alimentaire plus élevée que les souris témoins.

Au cours d'une étude très récente, Fadool et ses collaborateurs ont adopté une stratégie différente pour comprendre le rôle de l'insuline dans la fonction olfactive, en étudiant chez la

souris l'impact d'une administration intranasale d'insuline sur les performances olfactives (Marks et al., 2009). Tout d'abord, ces auteurs ont confirmé leurs résultats obtenus *in vitro* en démontrant que l'administration intranasale d'insuline induit une phosphorylation du canal Kv1.3 bulbaire *in vivo*, suggérant une activation fonctionnelle du réseau bulbaire suite à l'application d'insuline dans les cavités nasales. Au niveau comportemental, l'administration intranasale d'insuline augmente le temps d'exploration pour une nouvelle odeur suggérant que les souris traitées présentent de meilleures capacités de discrimination olfactive que les souris non-traitées. En revanche, cet effet semble être biaisé par la curiosité accrue de ces animaux, puisque l'administration intranasale d'insuline augmente également le temps d'exploration pour un nouvel objet non-odorisé. Enfin, ces auteurs n'ont pas mis en évidence de modification du seuil de détection olfactive chez les animaux traités par l'insuline. D'une manière générale, l'administration intranasale d'insuline semble difficilement compatible avec l'étude du comportement olfactif. En effet, étant donné le volume réduit de la cavité nasale d'une souris (32mm³, Gross et al., 1982) et comme le reconnaissent les auteurs, il est impossible de tester les animaux immédiatement après l'instillation de plusieurs dizaines de microlitres de solution d'insuline dans les narines des animaux. Les auteurs sont donc contraints de répéter ce traitement une fois par jour pendant six jours avant de tester les animaux 5h après la dernière administration d'insuline. La demi-vie de l'insuline dans le système nerveux central n'excédant pas 2h (Schwartz et al., 1990a; Cashion et al., 1996), on peut alors se demander quelle quantité d'insuline active est encore présente dans le bulbe olfactif 5h après la dernière application d'insuline. Le dosage de l'insuline dans le bulbe olfactif suite à l'administration d'insuline aurait probablement pu lever le doute sur ce point. Ainsi, plus qu'un effet aigu sur les performances olfactives, ces auteurs ont testé l'impact de changements fonctionnels induits par l'application chronique d'insuline sur les capacités olfactives. Enfin, bien que l'administration intranasale d'insuline induise une phosphorylation du canal Kv1.3 dans le bulbe olfactif, rien ne semble indiquer qu'il s'agisse d'un effet direct et on peut suggérer que l'insuline administrée dans la cavité nasale agit préférentiellement sur les neurorécepteurs olfactifs de l'épithélium, eux-mêmes équipés de récepteurs de l'insuline (Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009; Savigner et al., 2009), pour ensuite activer les neurones relais du bulbe olfactif.

En conclusion, il existe de nombreux éléments qui nous indiquent que l'insuline joue un rôle sur la fonction olfactive, mais un effet direct de l'insuline sur le réseau bulbaire et le rôle de l'insuline sur les capacités de détection olfactives pour des odeurs neutres reste à démontrer.

3) Objectifs de la thèse

L'ensemble des données que nous avons présenté indique qu'il existe une relation étroite et bidirectionnelle entre le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique. D'une part, il apparaît que le message olfactif est capable d'influencer la prise alimentaire et la masse corporelle. D'autre part, il semble que les états alimentaires et métaboliques modulent le traitement de l'information olfactive. De nombreux éléments démontrent que le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique partagent des voies neuroanatomiques et neurochimiques communes, qui pourraient représenter le support des interactions fonctionnelles existant entre ces deux systèmes. La caractérisation comportementale de l'influence des états alimentaires et métaboliques sur la perception olfactive a fait l'objet de plusieurs études qui n'ont pas permis de mettre en exergue un effet marqué et consensuel. Ainsi, **le premier objectif de ce travail de thèse consiste à caractériser l'influence des états alimentaires et métaboliques sur la perception olfactive.** La réalisation de cet objectif nécessite l'établissement d'un modèle de restriction alimentaire chez le rongeur, nous permettant de contrôler qualitativement et quantitativement la prise alimentaire et, en conséquence, de synchroniser l'état nutritionnel des animaux. Le protocole de restriction alimentaire, couplé au développement et à l'utilisation d'un test comportemental destiné à mesurer la capacité de détection olfactive des rongeurs devrait nous permettre de comparer les performances de détection olfactive des animaux en l'état affamé et en l'état rassasié. En complément, l'analyse de la modulation de la perception olfactive par l'état alimentaire mesuré pour des animaux obèses et résistants à l'obésité sera effectué afin d'étudier l'influence d'états métaboliques extrêmes sur le traitement de l'information olfactive.

A l'issue de l'étude de la modulation de la perception olfactive par les états alimentaires et métaboliques, la caractérisation des mécanismes sous-tendant de telles modulations sera effectuée. Au cours de la troisième partie de cette introduction, nous avons relaté les nombreux éléments nous permettant de suggérer que certaines molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique apparaissent comme d'excellents candidats capables de moduler le traitement de l'information olfactive en fonction des états alimentaires et métaboliques. Ainsi, **le second objectif de ce travail de thèse consiste à identifier et mettre en évidence le rôle des molécules impliquées dans la modulation de la perception olfactive par les états alimentaires et métaboliques.** Pour cela, nous focaliserons nos travaux sur l'étude de l'influence de la leptine et de l'insuline, deux hormones anorexigènes périphériques ; et de l'orexine, un neuropeptide hypothalamique orexigène, sur la capacité de détection olfactive des rats. Nous utiliserons un paradigme comportemental identique à celui utilisé pour l'accomplissement du premier objectif de ce travail de thèse. Afin d'approfondir notre compréhension du rôle de l'insuline dans la fonction olfactive, nos travaux comportementaux seront couplés à des études moléculaires, biochimiques et immunohistochimiques qui devraient nous permettre de comprendre l'influence des états alimentaires sur la quantité d'insuline, la localisation et le nombre de récepteurs de l'insuline présents dans le système olfactif et, en particulier, dans le réseau bulbaire.

Résultats expérimentaux

Chapitre I - Modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques

Comme nous l'avons relaté dans le troisième chapitre de l'introduction, de nombreuses données semblent indiquer que l'acuité olfactive est modulée par les états alimentaires et métaboliques. Les études chez l'Homme ont évoquées des variations diurnes de l'acuité olfactive (Goetzl and Stone, 1947, 1948; Janowitz and Grossman, 1949; Goetzl et al., 1950; Ahokas and Goetzl, 1951; Goetzl et al., 1951; Schneider and Wolf, 1955; Zilstorff-Pedersen, 1955; Furchtgott and Friedman, 1960; Turner and Patterson, 1967; Koelega, 1994) sans pour autant faire ressortir de manière consensuelle le rôle des états alimentaires sur la modulation de la sensibilité olfactive. De la même manière, les études menées sur des patients humains obèses n'ont pas permis de révéler l'influence d'un état métabolique pathologique sur les performances olfactives (Guild, 1956; Obrebowski et al., 2000; Richardson et al., 2004). Les études chez l'animal ont démontrées une modulation de la réactivité des cellules mitrales du bulbe olfactif par les états alimentaires (Giachetti et al., 1970; Pager et al., 1972; Pager, 1974; Cain, 1975; Chaput and Holley, 1976; Apfelbaum and Chaput, 2003; Prud'homme et al., 2009), sans étudier les conséquences d'une telle modulation au niveau comportemental.

Ainsi, la première étape de notre travail expérimental a consisté à développer un test comportemental nous permettant d'étudier de manière sélective les capacités de détection olfactive des rongeurs en fonction d'un état alimentaire parfaitement maîtrisé. Pour cela, les animaux sont placés en restriction alimentaire et ont accès à la nourriture au cours d'un unique repas quotidien de quatre heures, pendant leur phase active. Cette restriction alimentaire permet de contrôler précisément l'état nutritionnel des animaux en s'assurant que, dans les dernières heures qui précèdent le repas, tous les animaux de la cohorte seront affamés ; et que dans les premières heures après le repas, tous les animaux de la cohorte seront rassasiés.

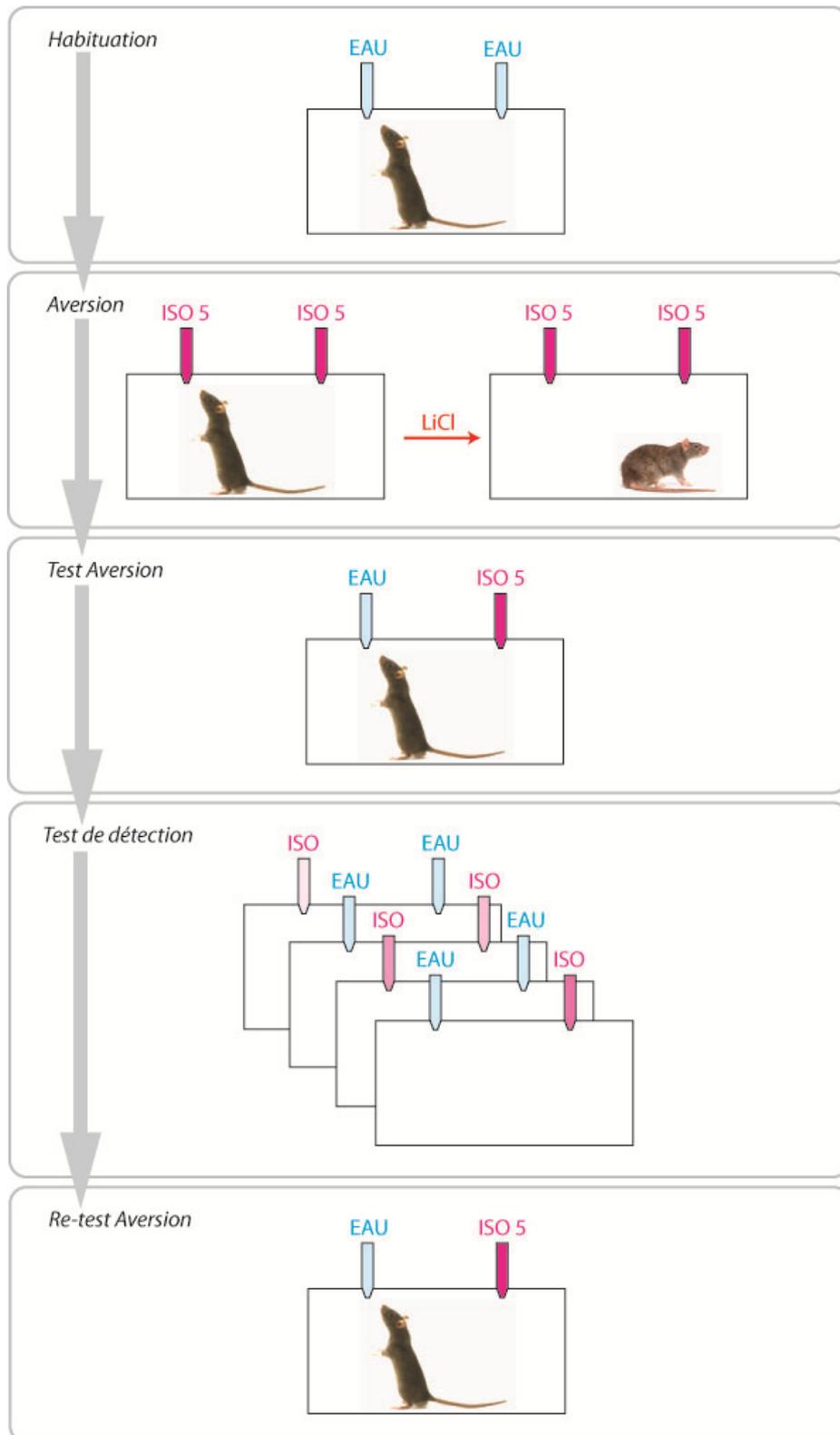


Figure 21 : Représentation schématique du test comportemental.

Chaque encadré représente une phase du test comportemental (habituation, aversion, test aversion, test de détection et re-test aversion). La cage expérimentale est équipée de deux biberons pouvant contenir soit de l'eau (en bleu) soit de l'acétate d'isoamyle à différentes concentrations (ISO, en rose). Pendant la phase d'aversion, une injection de chlorure de lithium (LiCl) permet d'établir une aversion olfactive conditionnée à l'acétate d'isoamyle à la dilution de 1×10^{-5} .

Les animaux sont également placés en restriction hydrique et n'ont accès qu'à une quantité limitée de boisson au cours de chaque repas, afin d'assurer une consommation de boisson suffisante dans le dispositif expérimental. Les animaux sont habitués à ce régime alimentaire et hydrique pendant une semaine avant le début du test comportemental.

Les animaux sont ensuite placés dans une cage expérimentale équipée de deux biberons remplis d'eau pure (Figure 21). Pendant cette période d'habitué, les animaux apprennent alors progressivement à échantillonner les deux tubes et profiter des sessions expérimentales pour consommer autant d'eau qu'ils le désirent. Après plusieurs jours d'habitué, l'eau pure des deux biberons est remplacée par une eau odorisée avec de l'acétate d'isoamyle à la dilution de 1×10^{-5} (ISO 10^{-5}). A cette concentration, l'acétate d'isoamyle ne confère pas de propriété gustative à la boisson odorisée (Slotnick et al., 1997). Lorsque les animaux consomment cette nouvelle boisson odorisée, ils reçoivent une injection intrapéritonéale de chlorure de lithium permettant ainsi d'induire une aversion olfactive conditionnée à l'ISO 10^{-5} . Après cette étape, l'aversion est testée dans le dispositif expérimental en offrant le choix à l'animal entre un tube d'eau pure et un tube d'eau odorisée à l'ISO 10^{-5} . L'aversion est effective lorsque les animaux consomment 0% d'ISO 10^{-5} et 100% d'eau pure. Dès lors, lorsque les animaux percevront l'ISO diluée dans l'eau de boisson, ils éviteront l'eau odorisée et préféreront consommer de l'eau pure. Commence ensuite la phase de test de la détection olfactive à proprement parler, au cours de laquelle les animaux ont le choix entre un tube d'eau pure et un tube d'eau odorisée à une concentration d'ISO beaucoup plus faible. Lorsque que les animaux boivent 50% d'eau et 50% d'ISO, cela indique qu'ils ne perçoivent pas la concentration d'ISO testée. Chaque concentration d'ISO est testée en état de faim, avant le repas quotidien, et en état de rassasiement, après le repas. Le jour suivant, une concentration plus forte d'ISO est testée, et ainsi de suite, jusqu'à ce que le seuil de détection olfactive des animaux soit atteint. A la fin du test comportemental, l'aversion est à nouveau testée avec de l'ISO 10^{-5} , pour juger d'une éventuelle atténuation de l'aversion.

Une première étude nous a permis de comparer les capacités de détection olfactive des rats en état de faim et en état de rassasiement. Ce travail de mise au point du protocole expérimental et de mise en évidence d'une modulation de la perception olfactive par les états alimentaires a fait l'objet d'une publication en 2007 dans la revue *Behavioural Brain Research*.

En complément de cette étude, nous avons validé l'utilisation de ce test comportemental pour tester la capacité de détection olfactive de plus petits rongeurs et nous avons confirmé la modulation de la perception olfactive par les états alimentaires chez la souris.

Une deuxième étude, présentée sous forme de résultats additionnels et préliminaires, a été conduite pour comparer la modulation de la perception olfactive par les états alimentaires de plusieurs modèles métaboliques de rats : les rats obèses Zucker fa/fa et les rats résistants à l'obésité LouC.

1) Première étude : Le jeûne augmente et la satiété diminue la capacité de détection olfactive d'une odeur neutre chez le rat

Résumé : L'olfaction joue un rôle fondamental dans le comportement alimentaire, cependant, les changements d'acuité olfactive induit par les états alimentaires n'ont jamais été précisément démontrés chez l'animal. La présente étude a été réalisée afin d'analyser les performances de détection olfactive de rats affamés ou rassasiés placés en restriction alimentaire. Pour cela, nous nous sommes basés sur un protocole d'aversion olfactive conditionnée (AOC) dans le but d'induire chez le rat une aversion totale à une boisson odorisée d'acetate d'isoamyle (ISO) à la dilution de 10^{-5} (1 μ l dans 100ml d'eau). Les rats, affamés ou rassasiés, ont ensuite été confrontés à différentes concentration de boisson odorisée à l'ISO pour comparer leur capacité de détection olfactive, traduite par leur comportement d'évitement de la boisson odorisée. Quelque soit l'état alimentaire, les rats consomment significativement de plus grands volumes d'ISO 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} que d'ISO 10^{-5} , suggérant une moins bonne détection de l'ISO aux faibles concentrations. Les rats affamés consomment significativement moins de boisson odorisée que les rats rassasiés, démontrant ainsi une meilleure détection olfactive à ces concentrations.

Ces expériences apportent de nouvelles données en démontrant expérimentalement que la sensibilité olfactive est accrue chez les animaux affamés. Etant donné que ces résultats ont été obtenus pour une odeur neutre, nous suggérons que l'acuité olfactive augmente d'une manière générale en période de jeûne, permettant ainsi aux animaux de détecter plus facilement les odeurs de nourriture ainsi que les odeurs environnementales, telles que les odeurs de prédateurs. Ce phénomène jouerait un rôle éco-éthologique évident, en augmentant la pertinence des informations olfactives lors de la recherche de nourriture.

Research report

Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats

P. Aimé^a, P. Duchamp-Viret^{a,*}, M.A. Chaput^a,
A. Savigner^a, M. Mahfouz^b, A.K. Julliard^a

^a *Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition, CNRS, UMR 5020, Université Claude Bernard Lyon 1, 50 Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France*

^b *Institut Camille Jordan, Equipe Probabilités et Statistiques, UMR 5208, Université Claude Bernard Lyon 1, 50 Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France*

Received 20 December 2006; received in revised form 8 February 2007; accepted 13 February 2007
Available online 17 February 2007

Abstract

Olfaction plays a fundamental role in feeding behavior, but changes in olfactory acuity according to feeding states have never been precisely demonstrated in animals. The present study assesses the olfactory detection performance of fasted or satiated rats placed under a strictly controlled food-intake regimen. We did this using a conditioned odor aversion (COA) protocol which induced in rats an almost total aversion to an ISO-odorized drink at 10^{-5} (1 μ l in 100 ml of water). The rats (either fasted or satiated) were then presented with different concentrations of ISO-odorized water to compare their ability to detect and so avoid the ISO drink. In both states, the rats consumed significantly larger volumes of ISO at 10^{-10} , 10^{-9} and 10^{-8} than at 10^{-5} , suggesting lower detection at these three concentrations, although the fasted rats consumed significantly less ISO drink than did the satiated ones, showing better ISO detection at these concentrations.

These experiments provide original data demonstrating the expected fact that olfactory sensitivity increases in fasted animals. Since these results were obtained using a neutral odor, we suggest that olfactory acuity increases during fasting, enabling animals to more easily detect both food and environmental odors such as those of predators. This would have an obvious eco-ethological role by increasing the relevance of olfactory inputs when seeking food.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Olfaction; Odor; Feeding; Behavior; Rat; Olfactory aversion

1. Introduction

Olfaction is a sensory dimension that is an integral part of food intake. Many animals rely on odor to determine the location of their food sources and to discriminate and identify them. Although odors are not contingent on the nutritive properties of food, they are always associated with them, and are the major determinant of the palatability of food items [29,31] and essential to control of food intake [23,24,27,28,30,43a]. The question of the effect of the nutritional state of an organism on odor perception (olfactory sensitivity) gave rise to several studies on humans at the beginning of the 20th century. The question is once more of interest because of the increased public health con-

cerns regarding obesity. Since satiety towards a specific odor can be obtained only by smelling or chewing a food without swallowing it [40], it appears crucial to determine the implications of olfaction in the control of food intake. Some pathophysiological feeding behavior may be partly related to differences in the olfactory perception of foods, and thus in evaluating their palatability [34,46].

In humans, olfactory sensitivity has been shown to change extensively after lunch [15–18,23,26,50,52]. However, because these studies utilized experimental paradigms that focused on different parameters, their results are highly discrepant and do not allow definitive conclusions. For example, in the most recent of these studies, Koelega [26], studying the olfactory sensitivity of subjects to a neutral odor, concluded that there are no consistent changes in sensitivity related to food intake. He however chipped away at his conclusion by underlining that his experiments may have had some drawbacks attributable to a non strict

* Corresponding author. Tel.: +33 3728 7463; fax: +33 43728 7601.
E-mail address: pduchamp@olfac.univ-lyon1.fr (P. Duchamp-Viret).

control of the diet composition and size, to a lack of real knowledge of the internal nutritional status of his subjects, and to the fact that changes in olfactory sensitivity linked to feeding states could be very subtle.

In animals, the interactions between olfaction and food intake have been known for decades but the mechanisms underlying modifications of olfactory activity with the nutritional state remain unknown. The neural processing of olfactory information has been shown to be closely linked to the physiological and nutritional status of the organism. The olfactory system is more reactive to odors under starvation conditions, and its activity is reduced after satiation [1,37]. Moreover, olfactory bulb reactivity is selectively increased by an odor known to be palatable [36]. To our knowledge the changes in olfactory detection ability caused by the food status have never been precisely studied in animals using a specific paradigm focusing on olfactory performance dissociated from food intake. Obtaining such information in strict experimental conditions is an essential prerequisite for initiating further research dealing with the neural communication processes occurring between the hypothalamic feeding centers and the olfactory system. Knowledge of the natural modulation of the olfactory function by nutritional states will be especially useful for assessing the respective roles in odor processing of neuropeptides like orexin, leptin, or insulin (for a review see Ref. [32]), which are described as neurochemical signatures of the fasted and satiated states. This is why the question of whether odor sensitivity changes with the nutritional state was studied using a conditioned odor aversion (COA) protocol. This behavioral paradigm was devoted to comparing the olfactory detection abilities of fasted and satiated rats made aversive to a neutral odor.

2. Methods

2.1. Animals

Experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals. Experimental protocols were approved by the Comité d'Expérimentation Animale de l'Université Claude Bernard-Lyon I.

Ten male Wistar rats were used in each COA based experiment and eight as controls of fluid intake during the COA protocol. They were purchased from Charles River. They were 2-months old and weighed 250–260 g at the beginning of the experiments. On arrival, they were housed individually in Plexiglas chambers at constant temperature and relative humidity (22 ± 0.5 °C and 50 ± 5%). All rats were kept under a 12-h light:12-h dark cycle and were weighed daily at 09:00 a.m.

2.2. Experimental procedures

This study comprised two experiments. The first was designed to test that the olfactory detection ability of ad libitum fed rats for an odorant diluted in their usual drinking water did not change when the same concentration was presented on 2 successive days. This is the "baseline experiment". The second was designed to analyze how the feeding state influenced the olfactory detection ability when the same odor concentration was presented to the same fasted or satiated rats. This is the "detection experiment".

Isoamyl acetate (ISO) was utilized in both experiments as a neutral odor with no food significance for the rats. The possible involvement of taste was ruled out by using ISO dilutions at concentrations for which ISO has been shown to be detectable only by smell and not by taste [44]. A concentration of 10⁻⁵

(corresponding to 1 µl in 100 ml of water) was used for establishing COA and stabilization (aversion retest) and at concentrations ranging from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁷ for testing.

2.3. Common features of the experiments

The behavioral tests were conducted in parallel in groups of four rats in individual Plexiglas operant chambers (330 mm × 210 mm × 180 mm) in the laboratory. The chambers were set side by side so that the experimenter could observe the animals but the animals could not see one another. Two plastic tubes were mounted on opposite sides of the flat ceiling of each chamber. These tubes (made from 15 ml conical centrifuge tubes, CellStar) were cut and fire polished to give them a 0.5 mm spout which protruded about 5 mm into the chamber, allowing the rats to drink easily by raising themselves up on their hind limbs. Each tube was connected to a custom-made capacitance circuit which allowed the experimenter to measure the amount of liquid consumed by the rat and to record its licks using a CED 1401 interface (CED, Cambridge) connected to a computer.

The two experiments were based on a COA protocol, and the schedules are illustrated in Fig. 1. For the first 3 days the rats in the operant chambers were given tap water to drink (not shown). During the following days, corresponding to COA establishment, the rats only had access to water odorized with ISO at 10⁻⁵, and were then given an intraperitoneal injection of LiCl (10 ml/kg at 0.15 M) 15 min later to make the animals sick. Then only those which drank more than 0.5 ml of ISO during any of the subsequent three sessions were injected with LiCl. Once COA was established, the aversion was tested by giving the animals the choice between tap water and water odorized with ISO 10⁻⁵, on day 0 (D0) of each experiment. The test period then began by offering the rats the choice between tap water and water odorized with ISO at different concentrations. Lastly, to confirm the aversion, the choice between ISO 10⁻⁵ water and tap water was repeated (aversion retest) at the end of the two experiments. When the tubes contained two different drinks, their right-left position was systematically interchanged across sessions. At the beginning of each session, the rats were intentionally placed under the tube containing the ISO-odorized water.

Rat olfactory sensitivity for ISO was thus assessed using a forced-choice task, and not by using a simple choice task, since the thirsty rats were forced to smell the odorized tube first. This procedure was chosen to avoid the possibility that the rats, highly motivated by thirst, would go by chance to the pure water tube first, drink only water, and not sample the ISO tube.

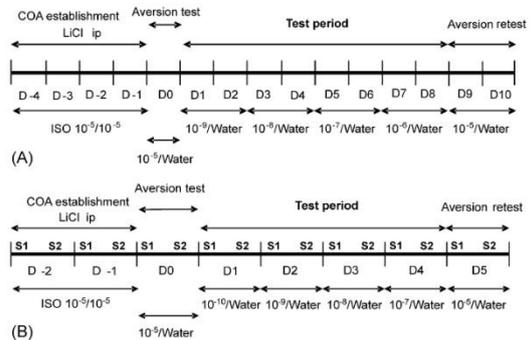


Fig. 1. Schematic representation of the overall course of the baseline (A) and detection (B) experiments. The two experiments are divided in four steps: COA establishment (Days before D0) during which ISO 10⁻⁵ presentation was paired with intraperitoneal (i.p.) injection of LiCl, the aversion test (D0) where the choice between ISO 10⁻⁵ and water was proposed, test period and aversion retest. One and two-daily sessions were performed in the baseline and detection experiment. In the baseline experiment (A), the test period ran from D1 to D8 and the same ISO concentration was presented on 2 consecutive days. In the detection experiment (B), the test period ran from D1 to D4 and the same ISO concentration was presented twice daily.

2.4. Specificities of the baseline experiment paradigm

One week prior to testing, the rats were placed on a 23 h water deprivation schedule that was maintained throughout the experiment. They were fed ad libitum in their home cage and had access to water from 11:00 to 12:00 a.m. (Fig. 2A). The lighting was regulated according to a normal 12-h light:12-h dark cycle with the lights turned on at 09:00 a.m. All experimental sessions took place during the light portion of the cycle and each rat was tested at the same time each day. The paradigm comprised one 5-min daily experimental session (S) beginning at 09:00 a.m. for the first group tested. As shown in Fig. 1A, COA establishment lasted 4 days (D4–D1), and aversion was then tested by giving the animals the choice between ISO 10^{-5} water and tap water (D0). The test period for the baseline experiment was developed over the 8 next days (D1–D8) by offering the rats the choice between tap water and water odorized with ISO (ISO water) at 10^{-9} to 10^{-6} with each ISO concentration presented on 2 consecutive days. Aversion retest was also performed on 2 consecutive days (D9–D10).

The control rats were maintained in the conditions and tested according to the daily paradigm of rats used in the baseline experiment. They were submitted to a pseudo-COA establishment on 4 days. They were offered exclusively water odorized with ISO at 10^{-5} , as done in the other two experiments, but received an intraperitoneal injection of saline (10 ml/kg at 9%) instead of LiCl.

2.5. Specificities of the detection experiment paradigm

One week prior to testing, the rats were placed on a 23 h water and 20 h food deprivation schedule that was maintained throughout the experiment. The animals had access to food from 01:00 to 05:00 p.m. and to water from 01:00 to 02:00 p.m. (Fig. 2B). Their lighting was regulated according to an inverted 12-h light:12-h dark cycle with light being turned off at 09:00 a.m. Experimental sessions consisted of two 5-min daily sessions occurring at 10 h intervals. The first session (S1) started at the end of the light phase: at 09:00 a.m. (after 16 h of fasting) and the second (S2) started during the dark phase: 07:00 p.m. (during the postprandial phase, 2 h after the meal). This paradigm allowed each animal to be successively tested in the two physiological states, fasted (S1) and satiated (S2). As illustrated in Fig. 1B, COA establishment lasted 2 days (D-2 and D-1) and comprised 4 experimental sessions. Aversion was then tested by giving the

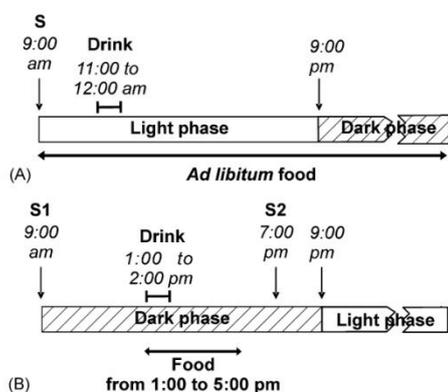


Fig. 2. Schematic representation of the daily schedule of the baseline (A) and detection (B) experiments. In the first experiment, the rats were fed ad libitum and placed under a 23 h-water deprivation schedule (A). The daily experimental session (S) was performed at 9:00 a.m. In the second experiment, the rats were under a 23 h-water and a 20 h food deprivation schedule (B). Food was available 4 h per day from 1:00 to 5:00 p.m. Two daily experimental sessions S1 and S2 were performed at 9:00 a.m. and 7:00 p.m. during which the same ISO concentration was presented.

animals the choice between ISO 10^{-5} water and tap water (D0). The test period for the detection experiments ran over the next 5 days (D1–D5) by offering the rats the choice between tap water and water odorized at different concentrations: from 10^{-10} (D1) to 10^{-7} (D4). Aversion retest was performed on the last day (D5). For each experimental day, the same concentrations were used for the two daily sessions (S1 and S2).

2.6. Data processing and statistics

The raw data collected during each test session were the volumes of tap and odorized water consumed by the rats and the sequences of licks recorded at each tube by the detectors connected to the CED 1401 apparatus. The volumes were used to calculate the proportion of odorized water consumed with respect to the total beverage intake. The licking recording sequences were processed to determine the number of side (tube) changes during each session.

Statistical comparisons were performed using variance analysis (ANOVA), or the non-parametric Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks test, depending on whether normality assumptions were met or not, as determined using the Kolmogorov–Smirnov test. *p*-Values <0.05 and <0.001 were considered as statistically significant and highly significant.

3. Results

3.1. COA: establishment and stability

In both experiments as in control, the rats readily accepted to drink ISO 10^{-5} -odorized water from its first presentation. Because they were satiated in the baseline experiment and fasted in the detection experiment, this acceptance suggests that the feeding state did not change the rat's drinking behavior regarding an eventual repulsion or preference for ISO.

Fig. 3 shows the mean volume of odorized water drunk by the rats as a function of the training progress. By contrast to control rats the LiCl-injected rats reduced their ISO consumption during the 4 days (baseline experiment) or the four experimental sessions (detection experiment) of COA establishment. The ad libitum fed rats significantly reduced their ISO intake by ~50% ($p < 0.01$) at the second experimental session (D-3) and by an additional ~30% ($p < 0.005$) at the third session (D-2), to reach a stable conditioned aversion to ISO at the fourth session (D-1). In the detection experiment, the rats were in the fasted condition at the first ISO presentation (D-2; S1), when they received the first LiCl injection paired with ISO 10^{-5} , and satiated at the second one (D-2; S2). During the second experimental session, these rats reduced their odorized water consumption by ~85% ($p < 0.005$), i.e. much more dramatically than did the ad libitum fed rats.

On D0 (corresponding to the aversion test), COA was perfectly established for both experiments since the rats consumed less than 0.5 ml of ISO 10^{-5} odorized water versus 4.2 ml of tap water (data not shown). At the end of both experiments (aversion retest), COA was tested again (D9 and D10 for baseline experiment and D5 for the detection test). In both cases, there was no attenuation of COA (no significant difference from D0 $p > 0.5\%$). Mean ISO 10^{-5} consumptions were 0.1–1.5 ml for the baseline (D9–D10) and the detection (D5; S1–D5, S2) experiments.

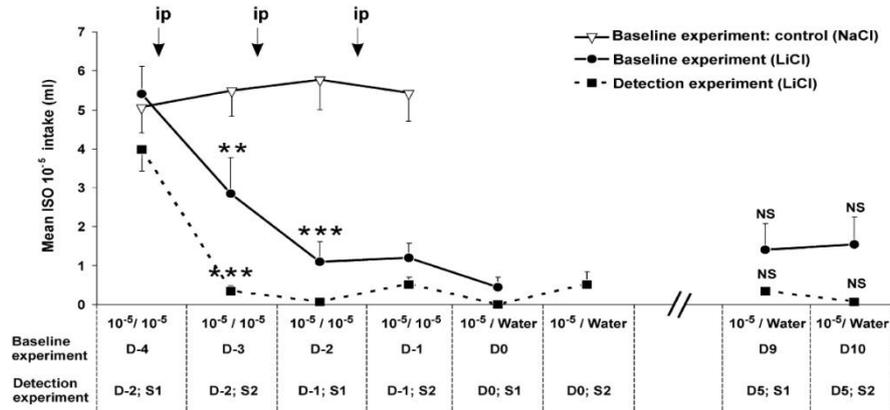


Fig. 3. Mean (\pm S.E.M.) intake of ISO 10^{-5} during 5-min experimental sessions and total fluid intake during pseudo-COA establishment in the control rats (open triangles), or during COA establishment and maintenance (aversion retest) in the baseline (filled circles) and detection (filled squares) experiments. The control rats received a NaCl intraperitoneal (i.p.) injection after each session. The others received a LiCl i.p. injection after the first session and then, only those which drank more than 0.5 ml of ISO during any of the subsequent three sessions were injected with LiCl. Data of the test (D0) and retest aversion sessions are not significantly different. NS: not significant as compared to D0. $*p < 0.01$; $***p < 0.005$ as compared to D-4 (baseline experiment) or D-2; S1 (detection experiment).

Table 1

Ratio of ISO intake/total fluid intake (mean in % \pm S.E.M.) for each of the five different ISO concentrations offered 2 consecutive days (D and D+1) in the baseline experiment

	D	D+1
ISO 10^{-9}	84.37 \pm 4.95	76.73 \pm 7.88
ISO 10^{-8}	65.94 \pm 5.61	73.68 \pm 6.32
ISO 10^{-7}	65.92 \pm 7.28	59.14 \pm 8.79
ISO 10^{-6}	39.9 \pm 8.14	45.14 \pm 10.5
ISO 10^{-5}	16.73 \pm 8.16	16.04 \pm 7.37

The proportion of ISO consumed during two consecutive sessions with the same ISO concentration did not differ significantly.

3.2. Baseline experiment: ISO-odorized water consumption on 2 successive days in ad libitum fed rats

Table 1 gives the mean proportion of ISO-odorized water intake versus total fluid intake (in %) for the same ISO concentration presented on 2 consecutive days. Despite clear aversion to ISO 10^{-5} , the rats consumed odorized water at ISO dilutions ranging from 10^{-9} to 10^{-6} . At lower concentrations of ISO, more odorized water was consumed. Because COA was maintained (see ISO drink consumption of ad libitum fed rats on D0, D9, D10 in Fig. 3), this indicates that ISO detection became worse and worse as the concentration was decreased. Notably, consumption did not differ significantly for subsequent presentations of the same concentration. Thus, there was neither habituation nor lateralization to the conditioning stimulus.

3.3. Detection experiment and nutritional status: influence of fasting and satiation on the detection of ISO in drinking water

The test period for the detection experiments ran between D1 and D4. Fig. 4 presents the mean proportion of ISO-odorized

water intake with respect to total fluid intake (in %) for ISO concentrations increasing from 10^{-10} to 10^{-7} . The two curves correspond to the two experimental sessions, S1 and S2, i.e. to the two feeding states, fasting and satiation. The ability of the rats to demonstrate COA by avoiding odorized water was assumed to be an appropriate index of their olfactory detection; the curves allow us to compare the olfaction detection ability for each concentration and each nutritional status.

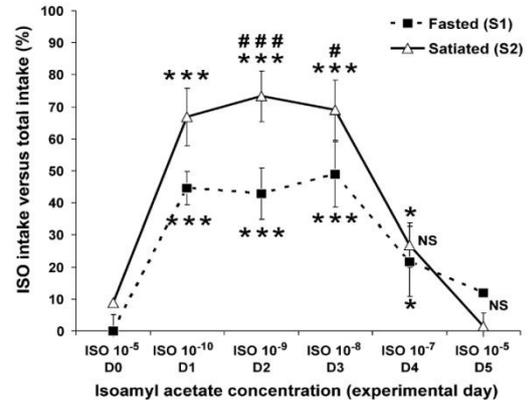


Fig. 4. Mean ratio (\pm S.E.M.) between ISO and total fluid intakes during aversion test (D0), test period (D1–D4), and aversion retest (D5) in the detection experiment. ISO concentrations were tested twice daily on the same rats in the two nutritional states. The filled squares and open triangles correspond to the same rats tested once fasted in the morning (S1) and once satiated in the evening (S2). $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.005$ as compared to ISO intake at D0 in the same feeding state. NS: not significant; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.005$ as compared to satiated state at the same ISO concentration.

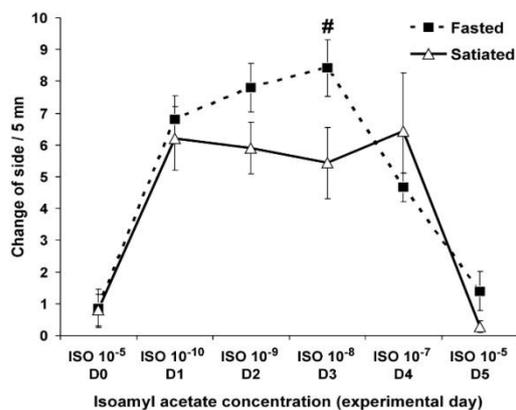


Fig. 5. Mean (\pm S.E.M.) side changes in fasted (filled squares) and satiated (open triangles) rats. Motility increased significantly in fasted rats for ISO 10^{-8} . # $p < 0.05$: as compared to the same rats in the satiated state and at the same ISO concentration.

For both fasted and satiated rats, odorized water consumption was significantly higher at concentrations of 10^{-10} , 10^{-9} and 10^{-8} than that observed for 10^{-5} ($p < 0.005$). Rats were thus less sensitive to these concentrations, as already shown above for ad libitum fed rats. There was a clear difference between the two feeding states: the fasted rats consumed far less odorized water (about 40% of the total beverage consumption) than the satiated ones (about 70% of the total beverage consumption) at low concentrations, which indicates better detection of ISO. The most salient differences between fasted and satiated rats were observed for 10^{-9} and 10^{-8} and these were statistically significant ($p < 0.005$ and 0.05). Since there was no habituation or lateralization, as shown in the baseline experiment (Table 1), these differences in consumption directly reflect a difference in olfactory sensitivity between fasted and satiated rats.

For ISO at 10^{-7} , the consumption remained significantly higher than that at 10^{-5} ($p < 0.05$), showing that the rats displayed a similar ability to perceive this concentration whether they were fasted or satiated.

The numbers of side changes during the detection test is shown in Fig. 5. These data reflect the level of locomotor activity of the animals. In the two feeding states, the rats changed side more often for the low concentrations (10^{-10} to 10^{-7}) than for 10^{-5} for which they practically did not change sides, probably because they immediately detected the aversive stimulus. However, the fasted rats were more active than the satiated ones, the difference being statistically different for 10^{-8} ($p < 0.05$).

4. Discussion

The two behavioral experiments are based on COA. The baseline experiment tested the assumption that the ability of rats to avoid the odorized water as a function of ISO concentrations would not change when the same concentrations were presented twice. Because the rats did not show habituation,

a second experiment where the rats were presented with the same concentrations during two daily sessions was performed to determine the influence of fasting and satiation on avoidance of the odorized drink. The behavioral aversion to this drink was assumed to mirror the ability of the rats to detect ISO.

4.1. Pertinence of COA paradigm

COA is the avoidance of an odorized solution, the ingestion of which precedes a LiCl induced-toxicosis [19,49]. COA is very close to “conditioned taste aversion” [30,33] already described in detail [30,31], which used successive injections of LiCl, as in the present study, to reinforce a strong and persistent flavor aversion [41]. In our experiments, the clear choice of tap over ISO water for rats that had received LiCl injections results from the association between ISO odor and LiCl, and not from a spontaneous avoidance of ISO since control rats injected with NaCl instead of LiCl after drinking ISO 10^{-5} showed similar water and ISO intakes and therefore no COA during further tests with this concentration. The crucial difference between COA and “conditioned taste aversion” is that the ISO solution does not present any gustatory properties at the concentrations used in our study [44]. However, it must be noted that in the experiment done by Slotnick et al. [44], the ISO thresholds for taste were established only from satiated rats. Since we expected that in fasted rats both their olfactory and gustatory sensitivities [47,53] would increase, we cannot rule out that taste came into play, at least at the highest ISO concentrations (10^{-6} ; 10^{-5}). Accordingly, we cannot exclude that the COA displayed by our fasted animals may have resulted from a potentiation of ISO aversion by an element of taste perceivable by these animals [12,42].

Furthermore, the rats drank the odorized water. Thus, once in the mouth, the ISO could have stimulated the olfactory mucosa throughout the retronasal pathway [21,48]. Recent work [22] has suggested that swallowing odorized fluids enhances olfactory intensity because the rats receive both orthonasal and retronasal stimuli. The authors proposed that an odorized drink is a more effective olfactory stimulus for testing sensitivity than a simple orthonasal airborne stimulation. Because our test used several concentrations of ISO, it shows that once aversive to a target concentration, the animals were able to transfer this aversion to lower concentrations. ISO is thus perceived as having the same odor quality from 10^{-10} to 10^{-5} as has already been suggested by previously published behavioral [39] and electrophysiological [10] data.

The present study demonstrates that COA is stable over time and that there is neither habituation nor lateralization. In the choice paradigm each rat was placed below the odorized tube first. The starting point of the test was thus standardized so that the slightest difference in water consumption would be detected as pertinent. This corresponded to an “orientated sampling situation” aimed at decreasing the influence of an over-strong motivation to drink which could have resulted in a non-stop drink of pure water if chance had led the rat to drink from the tap water tube first. The “orientated sampling situation” also contributed to minimize the side effects described in fasted ani-

mals where the mechanisms involved in priming food-seeking and uptake behavior are known to increase both the arousal and the intensity of motor activity [13,14]. However, despite this precaution, the improved olfactory sensitivity found in fasted rats in the present study remained paired with an increase in motor activity (Fig. 5).

4.2. Fasted rats can smell better

In the detection experiment, rats were tested in the two feeding states on the same day. They had limited access to food, ate less, and thus drank less [51] so that their total consumption of water cannot be compared to that of the ad libitum fed rats of the baseline experiments. However, these fasted or satiated rats showed clear differences in their consumption of odorized-water at concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-10} . When fasted, the rats clearly avoided odorized water at these low concentrations, displaying better olfactory sensitivity than when they were satiated.

To our knowledge, this study provides the first experimental demonstration of the empirical belief that olfactory sensitivity increases with fasting. Such an increase in sensitivity could explain why the rats demonstrated COA more rapidly when they were in the fasting condition on first presentation of the aversive stimulus. The modulation in olfactory performance due to the feeding status observed in our experiments fully agrees with a recent electrophysiological study which reported that the reactivity of mitral cells in the olfactory bulb to odors is increased in fasted rats [2]. One can make the assumption that the obvious eco-ethological role of such a modulation could be to allow the animals to perform better in odor detection tasks during the food seeking than in the postingestive phase.

In humans, increased preprandial sensitivities have only been described for food-related odors but not for neutral odors [7]. Our results were obtained with ISO, a theoretically non food-related odor, which acquired an aversive significance through COA. Consequently, we suggest that the changes in olfactory performance related to feeding status are a general feature and not restricted only to food-related odors. From an ecological point of view, this more generalized modulation could be expected to occur during food-seeking since wild animals are exposed to predators and a sharp olfactory acuity would be especially useful. This modulation in olfactory acuity agrees with the work of Duclaux et al. [11] on satiated subjects in which a drop in the pleasantness was observed specifically for food-related odors but not for non food-related ones. Indeed, the notion of pleasantness must be dissociated from the notion of detection performance, since the former involves more cognitive processing [25,35,40,45].

5. Conclusion

The interaction between the olfactory system and the hypothalamic feeding centers involves neurochemical and neuroanatomical substrates. A direct centrifugal pathway has been described between the feeding centers and the olfactory bulb [6,8,9,38]. This centrifugal pathway allows orexin, an orexy-

genic peptide, to modulate the activity of neurons in the olfactory bulb [5,20]. Furthermore, the olfactory structures, from the periphery to the center, are rich in food-intake control chemicals (like insulin and leptin) and in receptors for these molecules [3,4,43b].

As a conclusion, the present study validates the COA based detection test paradigm and provides the first experimental demonstration of the increase in olfactory sensitivity in the fasting condition. Further studies focusing on olfactory detection are in progress, in which the ability of some of the molecules involved in the fasting/satiation signal to mimic the physiological fasted and satiated states will be tested. The role of orexin, leptin and insulin in the olfaction/feeding regulation will be evaluated.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Barbara Ferry (CNRS, UMR7521, Laboratoire de neurosciences comportementales et cognitives, Strasbourg, France) Pr. Edwin Griff (University of Cincinnati) for their critical reading and to Wanda Lipski (English training service) for English language correction of this paper. The authors would like to thank Bernard Bertrand and Samuel Garcia for their technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche (CNRS) and the Claude Bernard University of Lyon and received a grant from the Agence National de la Recherche (contract number ANR-05-PNRA-002-02, directed by Pr. Rémi Gervais, Institut des Sciences Cognitives, CNRS, UMR 5015, Lyon, France).

References

- [1] Apfelbaum A, Perrut A, Chaput M. Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul Pept* 2005;129:49–61.
- [2] Apfelbaum AF, Chaput MA. Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 2003;28:389–95.
- [3] Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 2004;490:5–12.
- [4] Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 1988;11:107–11.
- [5] Caillol M, Aioun J, Baly C, Persuy MA, Salesse R. Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 2003;960:48–61.
- [6] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437–51.
- [7] Crumpton E, Wine DB, Drenick EJ. Effect of prolonged fasting on olfactory threshold. *Psychol Rep* 1967;21:692.
- [8] Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukara S, Kangawa K, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *PNAS* 1999;96:748–53.
- [9] De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:322–7.
- [10] Duchamp-Viret P, Duchamp A, Sicard G. Olfactory discrimination over a wide concentration range. Comparison of receptor cell and bulb neuron abilities. *Brain Res* 1990;517:256–62.
- [11] Duclaux R, Feisthauer J, Cabanac M. Effects of a meal on the pleasantness of food and nonfood odors in man. *Physiol Behav* 1973;10:1029–33.

- [12] Durlach PJ, Rescorla RA. Potentiation rather than overshadowing in flavor-aversion learning: an analysis in terms of within-compound associations. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1980;6:175–87.
- [13] Espana RA, Plahn S, Berridge CW. Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Res* 2002;943:224–36.
- [14] Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 2001;21:1656–62.
- [15] Goetzl FR, Stone F. Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology* 1947;9:444–53.
- [16] Goetzl FR, Stone F. The influence of amphetamine sulfate upon olfactory acuity and appetite. *Gastroenterology* 1948;10:708–13.
- [17] Goetzl FR, Abel MS, Ahokas AJ. Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *J Appl Physiol* 1950;2:553–62.
- [18] Hammer FJ. The relation of odor, taste, and flicker-fusion thresholds to food intake. *J Comp Physiol Psychol* 1951;44:03–11.
- [19] Hankins WG, Garcia J, Rusiniak KW. Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behav Biol* 1973;8:407–19.
- [20] Hardy AB, Aioun J, Baly C, Julliard KA, Caillol M, Salesse R, et al. Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: patch-clamp study on slices and immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology* 2005;146:4042–53.
- [21] Heilmann S, Hummel T. A new method for comparing orthonasal and retronasal olfaction. *Behav Neurosci* 2004;118:412–9.
- [22] Inui T, Shimura T, Yamamoto T. Effects of brain lesions on taste-potentiated odor aversion in rats. *Behav Neurosci* 2006;120:590–9.
- [23] Janowitz HD, Grossman MI. Gusto-olfacto thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *J Appl Physiol* 1949;2:217–22.
- [24] Janowitz HD, Hollander F, Marshar RH. The effect of tween-65 and tween-80 on gastrointestinal motility in man. *Gastroenterology* 1953;24:510–6.
- [25] Kadohisa M, Rolls ET, Verhagen JV. Neuronal representations of stimuli in the mouth: the primate insular taste cortex, orbitofrontal cortex and amygdala. *Chem Senses* 2005;30:401–19.
- [26] Koelega HS. Diurnal variations in olfactory sensitivity and the relationship to food intake. *Percept Mot Skills* 1994;78:215–26.
- [27] Le Magnen J. The role of olfacto-gustatory stimuli in the regulation of the alimentary behavior of the mammal. *J Psychol Norm Pathol (Paris)* 1959;56:137–60.
- [28] Le Magnen J. Le contrôle sensoriel dans la régulation de l'apport alimentaire. *L'Obésité*, Expansion Scientifique, ed Paris, 1963; p. 147–71.
- [29] Le Magnen J. Advances in studies on the physiological control and regulation of food intake. In: Stellar E, Sprague JM, editors. *Progress in Physiology and Psychology*, vol. 4. 1971. p. 204–61.
- [30] Le Magnen J. Neurophysiological basis for sensory mediated food selection. In: Solms J, Hall RL, editors. *Criteria of Food Acceptance*. Zurich: Forster Verlag; 1981. p. 268–80.
- [31] Le Magnen J. My scientific life: 40 years at the College de France. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:375–94.
- [32] Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004;25:473–504.
- [33] Nachman M. Learned aversion to the taste of lithium chloride and generalization to other salts. *J Comp Physiol Psychol* 1963;56:343–9.
- [34] Obrebowski A, Obrebowska-Karsznia Z, Gawlinski M. Smell and taste in children with simple obesity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000;55:191–6.
- [35] O'Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F, Kobal G, et al. Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport* 2000;11:399–403.
- [36] Páger J. A selective modulation of the olfactory bulb electrical activity in relation to the learning of palatability in hungry and satiated rats. *Physiol Behav* 1974;12:189–95.
- [37] Páger J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 1972;9:573–9.
- [38] Peyron C, Tighe D, Vanden Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe J, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996–10015.
- [39] Pho V, Butman ML, Cherry JA. Type 4 phosphodiesterase inhibition impairs detection of low odor concentrations in mice. *Behav Brain Res* 2005;161:245–53.
- [40] Rolls ET, Rolls JH. Olfactory sensory-specific satiety in humans. *Physiol Behav* 1997;61:461–73.
- [41] Rowland NE, Nasrallah NA, Robertson KL. LiCl-induced flavor avoidance compared between rats and mice using a nondeprivation protocol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R260–8.
- [42] Rusiniak KW, Hankins WG, Garcia J, Brett LP. Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behav Neural Biol* 1979;25:1–17.
- [43] (a) Share L, Martyniuk E, Grossman MI. Effect of prolonged intragastric feeding on oral food intake in dogs. *Am J Physiol* 1952;169:229–35; (b) Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 1998;243:41–4.
- [44] Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC. What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Anim Learn Behav* 1997;25:357–69.
- [45] Small DM, Zatorre RJ, Dagher A, Evans AC, Jones-Gotman M. Changes in brain activity related to eating chocolate: from pleasure to aversion. *Brain* 2001;124:1720–33.
- [46] Sorensen LB, Moller P, Flint A, Martens M, Raben A. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:1152–66.
- [47] Stinebaugh BJ, Vasquez MI, Schloeder FX. Taste thresholds for salt in fasting patients. *Am J Clin Nutr* 1975;28:814–7.
- [48] Sun BC, Halpern BP. Identification of air phase retronasal and orthonasal odorant pairs. *Chem Senses* 2005;30:693–706.
- [49] Taukulis HK. Odor aversions produced over long CS-US delays. *Behav Biol* 1974;10:505–10.
- [50] Turner P, Patterson DS. Smell threshold as a test of central nervous function. *Acta Otolaryngol* 1967;62:149–56.
- [51] Watts AG. Neuropeptides and the integration of motor responses to dehydration. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:357–84.
- [52] Zilstorff-Pedersen K. Olfactory threshold determinations in relation to food intake. *Acta Otolaryngol* 1955;45:86–90.
- [53] Zverev YP. Effects of caloric deprivation and satiety on sensitivity of the gustatory system. *BMC Neurosci* 2004;5:5.

2) Résultat complémentaire : Le jeûne augmente et la satiété diminue la capacité de détection olfactive d'une odeur neutre chez la souris

Etant donné la diversité des modèles transgéniques disponibles à l'heure actuelle, la souris représente un modèle expérimental de choix. Ainsi, la validation de notre protocole d'étude de la capacité de détection olfactive pour une souris communément utilisée comme fond génétique pour les manipulations de transgénèse, la souris C57Bl6J, s'avérait particulièrement prometteur pour les études futures de l'équipe dans la thématique de recherche des interactions entre la perception olfactive et les états alimentaires et métaboliques.

Les souris sont capables d'apprendre une aversion conditionnée puissante et durable de la même manière que les rats (Rowland et al., 2004). Ainsi, nous avons choisis d'utiliser un protocole expérimental globalement identique, en apportant toutefois quelques nuances. Premièrement, en utilisant le protocole de restriction alimentaire avec un unique repas quotidien et en testant les souris (affamées) une première fois avant le repas, puis une seconde fois après le repas (rassasiées) au cours de la même journée, nous nous sommes aperçus que les souris présentaient des consommations de boisson très différentes lors des deux sessions, induisant un biais expérimental de motivation évident. Nous avons donc mené une première expérience en testant la moitié des souris une seule fois par jour avant le repas en l'état affamé, et l'autre moitié des souris après le repas en l'état rassasié ; et une deuxième expérience en reprenant la totalité du protocole et en inversant les groupes (Figure 22A). Deuxièmement, lors d'une expérience pilote, il est apparu que les souris présentaient de moins bonnes performances olfactives que les rats et nous avons donc choisis d'induire l'aversion pour une dilution d'ISO de 1×10^{-3} et de tester la détection olfactive des souris pour une gamme de dilutions allant de l'ISO 10^{-7} à l'ISO 10^{-5} . Etant donné que la dilution d'ISO 1×10^{-3} (0,1%) n'a pas de propriété gustative pour les rats (Slotnick et al., 1997), nous avons fait l'hypothèse qu'il en était de même chez la souris, bien que ce fait expérimental reste évidemment à être vérifié.

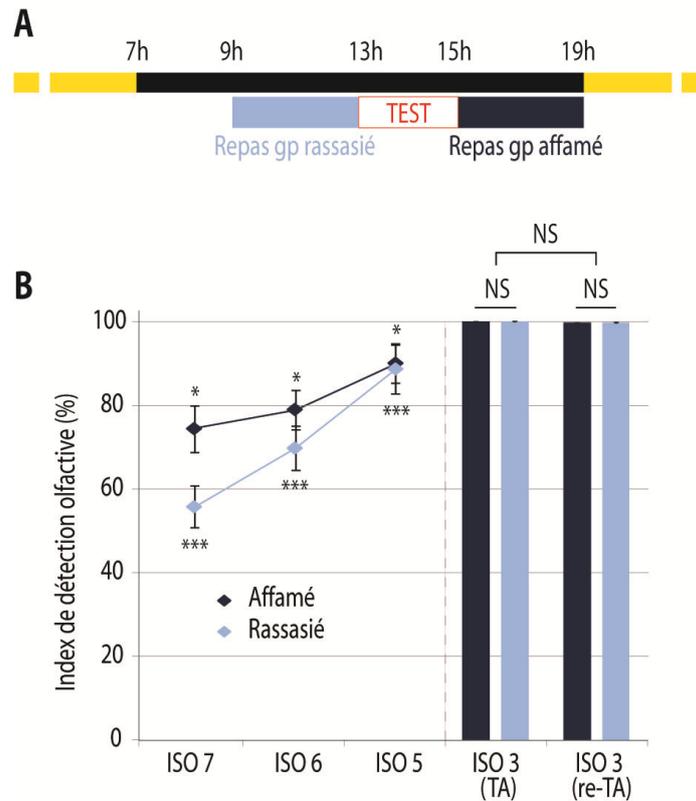


Figure 22 : Modulation de la détection olfactive pour une odeur neutre par l'état alimentaire chez la souris.

(A) Présentation du protocole de restriction alimentaire adapté pour la souris. Les souris ($n = 30$) sont placées en cycle inversé 12h/12h avec l'extinction des lumières à 7h. Les souris du groupe (gp) « rassasié » reçoivent un unique repas quotidien de 9h à 13h et les souris du groupe « affamé » reçoivent un unique repas quotidien de 15h à 19h. Toutes les souris sont testées en même temps de 13h à 15h (TEST). Lors de la première expérience, les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans l'un ou l'autre des deux groupes (affamé ou rassasié), et ont ensuite été testé dans l'autre état alimentaire lors d'une deuxième expérience, nous permettant ainsi d'acquérir les données de détection olfactive en l'état affamé et également en l'état rassasié pour les mêmes souris. **(B)** Résultats expérimentaux exprimés par un index de détection olfactive, correspondant au nombre de lapements d'eau pure divisé par le nombre de lapements total au cours de la session expérimentale de 5 minutes (moyenne +/- SEM). A gauche, les courbes représentent les résultats du test de détection olfactive pour les dilutions d'acétate d'isoamyle de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} (ISO7, ISO6, ISO5) pour les animaux affamés (bleu foncé) et rassasiés (bleu clair). A droite, les histogrammes représentent les résultats des tests de l'aversion pour la dilution d'acétate d'isoamyle de 10^{-3} (ISO3), au début du test comportemental (TA, pour « test aversion ») et à la fin du test comportemental (re-TA pour « re-test aversion »). Pour le test de détection, l'ANOVA à mesurées répétées indique un effet de l'état alimentaire $*p < 0,05$ et un effet de l'odeur $***p < 0,0001$. En revanche, pour le test de l'aversion, l'ANOVA à mesurées répétées ne révèle pas d'effet du test (TA ou re-TA) et pas d'effet de l'état alimentaire (NS).

Ainsi, les résultats de la figure 22 indiquent qu'il est possible de tester la capacité de détection olfactive des souris en utilisant sensiblement le même paradigme expérimental que pour les rats. La détection olfactive a été évaluée en mesurant un index de détection olfactive. Cet index correspond au nombre de lapements d'eau pure divisé par le nombre de lapements total effectué au cours des sessions expérimentales pour lesquelles les animaux avaient le choix entre de l'eau pure et de l'eau odorisée avec de l'acétate d'isoamyle pour des dilutions de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-3} . Les index de détection olfactive obtenus pour le test d'aversion au début du test comportemental sont proches de 100% (Test d'aversion (TA) : souris affamées, 100% ; souris rassasiées 99,93 +/- 0,07%) et ne sont pas significativement différents (ANOVA à mesure répétées $F_{(1,29)}=0,56$; $\alpha=0,05$ n.s.) des résultats obtenus à la fin du test comportemental (Re-test d'aversion (re-TA) : souris affamées, 99,82 +/- 0,08% ; souris rassasiées 99,93 +/- 0,07%). Ce résultat indique que l'aversion olfactive conditionnée est restée effective pendant toute la durée du test comportemental. De plus, les index de détection olfactive obtenus pour les tests d'aversion en l'état affamé ne sont pas significativement différents des index de détection olfactive obtenus pour les tests d'aversion en l'état rassasié (ANOVA à mesure répétées $F_{(1,29)}=0,21$; $\alpha=0,05$ n.s.), suggérant que la force de l'aversion reste la même quelque soit l'état alimentaire. A l'inverse, les index de détection olfactive obtenus lors du test de détection olfactive en l'état affamé (ISO7 74,76 +/- 4,66% ; ISO6 79,34 +/- 4,76% ; ISO5 90,44 +/- 3,54%) sont significativement plus élevés (ANOVA à mesure répétées $F_{(1,29)}=5,40$; * $p<0,05$) que les index de détection olfactive obtenus lors du test de détection olfactive en l'état rassasié (ISO7 56,13 +/- 5,30% ; ISO6 70,13 +/- 5,83% ; ISO5 89,04 +/- 3,78%), démontrant que les souris affamées présentent une meilleure capacité de détection olfactive d'une odeur neutre que les souris rassasiées.

Ainsi ces résultats valident notre protocole expérimental en démontrant que les souris sont capables d'apprendre une aversion puissante et durable dans le temps. Par ailleurs, ces résultats confirment et étendent les résultats obtenus chez le rat en démontrant que les souris présentent une modulation de la perception olfactive par les états alimentaires.

3) Deuxième étude : Etude de la capacité de détection olfactive d'une odeur neutre chez les rats Zucker fa/fa obèses et LouC résistants à l'obésité.

Après avoir démontré que la capacité de détection olfactive des rongeurs était augmentée en état de faim et diminuée en état de rassasiement dans des conditions physiologiques, nous nous sommes intéressés à l'influence d'états métaboliques extrêmes sur la modulation de la sensibilité olfactive par les états alimentaires. Pour cela, nous avons étudié deux modèles métaboliques : le rats Zucker fa/fa obèses et le rat LouC résistant à l'obésité, présentés dans les paragraphes 3.1 et 3.2 suivants.

3.1) Le rat Zucker fa / fa : un modèle d'obésité

Le rat Zucker 'fatty' a été décrit pour la première fois dans les années 60 par Lois et Théodore Zucker (Zucker and Zucker, 1961). L'obésité du rat Zucker fa/fa est due à l'apparition d'une mutation spontanée du gène codant pour le récepteur de la leptine, transmise de manière autosomale et récessive. Ainsi, seuls les rats homozygotes Zucker fa/fa sont hyperphagiques et obèses, alors que les rats hétérozygotes Zucker fa/+ sont phénotypiquement normaux. Chez les rats Zucker fa/fa, le gène codant pour le récepteur de la leptine possède une mutation faux-sens par conversion d'une glutamine en une proline au niveau du résidu 269 (Chua et al., 1996). En conséquence, la leptine se lie avec une faible affinité sur le récepteur muté et n'exerce plus son action anorexigène de manière optimale, conduisant ainsi à l'altération de nombreux paramètres métaboliques et comportementaux. La pathologie qu'ils développent présente des caractéristiques communes avec l'obésité humaine (Guerre-Millo, 1997; Beck, 2000). En effet, ces animaux sont hyperphagiques et présentent des taux anormalement élevés de tryglycérides, de cholestérol et d'acides gras (Zucker and Zucker, 1961; Barry and Bray, 1969). Les taux de leptine et d'insuline circulants sont corrélés à la quantité de masse adipeuse (Polonsky et al., 1988; Considine et al., 1996). Ainsi, les rats Zucker fa/fa développent rapidement une hyperleptinémie et une hyperinsulinémie (Guerre-Millo, 1997). L'établissement de l'hyperinsulinémie est concomitant à l'apparition d'une forte résistance à l'insuline (Zucker and Antoniadis, 1972; Zafra et al., 2006). Dans le système nerveux central, les neurones NPY/AgRP du noyau arqué

des rats Zucker fa/fa surexpriment largement le neuropeptide orexigène NPY (Sanacora et al., 1990). En conséquence, la concentration de ce neuropeptide est élevée dans le noyau arqué et dans le noyau paraventriculaire (Beck et al., 1990). Chez ces animaux, les taux d'orexine A dans plusieurs noyaux hypothalamiques sont particulièrement élevés (Mondal et al., 1999). De plus, les rats Zucker fa/fa présentent une diminution de l'expression de POMC, le précurseur du neuropeptide anorexigène α MSH, dans le noyau arqué (Yamamoto et al., 2002). Par ailleurs, les rats Zucker fa/fa sont insensibles aux effets satiétogènes de la cholecystokinine (McLaughlin and Baile, 1980). Ainsi, les rats Zucker fa/fa surexpriment le NPY qui stimule la prise alimentaire ; expriment moins de POMC et sont insensibles aux signaux de satiété et d'adiposité périphériques qui inhibent la prise alimentaire et régulent la masse corporelle : ils développent en conséquence un phénotype hyperphagique et obèse.

3.2) Le rat LouC : Un modèle de résistance à l'obésité.

La souche de rats LouC est issue de sélection successive à partir de la souche de rats Wistar. Contrairement aux rats Wistar, les rats LouC présentent la particularité de ne pas développer d'obésité au cours du vieillissement. Les rats LouC représentent donc un modèle de résistance à l'obésité et de vieillissement sain, caractérisé par une durée de vie plus longue (29 mois) que les rats Wistar (24 mois) (Alliot et al., 2002). Ces animaux détiennent à tout âge une masse corporelle et une masse adipeuse réduites par rapport à leurs témoins Wistar (Alliot et al., 2002; Couturier et al., 2002; Perrin et al., 2003; Soulage et al., 2008). Les rats LouC présentent quantitativement moins et de plus petits adipocytes que les rats Wistar (Soulage et al., 2008). Selon certains auteurs, les rats LouC nourris *ad libitum* ont une consommation spontanée de nourriture largement inférieure à la consommation de leurs témoins Wistar (Couturier et al., 2002; Kappeler et al., 2004b; Mitchell et al., 2006). Cependant, si la consommation de nourriture des rats LouC est normalisée à leur masse corporelle, il apparaît que ces animaux consomment la même quantité et, à certains âges, plus de nourriture que leurs témoins Wistar (Perrin et al., 2003; Soulage et al., 2008). Si les rats LouC restent minces alors qu'ils consomment en proportion au moins la même quantité de calories que leurs témoins, c'est qu'ils présentent une efficacité calorique réduite et des pôles de dépense énergétique plus importants que les rats Wistar (Perrin et al., 2003). En particulier, les rats LouC ont une activité locomotrice deux fois plus importante que les rats

Wistar (Soulage et al., 2008). Les rats LouC présentent un taux plasmatique de ghréline élevé (Kappeler et al., 2004a; Mitchell et al., 2006). Par ailleurs, les rats LouC ont à tout âge une glycémie, et en particulier une insulïnémie et une leptinémie drastiquement plus faibles que les rats Wistar (Perrin et al., 2003; Kappeler et al., 2004b; Taleux et al., 2008). Ils disposent d'une sensibilité périphérique accrue à l'insuline et d'une meilleure tolérance au glucose (Perrin et al., 2003). Les rats LouC présentent également un taux réduit de triglycérides (Soulage et al., 2008). L'ensemble de ces données indique que les rats LouC ont un métabolisme périphérique adapté à l'établissement d'une résistance à l'obésité perpétuelle. Il existe aujourd'hui toujours très peu de données sur les mécanismes centraux de régulation de l'homéostasie énergétique chez les rats LouC. Certains auteurs ont montré que des neuropeptides orexigènes tels que l'orexine A, le NPY et l'AgRP seraient surexprimés dans l'hypothalamus des rats LouC (Kappeler et al., 2004a ; Mitchell et al., 2006).

	Zucker fa/fa	LouC
Phénotype	Obèse ↗ Prise alimentaire	Résistant à l'obésité ↗ Activité locomotrice
Origine du phénotype	Récepteur de la leptine muté	Inconnue
Témoins	Zucker fa/+	Wistar
Caractéristiques périphériques	↗ Triglycérides ↗ Leptine ↗ Insuline Résistance à l'insuline	↘ Triglycérides ↘ Leptine ↘ Insuline Sensibilité à l'insuline
Caractéristiques centrales	↗ NPY ↘ POMC (α MSH)	(↗ NPY) ↘ POMC (α MSH)

Tableau 2 : Récapitulatif des principales caractéristiques phénotypiques des modèles métaboliques Zucker fa/fa obèses et LouC résistants à l'obésité.

Les caractéristiques périphériques font références aux mesures des taux circulants de triglycérides, de leptine et d'insuline. La résistance et la sensibilité à l'insuline correspondent à l'incapacité (résistance) ou à la capacité accrue (sensibilité) de l'insuline à réduire le taux de glucose circulant. Les caractéristiques centrales font références aux mesures des taux de transcription de neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire pour l'une ou l'autre de ces souches. Les parenthèses traduisent un effet qui est à l'heure actuelle non consensuel dans la littérature.

En outre, d'autres auteurs ont infirmé ces résultats (Taleux et al., 2008). En revanche, il a été montré par deux études que la quantité d'ARNm de POMC, le précurseur du neuropeptide anorexigène α MSH, est réduite chez les rats LouC (Kappeler et al., 2004a; Kappeler et al., 2004b; Taleux et al., 2008).

De manière intéressante, alors que l'expression de la plupart des neuropeptides hypothalamiques orexigènes et anorexigènes est modulée par l'état alimentaire chez les rats Wistar, cette modulation ne semble pas avoir lieu chez les rats LouC (Taleux 2008). L'AMPK, une kinase jouant le rôle de senseur de l'état métabolique dans l'hypothalamus, est activée lors du jeûne chez les rats Wistar alors que son activité n'est pas modulée par l'état alimentaire chez les rats LouC (Taleux et al., 2008).

Les principales caractéristiques métaboliques des rats Zucker fa/fa et LouC sont résumées dans le tableau 2.

Afin d'étudier les capacités de détection olfactive des rats Zucker fa/fa et des rats LouC, nous avons utilisé un protocole expérimental identique à la première étude comportementale menée avec les rats Wistar (Aime et al., 2007). Brièvement, les rats Zucker fa/fa (n=12), leurs témoins Zucker fa/+ (n=12) et les rats LouC (n=12) ont été placés en cycle inversé (cycle 12h/12h, lumières éteintes à 7h) et en restriction alimentaire et hydrique avec un accès à la nourriture et à un complément hydrique pendant 4h par jour, de 13h à 17h. Les animaux ont été testés dans le dispositif expérimental lors d'une première session de 5 minutes à 9h en l'état affamé et de nouveau le soir, lors d'une session de 5 minutes à 19h en l'état rassasié. Après une habituation à la cage expérimentale, les animaux ont été rendus aversifs à l'ISO 10^{-5} et le test de détection olfactive à été mené sur une gamme de dilutions d'acétate d'isoamyle étendue de l'ISO 10^{-11} à l'ISO 10^{-7} . Notons toutefois que les rats LouC, de la même manière que leurs témoins Wistar, n'ont pas été testés pour l'ISO 10^{-11} . Les résultats obtenus pour cette étude sont résumés par la figure 23.

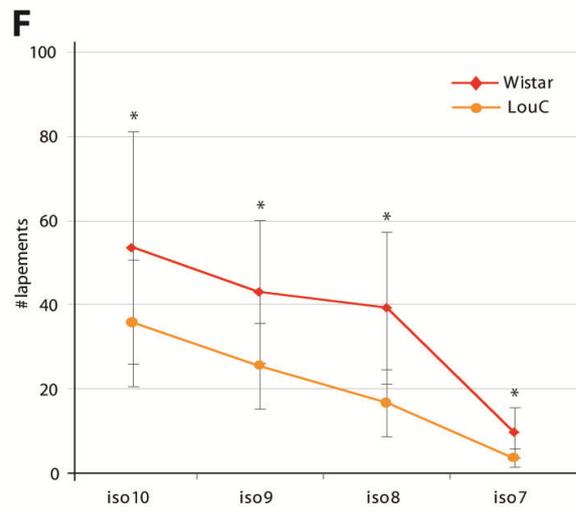
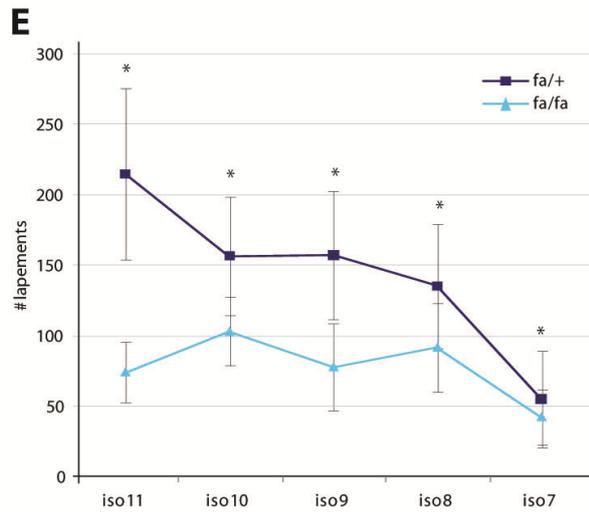
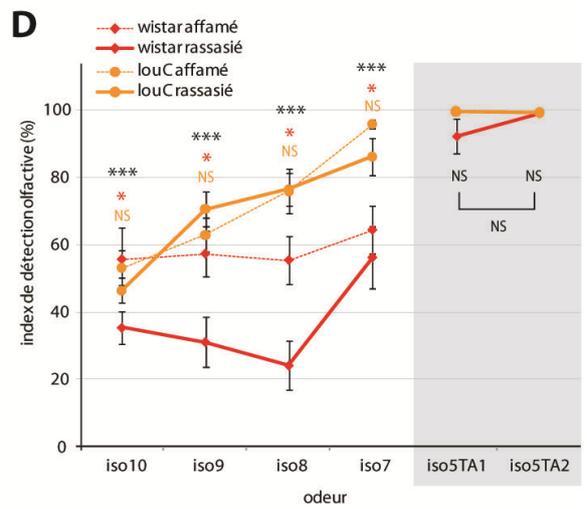
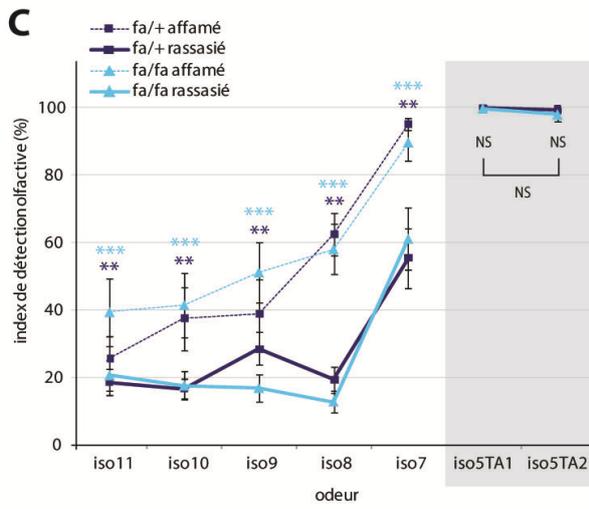
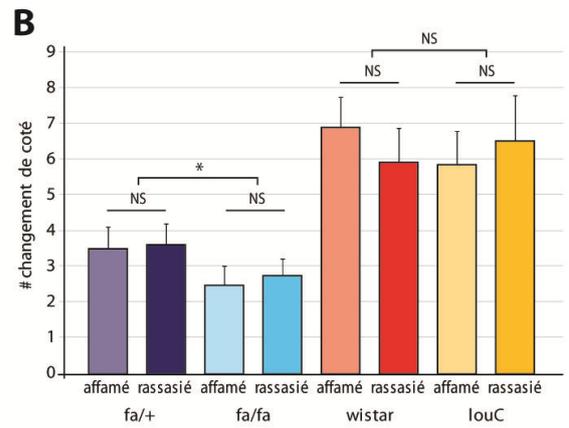
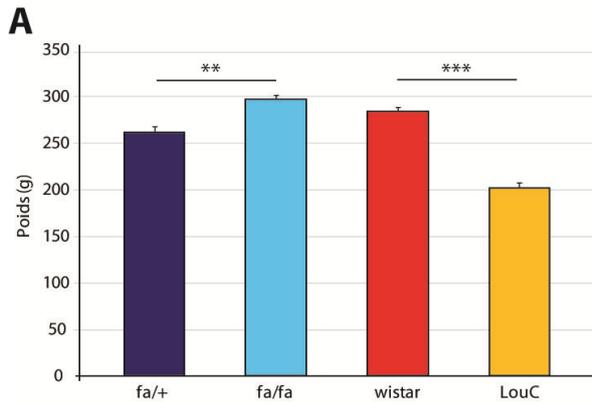


Figure 23 : Comparaison de la modulation de la détection olfactive par l'état alimentaire pour les rats Zucker fa/fa obèses et leurs témoins Zucker fa/+ ainsi que pour les rats LouC résistants à l'obésité et leurs témoins Wistar.

(A) Phénotype pondéral. Poids des rats de chaque souche (fa/+, fa/fa, Wistar, LouC) le dernier jour du test comportemental (moyenne en gramme +/- SEM). Test de Student : ** p<0,001 et *** p<0,0001. **(B) Motricité.** Nombre de changements de côté dans le dispositif expérimental lors du test de la détection olfactive pour les sessions expérimentales au cours desquelles deux boissons différentes ont été présentées (moyenne +/- SEM). Les résultats ont été mesurés pour chaque souche (fa/+, fa/fa, Wistar, LouC) en l'état affamé et en l'état rassasié. Pour les rats Zucker (fa/+ et fa/fa), le test d'ANOVA à mesures répétées indique un effet de la souche *p<0,05. En revanche pour les rats LouC et Wistar, ce test ne révèle pas d'effet de la souche (NS). Par ailleurs, ce test n'a pas révélé d'effet de l'état alimentaire, quelque soit la souche considérée (NS). **(C,D) Détection olfactive.** Les résultats sont représentés par un index de détection olfactive, correspondant au nombre de lapements d'eau pure divisé par le nombre de lapements total au cours de chaque session expérimentale (moyenne +/- SEM). Les courbes représentent les résultats du test de détection olfactive pour les dilutions d'acétate d'isoamyle de 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} (iso11, iso10, iso9, iso8, iso7) pour les animaux affamés (trait fin et pointillés) et rassasiés (trait épais et plein). Les droites des zones grisées représentent les résultats des tests de l'aversion pour la dilution d'acétate d'isoamyle de 10^{-5} , au début du test comportemental (iso5TA1 pour le test de l'aversion) et à la fin du test comportemental (iso5TA2 pour le re-test de l'aversion). (C) Résultats des rats Zucker fa/+ et Zucker fa/fa. Pour le test de détection, l'ANOVA à mesures répétées indique un effet de l'état alimentaire pour les fa/+ (**p<0,001) et les fa/fa (**p<0,0001) mais pas d'effet de la souche. Pour les tests d'aversion, l'ANOVA à mesures répétées ne révèle pas d'effet du test (iso5TA1 ou iso5TA2, NS) et pas d'effet de l'état alimentaire (NS). (D) Résultats des rats Wistar et LouC. Pour le test de détection, l'ANOVA à mesures répétées indique un effet de l'état alimentaire pour les Wistar (*p<0,05) mais pas pour les rats LouC (NS). Ce test révèle également un important effet de la souche (**p<0,0001). Pour les tests d'aversion, l'ANOVA à mesures répétées ne révèle pas d'effet du test (iso5TA1 ou iso5TA2, NS) et pas d'effet de l'état alimentaire (NS). **(E,F) Prise de décision.** Les résultats sont exprimés en nombre de lapements lors de la première consommation d'acétate d'isoamyle de la session expérimentale (moyenne +/- SEM) pour les dilutions d'acétate d'isoamyle de 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} (iso11, iso10, iso9, iso8, iso7) et pour les quatre souches de rats. (E) Résultats des rats Zucker fa/+ et Zucker fa/fa. (F) Résultats des rats Wistar et LouC. Note : les échelles sont différentes en E et en F. Dans les deux cas, l'ANOVA à mesures répétées révèle un effet de la souche (*p<0,05).

Tout d'abord, nos données expérimentales démontrent que les rats Zucker fa/fa présentent une masse corporelle significativement plus élevée que leurs témoins Zucker fa/+ (Figure 23A ; fa/fa : 298 +/- 18g ; fa/+ : 262 +/- 6g ; test de Student **p<0,001) et que les rats LouC présentent une masse corporelle significativement plus réduite que leurs témoins Wistar (Wistar : 285 +/- 17g ; LouC : 203 +/- 19g ; test de Student ***p<0,0001). Ces résultats nous permettent de confirmer que les phénotypes des différentes souches utilisées pour cette étude étaient bien établis lors de la réalisation du test comportemental.

Afin d'évaluer l'activité locomotrice des animaux dans le dispositif expérimental, le nombre de changements de côté de chaque rat, affamé puis rassasié, a été mesuré dans le dispositif expérimental lors du test de la détection olfactive au cours des sessions expérimentales pour lesquelles deux boissons différentes étaient présentées (Figure 23B). Les résultats indiquent que les rats obèses Zucker fa/fa (fa/fa affamé : 2,44 +/- 0,59 ; fa/fa rassasié :

2,75 +/- 0,47) présentent une activité locomotrice réduite dans la cage expérimentale par rapport à leurs témoins Zucker fa/+ (fa/+ affamé : 3,45 +/- 0,65 ; fa/+ rassasié : 3,60 +/- 0,60 ; ANOVA à mesure répétées $F_{(1,22)}=5,27$; ** $p>0,001$). En revanche les rats LouC et Wistar présentent une activité locomotrice équivalente (Wistar affamé : 6,87 +/- 0,88 ; Wistar rassasié : 5,92 +/- 0,96 ; LouC affamé : 5,81 +/- 1,00 ; LouC rassasié : 6,52 +/- 1,29 ; $F_{(1,18)}=0,15$; $\alpha=0,05$ n.s.). Enfin, quelque soit la souche considérée et sur l'ensemble du test de détection olfactive, les animaux démontrent une activité locomotrice globale identique dans le dispositif expérimental, qu'ils soient affamés ou qu'ils soient rassasiés (fa/+ $F_{(1,11)}=0,31$; fa/fa $F_{(1,11)}=0,57$; Wistar $F_{(1,7)}=0,48$; LouC $F_{(1,11)}=1,13$; $\alpha=0,05$ n.s.).

La capacité de détection olfactive a été évaluée en mesurant un index de détection olfactive, correspondant au nombre de lapements d'eau pure divisé par le nombre de lapements total effectué au cours des sessions expérimentales pour lesquelles les animaux avaient le choix entre de l'eau pure et de l'eau odorisé avec de l'ISO pour des dilutions de 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-5} (Figure 23C,D). Lors du test d'aversion réalisé au début du test comportemental, lorsque les animaux avaient le choix entre de l'ISO à la dilution 10^{-5} et de l'eau pure (iso5TA1), les index de détection olfactive sont proches de 100% (fa/+ affamé : 99,97 +/- 0,03% ; fa/+ rassasié : 99,98 +/- 0,02% ; fa/fa affamé : 99,85 +/- 0,15% ; fa/fa rassasié : 99,80 +/- 0,10% ; Wistar affamé : 99,94 +/- 0,04% ; Wistar rassasié : 92,40 +/- 5,07% ; LouC affamé : 99,58 +/- 0,16% ; LouC rassasié : 99,63 +/- 0,21%), indiquant que l'aversion était parfaitement établie à l'issue du conditionnement aversif. Lors du re-test d'aversion réalisé à la fin du test comportemental (iso5TA2), les index de détection olfactive demeurent proches de 100% (fa/+ affamé : 99,90 +/- 0,06% ; fa/+ rassasié : 99,38 +/- 0,23% ; fa/fa affamé : 98,01 +/- 1,80% ; fa/fa rassasié : 98,05 +/- 0,90% ; Wistar affamé : 99,58 +/- 0,21% ; Wistar rassasié : 99,10 +/- 0,49% ; LouC affamé : 99,52 +/- 0,29% ; LouC rassasié : 99,36 +/- 0,34%) et ne sont pas significativement différents des index de détection mesurés lors du premier test d'aversion (ANOVA à mesure répétées ; fa/+ et fa/fa : $F_{(1,16)}=3,21$ $\alpha=0,05$ n.s. ; Wistar et LouC : $F_{(1,18)}=0,62$ $\alpha=0,05$ n.s.), indiquant que l'aversion est restée effective pendant toute la durée du test comportemental. De plus, les résultats obtenus lors des tests d'aversion ne sont pas significativement différents entre les souches (ANOVA à mesure répétées ; fa/+ et fa/fa : $F_{(1,16)}=2,17$ $\alpha=0,05$ n.s. ; Wistar et LouC : $F_{(1,18)}=1,31$ $\alpha=0,05$ n.s.) et entre l'état affamé et l'état rassasié (ANOVA à mesure répétées ; fa/+ et fa/fa : $F_{(1,16)}=0,113$ $\alpha=0,05$ n.s. ; Wistar et LouC :

$F_{(1,18)}=1,93$ $\alpha=0,05$ n.s.). En indiquant que la rétention de l'aversion est identique du début à la fin du test comportemental, quelque soit la souche et quelque soit l'état alimentaire, ces données valident l'utilisation du paradigme d'aversion olfactive conditionnée pour l'étude de la détection olfactive de nos modèles métaboliques.

Les résultats obtenus pour les rats Zucker fa/fa et Zucker fa/+ lors du test de détection olfactive démontrent que les Zucker fa/fa obèses comme leurs témoins fa/+ non-obèses, présentent une modulation de la perception olfactive par l'état alimentaire (Figure 23C). En effet, les rats Zucker fa/+ présentent des index de détection olfactive significativement plus élevés en l'état affamé (iso11 : 25,69 +/- 6,82% ; iso10 : 37,60 +/- 9,47% ; iso9 : 39,06 +/- 10,12% ; iso8 : 62,55 +/- 6,28% ; iso7 : 95,26 +/- 1,75%) qu'en l'état rassasié (iso11 : 18,73 +/- 3,92% ; iso10 : 16,82 +/- 2,93% ; iso9 : 28,75 +/- 4,76% ; iso8 : 19,45 +/- 3,85% ; iso7 : 55,57 +/- 8,97%)(ANOVA à mesure répétées ; $F_{(1,11)}=27$ ** $p<0,001$). De la même manière, les rats Zucker fa/fa présentent des index de détection olfactive significativement plus élevés en l'état affamé (iso11 : 39,58 +/- 9,96% ; iso10 : 41,63 +/- 9,43% ; iso9 : 51,34 +/- 8,91% ; iso8 : 58,22 +/- 7,40% ; iso7 : 89,85 +/- 5,57%) qu'en l'état rassasié (iso11 : 20,74 +/- 4,42% ; iso10 : 17,66 +/- 4,18% ; iso9 : 16,98 +/- 4,07% ; iso8 : 12,92 +/- 3,16% ; iso7 : 61,15 +/- 9,21%) (ANOVA à mesure répétées ; $F_{(1,11)}=47,97$ *** $p<0,0001$). En revanche, l'analyse de variance n'a pas pu mettre en évidence d'effet de la souche ($F_{(1,22)} = 0,06$ $\alpha=0,05$ n.s.) et suggère que les rats Zucker fa/fa et Zucker fa/+ présentent des capacités de détection olfactive équivalentes.

Les résultats obtenus pour les rats Wistar et les rats LouC lors du test de détection olfactive démontrent que les rats Wistar, comme nous l'avons déjà démontré, présentent une modulation de la perception olfactive par l'état alimentaire (Figure 23D) et détiennent des index de détection olfactive significativement plus élevés en l'état affamé (iso10 : 55,78 +/- 9,52% ; iso9 : 57,42 +/- 6,78% ; iso8 : 55,53 +/- 7,25% ; iso7 : 64,53 +/- 7,15%) qu'en l'état rassasié (iso10 : 35,50 +/- 4,88% ; iso9 : 31,27 +/- 7,55% ; iso8 : 24,30 +/- 7,30% ; iso7 : 56,37 +/- 9,21%)(ANOVA à mesure répétées ; $F_{(1,11)}=10,70$ * $p<0,05$). En revanche et de manière surprenante, les rats LouC présentent des index de détection olfactive non significativement différents entre les deux états alimentaires (iso10 affamé: 53,18 +/- 5,11% ; iso10 rassasié: 46,58 +/- 3,81% ; iso9 affamé: 63,03 +/- 4,96% ; iso9 rassasié: 70,67 +/- 5,25% ; iso8 affamé: 76,01 +/- 6,62% ; iso8 rassasié : 76,63 +/- 4,82% ; iso7 affamé: 95,91 +/- 1,39% ; iso7 rassasié: 86,33 +/- 5,56% ;

ANOVA à mesure répétées ; $F_{(1,11)}=0,32$ $\alpha=0,05$ n.s.), indiquant que ces animaux ne présentent pas de modulation de la perception olfactive d'une odeur neutre par les états alimentaires. De plus, il apparaît que les rats LouC présentent de bien meilleures capacités de détection olfactive que leurs témoins Wistar (ANOVA à mesures répétées $F_{(1,22)}=22,88$ *** $p<0,0001$).

Afin d'analyser plus précisément le comportement des animaux lors du test de détection olfactive, le nombre de lapements lors de la première consommation d'ISO a été mesuré au cours de chaque session expérimentale (Figure 23E,F). Cette mesure reflète la latence nécessaire à l'animal pour prendre la décision de quitter la boisson odorisée aversive. Il est attendu que plus l'animal détecte rapidement l'ISO diluée dans la boisson, plus il réalise un nombre réduit de lapements avant de quitter le tube d'eau odorisée. Les résultats obtenus indiquent que les rats Zucker fa/fa effectuent un plus petit nombre de lapements (Figure 23E ; iso11 : 74,83 +/- 21,50 ; iso10 : 103,5 +/- 24,36 ; iso9 : 78,37 +/- 31,03 ; iso8 : 92,29 +/- 31,32 ; iso7 : 42,96 +/- 19,51) que les rats Zucker fa/+ (iso11 : 215,04 +/- 61,01 ; iso10 : 157,08 +/- 42,05 ; iso9 : 157,75 +/- 45,58 ; iso8 : 135,79 +/- 43,96 ; iso7 : 55,67 +/- 34,36), avant de quitter le biberon de boisson odorisée aversive pour consommer de l'eau pure (ANOVA à mesures répétées $F_{(1,22)}=6,10$ * $p<0,05$). Les rats LouC effectuent également un nombre de lapements significativement plus faible (Figure 23F ; iso10 : 36,04 +/- 15,05 ; iso9 : 25,87 +/- 10,13 ; iso8 : 16,96 +/- 7,95 ; iso7 : 4,00 +/- 2,16) que les rats Wistar (iso10 : 53,83 +/- 27,59 ; iso9 : 43,33 +/- 16,89 ; iso8 : 39,58 +/- 17,89 ; iso7 : 10,00 +/- 5,95), avant de quitter le biberon de boisson odorisée aversive (ANOVA à mesures répétées $F_{(1,22)}=4,818$ * $p<0,05$).

Ces résultats indiquent que les rats Zucker fa/fa obèses présentent, comme leurs témoins Zucker fa/+, une modulation de la perception olfactive par les états alimentaires et disposent d'une meilleure sensibilité olfactive en l'état affamé qu'en l'état rassasié. Il apparaît cependant que les rats Zucker fa/fa, malgré une motricité réduite dans le dispositif expérimental, détectent plus rapidement l'ISO que les rats Zucker fa/+, suggérant que les animaux obèses et privés de la voie de signalisation de la leptine, possèdent de meilleures performances olfactives que leurs témoins Zucker fa/+. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs, qui ont également démontré que les souris *db/db* exprimant, comme les rats Zucker fa/fa, un récepteur de la leptine non-fonctionnel, mettent significativement moins de temps pour retrouver une récompense alimentaire que les souris

normales (Getchell et al., 2006). Par ailleurs, il a été démontré que les rats Zucker fa/fa surexpriment les neuropeptides orexigènes NPY et Orexine A (Sanacora et al., 1990 ; Mondal et al., 1999). De plus, bien que la concentration plasmatique de ghréline ne soit pas supérieure à celle des rats Zucker fa/+, les rats Zucker fa/fa présentent une augmentation importante des récepteurs de cette molécule au niveau de l'hypothalamus (Nogueiras et al., 2004; Brown et al., 2007). Ces données nous laissent penser que chez les rats Zucker fa/fa, hyperphagiques et constitutivement affamés, l'action centrale des neuropeptides orexigènes et de la ghréline conduit à une augmentation de la détection olfactive. Ce phénomène est exacerbé par une diminution de l'influence des molécules anorexigènes. En effet, ces animaux sous-expriment POMC, le précurseur du neuropeptide anorexigène α MSH (Yamamoto et al., 2002). Par ailleurs, ils sont génétiquement résistants à la leptine (Chua et al., 1996) et développent également une résistance secondaire à l'insuline (Zucker and Antoniadis, 1972). Il est intéressant de noter que, chez les rats Zucker fa/fa, la mise en place d'un régime alimentaire peut modifier les résistances à la leptine et à l'insuline. Ainsi, la leptine peut influencer certains comportements, impliquant notamment le circuit de la récompense, lorsque ces animaux sont soumis à une restriction alimentaire chronique telle que celle utilisée lors de nos tests comportementaux, tandis qu'elle n'a aucun effet chez des animaux soumis à un jeûne aigu (Fulton et al., 2004). Certains auteurs ont suggéré que la restriction alimentaire chez ces animaux obèses augmentait la sensibilité du système nerveux central à la leptine en modifiant l'expression des différentes formes du récepteur de la leptine (Bennett et al., 1998). Ces résultats suggèrent que chez les rats Zucker fa/fa, malgré une persistance de la résistance périphérique à la leptine et à l'insuline, certaines régions du système nerveux central pourraient être modulées par ces deux peptides dans certaines conditions nutritionnelles particulières. Ainsi l'insuline, au même titre que d'autres molécules dont la concentration varie avec la prise alimentaire, pourraient chez le rat Zucker fa/fa comme chez son témoin mince être responsable, dans nos conditions expérimentales, de la modulation de la détection olfactive en fonction de l'état alimentaire. Toutefois, ces données demeurent préliminaires et d'autres études comportementales sont à envisager pour établir précisément le phénotype olfactif des rats Zucker fa/fa et étudier l'influence des molécules impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sur les capacités olfactives de ces animaux.

Les rats LouC présentent d'excellentes performances olfactives : ils disposent d'une meilleure sensibilité olfactive et détectent l'ISO plus rapidement que leurs témoins Wistar. Par ailleurs les rats LouC ont la particularité de ne pas démontrer de modulation de la détection olfactive par les états alimentaires. De la même manière que les rats Zucker fa/fa, les rats LouC sur-expriment les neuropeptides orexigènes Orexine A, NPY et AgRP (Kappeler et al., 2004a ; Mitchell et al., 2006) et sous-expriment POMC, le précurseur du neuropeptide anorexigène de l' α MSH (Kappeler et al., 2004a; Kappeler et al., 2004b; Taleux et al., 2008). Ainsi les très bonnes performances olfactives mesurées chez les rats LouC pourraient être liées à la surexpression de molécules orexigènes. En revanche, contrairement aux rats Wistar, l'expression des molécules hypothalamiques orexigènes et anorexigènes ne semble pas être modulée par l'état alimentaire chez les rats LouC (Taleux et al., 2008). De plus, alors que la concentration en ghreline augmente de façon significative avec le jeûne chez le rat Wistar, elle ne semble pas varier en fonction de l'état alimentaire chez le rat LouC (Taleux et al., 2008). La même tendance à été observée par les mêmes auteurs pour la leptine, qui diminue lors du le jeûne chez le Wistar mais dont le taux ne varie pas chez le LouC. Ainsi, le taux d'expression et l'absence de variations d'expression des neuropeptides et de certaines molécules périphériques au cours du cycle nutritionnel pourraient donc sous-tendre l'absence de modulation de la détection olfactive en fonction de l'état alimentaire, observée chez les LouC.

Chapitre II - Modulation de la détection olfactive par les molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique

Après avoir démontré chez le rat et la souris que les états alimentaires étaient modulés par les états alimentaires et métaboliques, la suite logique de ce travail consistait à étudier les mécanismes sous-tendant une telle modulation. Comme nous l'avons exposé dans le troisième chapitre de l'introduction, de nombreuses données semblent indiquer que les hormones et les neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique peuvent agir au niveau du système olfactif pour en modifier l'activité et ainsi conduire à une modulation de la perception olfactive. Ainsi, la deuxième étape de ce travail a consisté à étudier les rôles de certaines molécules impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sur la capacité de détection olfactive des rats.

Une première étude a été menée dans le but d'analyser les rôles distincts de l'Orexine A et de la leptine sur la capacité de détection olfactive d'une odeur neutre chez le rat. Ce travail collaboratif a fait l'objet d'une publication en 2007 dans la revue *Behavioural Brain Research*.

Une deuxième étude a été conduite pour caractériser l'influence de l'insuline sur la modulation de la capacité de détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques chez le rat. Ce travail est actuellement en préparation pour soumission à *The Journal of Neuroscience*.

1) Troisième étude : Changements des performances de détection olfactive induits par l'orexine et la leptine, mimant les états de faim et de rassasiement.

Résumé : De nombreux peptides périphériques et hypothalamiques contrôlent la prise alimentaire. Parmi ces signaux se trouvent l'orexine, une molécule orexigène libérée dans le bulbe olfactif par des fibres centrifuges hypothalamiques, et la leptine, une molécule anorexigène libérée en périphérie et capable de traverser la barrière hématoencéphalique pour atteindre le système nerveux central. Dans cette étude, nous avons injecté en ICV soit de l'orexine, soit de la leptine, et leurs effets sur les performances olfactives ont été mesurés sur deux groupes de rats, en utilisant un paradigme comportemental basé sur une aversion olfactive conditionnée. Les rats ont été rendus aversifs à de l'eau odorisée à l'acétate d'isoamyl (ISO) à la dilution de 10^{-5} (1 μ l dans 100ml d'eau). Un premier groupe a été injecté avec de l'orexine *vs* saline et le second groupe a été injecté avec de la leptine *vs* saline. Plusieurs concentrations d'eau odorisée à l'ISO (plus faibles que 10^{-5}) ont été présentées aux animaux afin de comparer leur capacité à éviter la boisson odorisée. L'orexine diminue la consommation d'ISO, traduisant un comportement d'évitement accru pour les concentrations d'ISO comprises entre 10^{-9} et 10^{-7} . A l'inverse, les administrations de leptine induisent une augmentation dose-dépendante de la consommation d'ISO pour la concentration d'ISO 10^{-10} . Ces résultats démontrent que l'orexine augmente et que la leptine diminue la sensibilité olfactive. Ainsi, l'orexine et la leptine modulent les performances olfactives de la même manière que les états physiologiques de faim et de satiété et apparaissent comme des éléments cruciaux des interactions entre l'olfaction et la prise alimentaire.



Research report

Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation

A.K. Julliard^a, M.A. Chaput^a, A. Apfelbaum^a, P. Aimé^a,
M. Mahfouz^b, P. Duchamp-Viret^{a,*}

^a *Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition, CNRS, UMR 5020, Université de Lyon, Lyon 1, 50 Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France*

^b *Institut Camille Jordan, Equipe Probabilités et Statistiques, UMR 5208, Université de Lyon, Lyon 1, 50 Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France*

Received 3 April 2007; received in revised form 22 May 2007; accepted 29 May 2007

Available online 2 June 2007

Abstract

Numerous peripheral and hypothalamic peptides control food intake. Among these signals are orexin, an orexigenic molecule released into the olfactory bulb by centrifugal hypothalamic fibres and leptin, an anorexigenic molecule that is released peripherally and can pass through the blood–brain barrier. In the present study, we injected either orexin or leptin, intracerebroventricularly, and their effect on olfactory performance was evaluated in two groups of rats, using a behavioral paradigm based on conditioned olfactory aversion. Rats were made aversive to water odorized with isoamyl acetate (ISO) at 10^{-5} (1 μ l in 100 ml of water). One group was injected with orexin versus saline and the other with leptin versus saline. They were then presented with different concentrations (lower than 10^{-5}) of ISO-odorized water to compare their ability to avoid the ISO-drink. Orexin decreased ISO-drink consumption, showing increased avoidance of the ISO concentrations tested which ranged from 10^{-9} to 10^{-7} . Conversely, the administration of leptin resulted in a dose dependant increase in the odorized-drink consumption for ISO 10^{-10} . Orexin therefore increases and leptin decreases olfactory sensitivity. Orexin and leptin modulate the olfactory performance in a similar way as do physiological induced fasting and satiation and appear to be important factors in the interdependency of olfaction and food intake.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Olfaction; Odor; Feeding; Aversion; Leptin; Orexin

1. Introduction

Olfaction is one of the main external cues which can induce feeding independently from the nutritional cravings of an organism [54]. Most animals including humans use this sense to appreciate food palatability and initiate food intake [14,24,35,36,41–43,59] and impairment of the olfactory signal may affect the control of eating behavior [20,33,39]. Thus, deciphering how olfactory mechanisms are involved in feeding behavior appears to be a relevant way to better define some of the factors responsible for obesity and other eating disorders, whether caused by genetic or environmental factors.

In humans, the feeding state modulates olfactory sensitivity [26–29,35,38,63,68]. In animals, although this modulation had

been reported [11], it had never been specifically analyzed until a very recent behavioral experiment by our team where the ability to detect odors was compared in fasted and satiated rats [1]. Fasting and satiation were found to increase and decrease the olfactory detection power of rats.

The findings that the feeding state has a direct influence on olfactory sensitivity raises the question of what the chemical signals involved in such changes in olfactory performance are, *i.e.* in the crosstalk between the hypothalamic feeding network and the olfactory system. Numerous peripheral or hypothalamic molecules have been reported to act in the priming and stopping of food intake [44]. Among these molecules, orexin appears especially interesting since a considerable body of evidence has pointed to it being a stimulator of food intake [15,34,44,47,55,57]. In the central nervous system, orexin is synthesized and secreted by hypothalamic neurons [13,58] and is released into the olfactory bulb (OB) and cortices from centrifugal fibers originating directly from the lateral hypothalamic

* Corresponding author. Tel.: +33 3728 7463; fax: +33 43728 7601.
E-mail address: pviret@olfac.univ-lyon1.fr (P. Duchamp-Viret).

areas [8,12,13,52,58]. It is thus possible that orexin is involved in the signaling between the hypothalamus and olfactory centers.

One of the most potent among satiety signals, leptin [5,16,17,22] is synthesized peripherally by the adipocytes and secreted in direct proportion to the degree of adiposity [46] acting on the hypothalamic feeding networks which in turn regulate food intake by initiating satiety [46,48,64]. Leptin is involved in fat regulation, insulin signaling, glucose homeostasis and bone remodeling and appears to be of great interest for a therapeutic approach to obesity [9]. It has also been proposed that leptin is one of the major signal mediators involved in modulating performance of the olfactory system in relation to the alimentary status [37] and indeed, leptin receptor expression has been shown to increase in the olfactory epithelium of fasted rats [4].

Intracerebroventricular (icv) administration of orexin has been demonstrated to increase food intake in rats [15,56,58,66] and mice [47] and icv administration of leptin to decrease food intake in both rats [16,34,50,61] and humans [19,32,49] which led us to hypothesize that these two molecules should be capable of mimicking very closely the feeding states of physiological fasting and satiation.

In order to decipher some of the mechanisms underlying the influence of the feeding state on olfactory sensitivity, the present study addresses the question of the action of orexin and leptin on olfactory perception. The aim was to provide experimental evidence of the involvement of orexin and leptin in the crosstalk between hypothalamic and olfactory structures by showing that orexin and leptin act on olfactory sensitivity in a very similar way to that of fasting and satiety. This was done by pairing the behavioral paradigm based on conditioned olfactory aversion (COA) with icv injections of orexin and leptin in rats placed under a strictly controlled food-intake regimen.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), for the care and use of laboratory animals and every effort was made to minimize animal suffering and keep to a minimum the number of animals used. Experimental protocols were approved by the Comité d'Expérimentation Animale of the Université Claude Bernard, Lyon 1.

The orexin and leptin experiments were performed on two different groups of 12 naive male Wistar rats. The rats (2 months old and weighing 220/240 g on receipt) were purchased from Charles River Laboratories (France). On arrival, they were housed individually in Plexiglas chambers at constant temperature and relative humidity (22 ± 0.5 °C and $50 \pm 5\%$). All rats were kept under a 12 h light–12 h dark cycle and were weighted daily at 09:00 a.m.

2.2. Surgery

The surgical procedures we used have been described in detail by Mistry et al. [48]. Drugs were icv administered through cannula (Plastic One, 22-gauge stainless steel guide) implanted in the left lateral cerebral ventricle. The correct positioning of the cannula was verified by an intense drinking response to an icv injection of angiotensin II (100 ng; Sigma–Aldrich, France) after which the rats were allowed to recover for 7 days in their home cage with free access to food and water before the water-restriction pre-study phase began. During this period, they were handled daily and the dummy cannula inserted in the icv cannula was carefully removed and replaced.

2.3. Drugs

Orexin A was purchased from Bachem AG (Switzerland) and leptin from Sigma–Aldrich (France). The orexin was administered at a dose of $10.7 \mu\text{g}/\text{rat}$ (3 nmol) and leptin at 30 or 90 ng/rat (18.75 and 56.25 pmol). The two drugs were delivered in 3 μl of saline vehicle (NaCl 9‰) over 60 s. Neither the orexin [31] nor the leptin [45] injected at these doses were found to quantitatively change the food intake.

2.4. Behavioral protocol

2.4.1. Common features of the experiments

The behavioral tests utilized in the two experiments were based on beverage consumption. One week prior to testing the rats were habituated to a 22 h/day water restriction schedule which continued throughout the experiments.

The behavioral tests were conducted in parallel in groups of four rats in individual Plexiglas operant chambers (330 mm \times 210 mm \times 180 mm) details of which can be found elsewhere [1]. Two plastic tubes were mounted on opposite sides of the flat ceiling of each chamber. Each tube was connected to a custom-made capacitance circuit which allowed the experimenter to measure the amount of liquid consumed by the rat and to record its licks using a CED 1401 interface (CED, Cambridge) connected to a computer.

The behavioral experiments are schematically illustrated in Fig. 1A and B. They are based on conditioned olfactory aversion. Rats were first trained to drink tap water in the operant chambers for 3 days (not shown). During the following 4 days, corresponding to COA establishment, the rats only had access to water odorized with ISO at 10^{-5} (corresponding to 1 μl of ISO in 100 ml of water at which dilution ISO is only perceived olfactorily) [62]. On the first day, the isoamyl acetate was paired with an intraperitoneal injection of LiCl (10 ml/kg at 0.15 M) 15 min later to make the animals sick. Then only those which drank more than 0.5 ml of ISO during any of the subsequent 3 days were injected with LiCl. Once COA was established, the aversion was tested on day 0 (D0) of each experiment by giving the animals the choice between tap water and water odorized with ISO 10^{-5} . During the test period the rats were offered a choice between tap water and water odorized with ISO at different concentrations which were chosen according to the results of our preceding experiment [1]. Indeed, using the same test, we had shown that olfactory detection performances differed significantly between physiologically fasted and satiated rats for ISO at 10^{-9} and 10^{-8} . The present concentration range used in orexin and leptin experiments includes these values. At the end of the two experiments, 7 days later (D7), COA stability was checked by giving rats the choice between ISO at 10^{-5} and tap water (aversion retest).

When the tubes contained two different drinks, their right–left position was systematically interchanged across sessions. At the beginning of each session, rats were intentionally placed under the tube containing the ISO-odorized water.

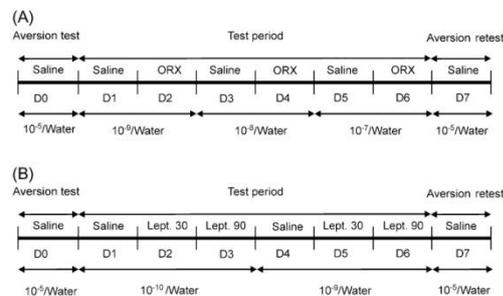


Fig. 1. Schematic representation of the overall course of the orexin (A) and leptin (B) experiments. COA was tested on D0 (aversion test) and tested again on D7 (aversion retest) where the rats had a choice between ISO 10^{-5} and tap water. In both experiments the test period ran from D1 to D6. The nature of the icv injection and the ISO concentration are given for each day. Orexin (ORX) was icv injected at $10.7 \mu\text{g}/\text{rat}$ and leptin (Lept) at either 30 or 90 ng/rat.

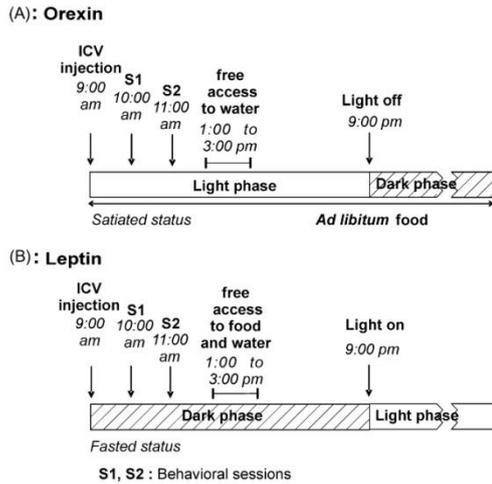


Fig. 2. Schematic representation of the daily schedule of the orexin (A) and leptin (B) experiments. For both experiments, the behavioral tests comprised two sessions, S1 and S2. Orexin experiments were done on satiated rats, at the beginning of the light phase, the animals having *ad libitum* access to food. Leptin experiments were done in fasted rats at the beginning of the dark phase, the animals having access to food for 2 h/day from 01:00 to 03:00 p.m.

Rat olfactory sensitivity for ISO was thus assessed using a forced-choice task, and not by using a simple choice task, since the thirsty rats were forced to smell the odorized tube first. This procedure was chosen to avoid the possibility that the rats, highly motivated by thirst, would go by chance to the pure water tube first, drink only water, and not sample the ISO tube.

2.4.2. Specifics of the orexin experiment

The colony lighting was controlled according to a normal 12 h light–12 h dark cycle with light being turned on at 09:00 a.m. (Fig. 2A). The rats had *ad libitum* access to food, so they were satiated at the beginning of the test, and had access to water only from 1:00 to 3:00 p.m. They were submitted to two 5-min daily test sessions performed at 10:00 a.m. (S1) and 11:00 a.m. (S2). As shown in Fig. 1A, the test schedule ran over 6 days (D1–D6). Each daily test period started at 9:00 a.m. with an icv injection of saline (D1, D3 and D5) or orexin (D2, D3 and D4). Then during the two 5-min daily test sessions, the rats were offered the choice between tap water and water odorized at different ISO concentrations: ISO at 10^{-9} (D1–D2), 10^{-8} (D3–D4) and 10^{-7} (D5–D6).

2.4.3. Specifics of the leptin experiment

The colony lighting was controlled according to an inverted 12 h light–12 h dark cycle with light being turned off at 09:00 a.m. (Fig. 2B). The rats were

habituated and kept on a 22 h food- and water-restriction schedule. As they had access to food and water only from 01:00 to 03:00 p.m., they were fasted at the beginning of the test. The detection test comprised two 5-min sessions: S1 at 10:00 a.m. and S2 at 11:00 a.m. As shown in Fig. 1B the test schedule ran over 6 days (D1–D6). Each daily test period started at 9:00 a.m. with an icv injection of saline (D1 and D4) or leptin (30 ng on D2 and D5; 90 ng on D3 and D6). Then during the two 5-min daily test sessions, the rats were offered the choice between tap water and water odorized at different ISO concentrations: ISO at 10^{-10} (D1–D3) and ISO at 10^{-9} (D4–D6).

2.4.4. Data processing and statistical analysis

The raw data collected during each test session were the volumes of tap and odorized water consumed by the rats and the sequences of licks recorded at each tube by the detectors connected to the CED 1401 apparatus. The volumes were utilized to calculate the proportion of odorized water consumed with respect to the total beverage intake. The licking recording sequences were processed to determine the number of side (tube) changes during each session.

All statistical procedures were performed using SAS software. Variable distribution was first tested for normality using Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov tests. If the studied variable followed a normal distribution, data analysis was performed using the ANOVA method. Otherwise, the drugs' effects on behavior or ISO intake were analyzed by using the non-parametric Wilcoxon two-sample test. *P*-values < 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

During the orexin and leptin experiments, several physiological and behavioral parameters were controlled (Table 1). The weight of rats remains stable over the orexin and leptin experiments. Although orexin or leptin have not been reported to change food intake at the utilized doses, food intake was measured in the leptin experiments because, first the animals were kept on a 22 h food-restriction schedule (versus an *ad libitum* regimen for orexin experiment) and second, their restrained access to food occurred in the hours following the tests (Fig. 2). In Table 1, it can be seen that food intake is not affected by leptin. The drinking behavior in the operant chamber was analyzed, for drug versus saline, by comparing the amounts of fluid consumed (tap water + odorized water). It is shown that the orexin injections significantly increased the liquid intake ($P < 0.005$). In contrast, no significant change was observed for leptin regardless of the dose injected. To evaluate whether the drugs changed the locomotor activity of the rats inside the test apparatus, the numbers of side changes during the sessions were compared. Neither leptin nor orexin were found to have a significant influence on the number of side changes.

Table 1
Physiological and behavioral parameters measured in rats included in the orexin and leptin experiments

	Orexin experiment		Leptin experiment		
	Saline	Orexin	Saline	Leptin 30	Leptin 90
Weight (g)	317.77 ± 5.9	318.88 ± 5.48	291.58 ± 6.69	290.83 ± 7	293.12 ± 7.45
Mean food intake (g)	–	–	19.52 ± 0.98	21.28 ± 0.12	19.56 ± 1.09
Mean fluid intake (ml)	7.82 ± 0.96	9.64*** ± 0.89	6.10 ± 0.69	6.97 ± 0.62	6.14 ± 0.70
Number of side changes	5.04 ± 0.48	5.67 ± 0.45	4.92 ± 0.32	5 ± 0.58	4.5 ± 0.47

For each measure, comparisons were made inside each experimental group, orexin and leptin, between saline and drug injection. The weight remains stable over orexin and leptin experiments as well as the mean food intake for the rat injected with leptin. The mean fluid intake is significantly increased in rats receiving orexin (** $P < 0.005$). The numbers of side changes during the test did not significantly differ in any condition. ±: S.E.M.

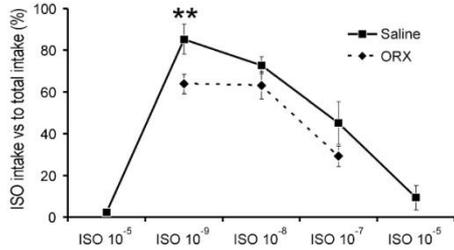


Fig. 3. Effect of orexin on ISO-drink consumption as a function of concentrations. The rats decreased their ISO consumption under orexin as compared to saline, regardless of the concentration; this decrease was highly significant for ISO 10⁻⁹ (** $P < 0.01$).

In both experiments, COA establishment was checked on D0 by giving the rats the choice between ISO 10⁻⁵ and tap water (Fig. 1). In both groups of rats, COA was perfectly established since they consumed less than 0.5 ml of ISO 10⁻⁵ odorized water. COA was tested again at the end of each experiment on D7 when ISO intake was not found to significantly differ from that on D0, indicating that there was no COA attenuation.

In Fig. 3, the two curves give the proportion of ISO intake as a function of the concentration in the control (NaCl) and orexin injected rats. The amounts consumed per rat in each test sessions (S1 and S2) were averaged. For 10⁻⁹, 10⁻⁸ and 10⁻⁷-odorized water, the two curves show a significantly higher consumption than that observed for 10⁻⁵ ($P < 0.005$), and inversely proportional to the ISO concentration. The curves show that the rats decreased their ISO consumption when under orexin compared with saline whatever the concentration, and that this decrease was highly significant for ISO 10⁻⁹ ($P < 0.01$). Since it has been shown that the ability of rats to manifest COA by avoiding ISO is an appropriate index of their olfactory perception [1], these results indicate that orexin increases olfactory sensitivity in the rat similarly to physiological fasting.

The three curves in Fig. 4 give the proportion of odorized fluid intake as a function of ISO concentration after saline, leptin 30 ng or leptin 90 ng injections. In this experiment, the control rats were physiologically fasted. Consequently whatever the ISO

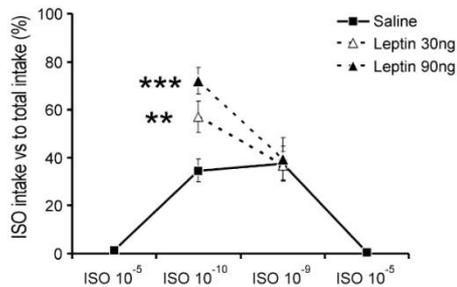


Fig. 4. Effect of leptin on ISO-drink consumption as a function of concentrations. Both doses of leptin increased the rat's ISO-drink consumption at 10⁻¹⁰ (leptin 30 ng: ** $P < 0.005$; leptin 90 ng: *** $P < 0.0001$); the highest dose reflected a more potent effect.

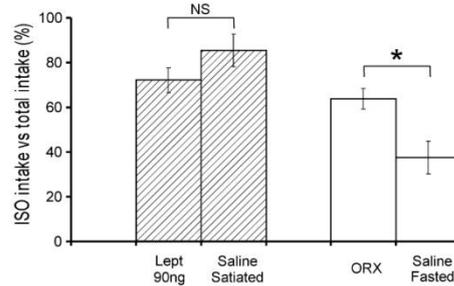


Fig. 5. Parallel between the physiologically induced and the drug-mimicked feeding states: comparison of ISO-drink consumptions. The physiologically satiated rats correspond to the control rats injected with saline during the orexin experiment. The physiologically fasted rats correspond to the control rats injected with saline during the leptin experiment. The physiologically fasted and ORX rats consumed significantly less ISO-drink than the physiologically satiated and Lept rats ($P < 0.05$). The physiologically fasted rats consumed less ISO-drink than orexin fasted rats (* $P < 0.05$). The physiologically satiated rats and leptin rats did not consume significantly different amounts of the ISO-odorized drink.

concentration, their consumption of the ISO-drink was very low, and lower than that of the control rats in the orexin experiments (Fig. 3), which were physiologically satiated. This low initial consumption makes it all the more obvious that both doses of leptin increased ISO-drink consumption at 10⁻¹⁰ (leptin 30 ng: $P < 0.005$; leptin 90 ng: $P < 0.0001$), the highest dose reflecting a more potent effect. These results indicate that leptin decreases olfactory sensitivity similarly to physiological satiation [1], in a dose dependant manner.

Because our experiments were based on the assumption that orexin and leptin are two important agents linking the fasted and satiated states to olfactory perception, Fig. 5 focuses on the parallel between the physiologically induced and the drug-mimicked feeding states. We expected that the physiologically fasted control rats (of the leptin experiment) and the *ad libitum* fed rats injected with orexin would demonstrate similar ISO-drink consumption. This was the case as in both experiments the rats consumed significantly less ISO-drink than the satiated ones, *i.e.* the physiologically satiated rats under saline (of the orexin experiment) and the leptin satiated rats ($P < 0.05$). However, the physiologically fasted control rats consumed even less ISO-drink than did the orexin fasted rats ($P < 0.05$). Likewise, the physiologically satiated control rats and the leptin satiated rats were expected to consume similar proportions of ISO. Again this proved to be true since the leptin rats (90 ng) and physiologically satiated rats consumed significantly more ISO-drink than did the others although the relative amounts consumed were not significantly different.

4. Discussion

By studying the general drinking behavior of rats under drugs, orexin was found to significantly increase the overall drink consumption. This confirms the previously reported results of Kuni et al. [40]. Orexin is furthermore well known to influence loco-

motor activity and plays an important role in arousal [7,65]. Similarly, leptin has also been stated to exert a positive influence on locomotor activity [10] and reported to normalize locomotion in hypoactive *ob/ob* mice [51]. In our paradigm, neither orexin nor leptin induced significant changes in locomotor activity as measured by the number of side changes. This allows us to exclude that the effects of orexin and leptin on ISO-drink avoidance or intake are attributable, even in part, to their effect on locomotor activity or arousal.

Using the same COA paradigm we showed in a previous experiment that fasted rats avoid ISO-drink at very low concentrations which are undetectable when rats are satiated and concluded that fasting increases olfactory sensitivity [1]. In order to mimic fasting, orexin was administered during the early light phase (at 09:00 a.m.) when its effect on feeding has been said to be at a maximum [18,31]. Under these conditions, rats were found to avoid low concentrations of ISO, despite the global influence of orexin which tends to increase the total drink consumption and orexin clearly appears to be able to modulate olfactory perception in exactly the same direction as fasting does. This supports the idea that orexin has an important role in the fasted status, at least regarding changes in olfactory perception. Orexin can be assumed to act directly at the level of the OB network where it is released by hypothalamic fibers [8,12,13,52,58]. In recent electrophysiological studies it was shown that orexin modulates the electrophysiological activity of the OB network both *in vitro* [30] and *in vivo* [2] by acting on orexin receptors types localized on different neuronal subpopulations [30]. Hardy et al. [30] also reported that orexin could change mitral cell excitability to electrical shocks applied on the olfactory nerve. Given the present results, we assume that the centrifugal action of orexin might modulate the sensitivity of OB neurons to the sensory input.

By inducing a dose dependant increase in ISO-drink consumption, and thus a decrease in ISO-drink avoidance, leptin produces an effect close to that of physiological satiation [1]. To prove that leptin changes ISO-drink intake, we needed both to increase the leptin dose and to decrease ISO concentrations (by comparison with our preceding experiments [1]). Because leptin injections were done in physiologically fasted rats to mimic satiation, leptin had to counteract the action of endogen peptides including that of orexin which has been shown to have a very potent effect on olfactory performance, and which has a very high level during the dark period when animals are active [23,67]. As shown by the saline curve, the physiologically fasted rats consumed little ISO-drink, even at the lowest concentration. In these conditions, leptin had to counterbalance the high sensitivity accompanying the fasted state [1]. Leptin did this for ISO 10^{-10} , thus significantly decreasing the olfactory sensitivity in the same direction as for physiological satiation. This is consistent with the finding that leptin injections in *ob/ob* mice decrease olfactory performance when food seeking, lowering their sensitivity to a level similar to that of wild-type mice [25]. The effect of leptin on olfactory performance is anatomically supported by the fact that, along with the hypothalamus, the olfactory system is also a major target for leptin, as leptin receptors are strongly expressed in both the piriform cortex [6] and

the OB [60]. Globally, our results point to an important role for leptin in the satiated state at least regarding the changes in olfactory perception. Further *in vitro* electrophysiological studies are in progress to determine the precise action of leptin on OB neurons.

Our results are consistent with the conclusion that orexin and leptin probably modify processing in the olfactory bulb by increasing or decreasing the olfactory detection power of rats for a neutral odor. It is remarkable that their action appears to be more especially linked with low concentrations, with 10^{-9} for orexin and 10^{-10} for leptin. Such a pharmacological action on olfactory performance, linked with concentration of the stimulus has been already described by Pho et al. [53] who showed that intraperitoneal injections of rolipram impaired odor detection in mice specifically at low concentrations. In the olfactory bulb, orexin has been experimentally demonstrated to act on the network, by activating periglomerular and granular GABAergic neurons or mitral cells [30]. Such an action may result in a modification in activation of the global network and thus the activated glomerular map which depends on both odor quality and intensity [21]. Thus, it may be suggested that the action of orexin or leptin could come into play at low levels of intensity, probably by enhancing activation of the neuron network set in motion at threshold concentrations of odorants.

The parallel made between the physiological and the drug-induced fasting and satiation reinforces the argument that orexin and leptin are important agents in the hypothalamic feeding network/olfactory structure crosstalk. However physiological fasting appears to be more effective than orexin-induced “fasting” in altering olfactory perception. This is probably due, even in part, to the fact that the rats receiving orexin were fed *ad libitum* while the physiologically fasted rats were fed only during the same 2-h period each day. The *ad libitum* fed rats therefore would have had different food intakes and probably had higher degrees or at least different degrees of satiation. In addition, orexin injections in *ad libitum* fed rats probably had to counteract high level of endogenous circulating leptin. Taken together, these hypotheses probably account for the difference in ISO avoidance and/or olfactory perception observed with physiological and orexin-induced fasting. Furthermore, physiological fasting consists in a far more complex chemical environment than does a simple increase in orexin levels and the same remark is valid for physiological versus leptin-induced “satiety”. Indeed, numerous peripheral and central chemical signals are involved in controlling the two feeding states and could also intervene to modulate olfactory processing ([44], for a review). Thus, it is perfectly consistent that orexin and leptin influence the olfactory sensitivity in a similar direction to that of physiological fasting and satiety, but that they cannot be as potent as fasting and satiety are.

The results lie within the scope of our experimental approach concerning the role of olfaction on feeding behavior [1–3,30] and enrich our previous data showing that olfactory sensitivity is modulated by the physiological feeding state [1]. We now have further insight into the signals underlying the interaction between feeding state and olfactory sensitivity by showing that orexin and leptin are important agents in the hypothala-

mic feeding network/olfactory pathway crosstalk. These results open important perspectives for evaluating the links between the olfactory performance of some rat strains and their metabolic specificities leading to a tendency or not towards obesity and the specific links with their relative rates of orexin or leptin endogen circulation. Such studies will provide important insights into the understanding of the involvement of molecular signal deficit or abundance in the development of pathophysiological metabolic states and their relationship with olfaction.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pr. Edwin Griff (University of Cincinnati) for his critical reading and to Wanda Lipski (English Training Service) for English language correction of this paper. The authors thank Bernard Bertrand and Samuel Garcia for their technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche (CNRS) and the Claude Bernard University of Lyon and received a grant from "ANR" – Agence Nationale de la Recherche – The French National Research Agency under the «Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine», project «ANR-05-PNRA-1.E7 AROMALIM».

References

- [1] Aimé P, Duchamp-Viret P, Chaput MA, Savigner A, Mahfouz M, Julliard AK. Hunger increases and satiation decreases rat olfactory detection performances for a neutral odor. *Behav Brain Res* 2007;179:258–64.
- [2] Apfelbaum A, Perrut A, Chaput M. Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul Pept* 2005;129:49–61.
- [3] Apfelbaum AE, Chaput MA. Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 2003;28:389–95.
- [4] Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix MC, Durieux D, Schlegel C, et al. Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 2007;1129:130–41.
- [5] Bates SH, Myers Jr MG. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:447–52.
- [6] Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson IC, Carlsson LM, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* 1998;67:29–36.
- [7] Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci* 2001;4:605–11.
- [8] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437–51.
- [9] Cohen Jr MM. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *Am J Med Genet A* 2006;140:515–24.
- [10] Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 2005;1:63–72.
- [11] Cunningham GB, Van Buskirk RW, Bonadonna F, Weimerskirch H, Nevitt GA. A comparison of the olfactory abilities of three species of procellariiform chicks. *J Exp Biol* 2003;206:1615–20.
- [12] Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukawa S, Kangawa K, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *PNAS* 1999;96:748–53.
- [13] De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:322–7.
- [14] Duclaux R, Feisthauer J, Cabanac M. Effects of a meal on the pleasantness of food and nonfood odors in man. *Physiol Behav* 1973;10:1029–33.
- [15] Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 1999;160:R7–12.
- [16] Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 1999;22:221–32.
- [17] Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1998;1:445–50.
- [18] Espana RA, Plahn S, Berridge CW. Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Res* 2002;943:224–36.
- [19] Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999;341:879–84.
- [20] Fedoroff IC, Stoner SA, Andersen AE, Doty RL, Rolls BJ. Olfactory dysfunction in anorexia and bulimia nervosa. *Int J Eat Disord* 1995;18:71–7.
- [21] Fried HU, Fuss SH, Korsching SI. Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3222–7.
- [22] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763–70.
- [23] Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 h and in response to food deprivation. *Neuroreport* 2001;12:993–7.
- [24] Geiselman PJ. Control of food intake. A physiologically complex, motivated behavioral system. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1996;25:815–29.
- [25] Getchell TV, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML. Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 2006;87:848–56.
- [26] Goetzl FR, Abel MS, Ahokas AJ. Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *J Appl Physiol* 1950;2:553–62.
- [27] Goetzl FR, Stone F. Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology* 1947;9:444–53.
- [28] Goetzl FR, Stone F. The influence of amphetamine sulfate upon olfactory acuity and appetite. *Gastroenterology* 1948;10:708–13.
- [29] Hammer FJ. The relation of odor, taste, and flicker-fusion thresholds to food intake. *J Comp Physiol Psychol* 1951;44:03–11.
- [30] Hardy AB, Aioun J, Baly C, Julliard KA, Caillol M, Salessse R, et al. Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: patch-clamp study on slices and immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology* 2005;146:4042–53.
- [31] Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, et al. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 1999;20:1099–105.
- [32] Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 1999;282:1568–75.
- [33] Hunter-Smith DG, Kessel K, Grant M, Piotrowski ZH. Association between elevated body-mass index and impaired sense of smell in older people. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:100–1.
- [34] Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res* 1999;821:526–9.
- [35] Janowitz HD, Grossman MI. Gusto-olfactory thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *J Appl Physiol* 1949;2:217–22.
- [36] Janowitz HD, Hollander F, Marshar RH. The effect of tween-65 and tween-80 on gastrointestinal motility in man. *Gastroenterology* 1953;24:510–6.
- [37] Karlsson AC, Lindroos AK, Lissner L, Torgerson JS, Carlsson B, Carlsson LM, et al. Evidence for gender-specific associations between leptin and olfaction. *J Genet Specif Med* 2002;5:25–32.

- [38] Koelega HS. Diurnal variations in olfactory sensitivity and the relationship to food intake. *Percept Mot Skills* 1994;78:215–26.
- [39] Kopala LC, Good K, Goldner EM, Birmingham CL. Olfactory identification ability in anorexia nervosa. *J Psychiatry Neurosci* 1995;20:283–6.
- [40] Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 1999;842:256–61.
- [41] Le Magnen J. The role of olfacto-gustatory stimuli in the regulation of the alimentary behavior of the mammal. *J Psychol Norm Pathol (Paris)* 1959;56:137–60.
- [42] Le Magnen J. In: Solms J, Hall RL, editors. Neurophysiological basis for sensory mediated food selection. Criteria of food acceptance. Zurich: Forster Verlag; 1981. p. 268–80.
- [43] Le Magnen J. My scientific life: 40 years at the College de France. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:375–94.
- [44] Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004;25:473–504.
- [45] Liu L, Karkianis GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J, et al. Intracerebroventricular leptin modulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem* 1998;273:31160–7.
- [46] Loftus TM. An adipocyte-central nervous system regulatory loop in the control of adipose homeostasis. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:11–8.
- [47] Lubkin M, Stricker-Krongrad A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:241–5.
- [48] Mistry AM, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *J Nutr* 1997;127:2065–72.
- [49] Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903–8.
- [50] Nagamori K, Ishibashi M, Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K. Effects of leptin on hypothalamic arcuate neurons in Wistar and Zucker rats: an in vitro study. *Exp Biol Med* 2003;228:1162–7.
- [51] Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269:540–3.
- [52] Peyron C, Tighe D, Vanden Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996–10015.
- [53] Pho V, Butman ML, Cherry JA. Type 4 phosphodiesterase inhibition impairs detection of low odor concentrations in mice. *Behav Brain Res* 2005;161:245–53.
- [54] Pinel JP, Assanand S, Lehman DR. Hunger, eating, and ill health. *Am Psychol* 2000;55:1105–16.
- [55] Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 2002;36:303–25.
- [56] Sakurai T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* 1999;85:25–30.
- [57] Sakurai T. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 2005;9:231–41.
- [58] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1992;573–85.
- [59] Share L, Martyniuk E, Grossman MI. Effect of prolonged intragastric feeding on oral food intake in dogs. *Am J Physiol* 1952;169:229–35.
- [60] Shiota S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 1998;243:41–4.
- [61] Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K, Wayner MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 2000;71:251–61.
- [62] Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC. What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Anim Learn Behav* 1997;25:357–69.
- [63] Turner P, Patterson DS. Smell threshold as a test of central nervous function. *Acta Otolaryngol* 1967;62:149–56.
- [64] Wang L, Barachina MD, Martinez V, Wei JY, Tache Y. Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul Pept* 2000;92:79–85.
- [65] Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Leibowitz SF. Peptides that regulate food intake: orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1454–65.
- [66] Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 1999;849:248–52.
- [67] Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 2001;14:1075–81.
- [68] Zilstorff-Pedersen K. Olfactory threshold determinations in relation to food intake. *Acta Otolaryngol* 1955;45:86–90.

2) Quatrième étude : L'insuline diminue la détection olfactive d'une odeur neutre chez le rat

Résumé : Dans le système nerveux central, l'insuline joue un rôle crucial dans les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète, et est impliquée dans de multiples mécanismes de régulation dont la régulation de la masse corporelle et de la prise alimentaire. De plus en plus de données suggèrent que l'insuline prend part au traitement de l'information olfactive. Les récepteurs de l'insuline sont abondamment exprimés dans le système olfactif et le bulbe olfactif est l'une des structures cérébrales contenant la plus grande quantité d'insuline. L'administration centrale d'insuline module la discrimination olfactive ; cependant le rôle de l'insuline sur la détection olfactive reste à élucider. En utilisant un paradigme comportemental basé sur une aversion olfactive conditionnée (AOC), nous avons démontré que l'injection intracérébroventriculaire (ICV) de 14mU d'insuline diminue sélectivement la capacité de détection olfactive d'une odeur neutre, sans altérer la rétention de l'AOC, l'activité locomotrice, les taux périphériques d'insuline de glucose, la prise alimentaire et la masse corporelle. Chez les animaux rassasiés, les taux plasmatiques et bulbaires d'insuline sont significativement plus élevés que chez les animaux affamés. De plus, l'injection ICV de 14mU d'insuline élève le taux d'insuline dans le bulbe olfactif (BO) d'animaux affamés au niveau du taux bulbaire d'insuline mesuré chez les animaux rassasiés. En quantifiant la distribution des récepteurs olfactifs dans le BO principal, nous avons démontré que les récepteurs de l'insuline sont préférentiellement exprimés dans les parties caudales et latérales, et que la densité maximale des récepteurs de l'insuline est présente dans la couche des cellules mitrales. L'ensemble de ces données démontre que le traitement de l'information olfactive est modulé par l'insuline au niveau du BO, suggérant que la fonction olfactive est sous le contrôle de signaux d'adiposité impliqués dans la régulation de la masse corporelle et du comportement alimentaire.

Journal section: Behavioral/Systems/Cognitive

Title: Central insulin decreases olfactory detection for a neutral odor in rats

Abbreviated title: Insulin decreases olfactory sensitivity

Aimé P.¹, Jaillard T.^{2,3}, Letexier D.⁴, Garcia S.¹, Lorsignol A.^{2,3}, Duchamp C.⁴, Julliard A.K.¹

1 Université de Lyon, F-69366, Lyon, France

Université Lyon 1

CNRS, UMR 5020, Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition.

2 Université de Toulouse, BP 84225 - F-31 432, Toulouse, France

Université Paul Sabatier

UMR5241, Métabolisme Plasticité Mitochondrie

3 CNRS, BP 84225 - F-31 432, Toulouse, France

UMR5241, Métabolisme Plasticité Mitochondrie

4 Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne, France

Université Lyon 1

CNRS UMR 5123, Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire

Address all correspondence and requests for reprints to: Pascaline Aime, CNRS/UCBL1-UMR 5020 Neurosciences sensorielles, Comportement, Cognition, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 7, tel: +33 (0)4 37 28 74 66, fax: +33 (0)4 37 28 76 01, email: pascaline.aime@olfac.univ-lyon1.fr

Number of figures: 6

Number of pages: 24

Number of words: Abstract (250), Introduction (498), Discussion (1496)

Keywords: Insulin, insulin receptor, olfactory detection, olfactory bulb, fasted, satiated

Acknowledgements: This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-05-PNRA 1E07Aromalim and by Ministère de la recherche et des nouvelles technologies. We thank Frédéric Esclassan for his assistance on statistical analyses. We thank Vanja Sisirak for the generous gift of the mouse IgG1 isotype. We thank Brigitte Palouzier-Paulignan and Agnès Savigner for their comments and careful reading of a previous version of the manuscript.

Abstract

In the brain, insulin is involved in multiple regulatory mechanisms, including body weight and food intake regulations and may play a critical role in metabolic disorders such as obesity and diabetes. An increasing body of evidence indicates that insulin takes a part in the modulation of olfactory processing. Insulin receptors (IRs) are abundantly expressed in the olfactory system, and the olfactory bulb (OB) contains the highest level of insulin in the brain. Central administration of insulin alters olfactory discrimination; however a role of insulin on olfactory detection remains to be elucidated. Using a behavioral paradigm based on conditioned olfactory aversion (COA), we demonstrated that an intracerebroventricular (ICV) injection of 14mU insulin in fasted rats acutely and selectively decreased olfactory sensitivity for a neutral odor, without altering COA memory, locomotor activity, circulating insulin and glucose levels, food intake and body weight. In satiated rats, OB and plasma insulin levels were significantly higher than in fasted rats. Furthermore, a 14mU insulin ICV injection significantly elevated the OB insulin level of fasted rats to the level of satiated rats. We further quantified IR distribution and showed that IRs are preferentially expressed in the caudal and lateral parts of the main OB, with the highest labeling found in the mitral cells, the main OB projection neurons. The whole of these data indicates that insulin may act on the olfactory bulb network to modulate olfactory processing, suggesting that olfactory function is under the control of adiposity signals involved in energy homeostasis regulation and feeding behaviours.

Introduction

Metabolic disorders such as diabetes and obesity are serious health threats and the prevalence of both disorders is rising worldwide to epidemic proportions. Therefore, it is crucial to understand the role of adiposity signals in the brain. Insulin is an hormone secreted by pancreatic β cells in response to blood glucose level (Henquin, 2009) and in direct proportion to body fat (Polonsky et al., 1988). Insulin facilitates glucose metabolism by promoting circulating glucose uptake into peripheral tissues (Saltiel and Kahn, 2001). Insulin crosses the blood brain barrier by a saturable transport to reach the CNS and regulate energy homeostasis (Frank et al., 1986; Duffy and Pardridge, 1987; Schwartz et al., 1990; Banks et al., 1997). Intracerebroventricular (ICV) insulin injections decrease food intake and body weight (Woods et al., 1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman and Oomura, 1986; Plata-Salaman et al., 1986; Air et al., 2002) and selective depletion of insulin receptors (IRs) in neurons results in hyperphagia leading to obesity (Bruning et al., 2000).

The feeding state influences olfactory processing: short-term fasting increases while satiation decreases olfactory detection for neutral odors (Aime et al., 2007). A 48h starvation increases *c-fos* activation in the mitral cell and granular cell layers of the olfactory bulb (OB) in response to food odors (Prud'homme et al., 2009). OB mitral cells reactivity is increased by short-term starvation and insulin-induced hypoglycaemia; and decreased by refeeding as well as gastric distension (Pager et al., 1972; Cain, 1975; Chaput and Holley, 1976; Apfelbaum and Chaput, 2003). Insulin might take part in the modulation of olfactory processing by the feeding state. Indeed, IRs are found throughout the brain and the highest densities of IRs are located in the OB and the hypothalamus (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990). A prolonged starvation lowers insulin binding sites in the OB without affecting the hypothalamus (Marks and Eastman, 1989). The transport rate of insulin in the OB is faster than into the whole brain (Banks et al., 1999); consequently, the OB is one of the brain regions that contains the highest level of insulin (Baskin et al., 1983). OB IR localization and insulin content suggest that insulin may in part regulate energy homeostasis and food intake behaviors by modulating olfactory information processing at the level of the OB. Recently it has been reported that repeated intranasal insulin administrations lead to functional activation of the OB and the modulation of several behaviours including changes in olfactory

discrimination (Marks et al., 2009). However, the central role of insulin on olfactory detection remains to be elucidated. In the present study, we demonstrated that insulin ICV administration in fasted rats decreases olfactory detection for a neutral odor while increasing OB insulin level to the level of physiologically satiated rats. As a spatial organization of odor maps has been demonstrated in the OB (Mori, 2003; Mori et al., 2006), we further analyzed the role of insulin on olfactory processing and precisely localized and quantified IRs in the OB network.

Material and Methods

Animals

Experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals. The experimental protocols were approved by the Comité d'Expérimentation Animale de l'Université Lyon1 and care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals. On arrival, male Wistar rats (Charles River) were housed individually in Plexiglas chambers at constant temperature and relative humidity ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $50 \pm 5\%$). Animals were acclimated to a 12h light / 12h dark inverted cycle (lights off at 9:00 a.m.) with food and water *ad libitum* for at least 2 weeks. Before invasive procedures, deep anesthesia was ensured by ip injection of ketamine (Imalgene, 80 mg/kg) and xylazine (Rompun, 10 mg/kg).

Behavioral experiments

Adult male Wistar rats (n = 18, 2 months, 250 g) were anesthetized and secured in a Stoelting stereotaxic frame, and a 22-gauge cannula (Plastics One) was placed into the left lateral cerebral ventricle using a previously described method (Julliard et al., 2007). Animal were allowed to recover for at least 7 days with food and water *ad libitum*.

One week prior to testing, rats were progressively habituated to a 22 hours/day water and food restriction schedule. Animals had access to food and water from 01:00 to 03:00 p.m. Individual body weights and food consumptions were monitored and recorded daily. During the overall course of the behavioral experiment, rats received a daily ICV injection of either NaCl (0.9% NaCl) or 14mU insulin (Sigma-Aldrich) administered in a 2 μL NaCl vehicle over 60 s, using a 10 μL Hamilton syringe at 09:00 a.m.

Animals were tested daily during a five-minute session at 10:00 a.m. The experimental set-up allowed recording of licking behavior using a two-tube device described elsewhere (Aimé et al., 2007; Julliard et al., 2007). The rats were first trained to drink pure water in the experimental cage for three days (habituation). During the following three days, they only had access to water odorized with isoamyl-acetate (ISO, Sigma-Aldrich) at odor dilution 1×10^{-5} (ISO 10^{-5}) known to be only perceived olfactorily (Slotnick et al., 1997)(Aversion). ISO consumption of above 0.5 mL was paired with an intraperitoneal injection of LiCl (10 mL/kg at 0.15 M, Sigma-Aldrich) 15 min later to induce gastric malaise and establish a conditioned olfactory aversion (COA) to ISO. COA was tested by giving the animals a choice between pure water and water odorized with ISO 10^{-5} (aversion test). During the test period, the rats were offered a choice between pure water and water odorized with ISO at lower dilutions, 1×10^{-9} (ISO 10^{-9}) and 1×10^{-8} (ISO 10^{-8}), which have been demonstrated previously to be modulated by feeding state (Aime et al., 2007; Julliard et al., 2007). Animals were tested for a given odorant dilution during 2 consecutive days: 1h after NaCl ICV injection on the first day and 1h after 14mU insulin ICV injection on the second day. At the end of the experiments, COA stability was again checked by giving the rats the choice between ISO 10^{-5} and pure water (aversion retest).

Licking was analyzed using SciPy and MySQL database software (Open Source Licenses). An olfactory detection (OD) index was calculated, corresponding to the proportion of the number of licks at the pure water tube with respect to the total number of licks (odorized + pure water). When rats perceived the ISO (and consequently avoided it), they drank more pure water during the experimental session, resulting in a higher OD index. Statistical comparisons for olfactory detection were performed using repeated-measures ANOVA with odor and ICV treatment as factors. Student-Newman-Keuls post-hoc test completed the analysis when appropriate (Statview software).

Glycaemia

Fasted rats received an ICV injection of either 2 μ L NaCl (n = 11) or 2 μ L of 14 mU insulin (n = 11) at 9:00 a.m. Peripheral blood glucose level was determined by sampling tail blood 1h after ICV injections and monitoring glucose levels with a glucose meter (Accu-

Chek, Roche). Statistical comparisons were performed using a non-parametric paired Wilcoxon rank-sum test (Statview).

Insulin extraction and ELISA assay

Fasted rats received an ICV injection of either 2 μ L NaCl (n = 5) or 2 μ L of 14 mU insulin (n = 5) at 9:00 a.m. At 04:00 p.m., satiated rats (n = 5) received a 2 μ L ICV injection of NaCl. Animals were anesthetized and killed 1 h after ICV injections, and OBs were immediately frozen. Trunk blood was collected in heparinized tubes, and the plasma fraction was separated by centrifugation for five minutes. Insulin was extracted from OB tissues according to the procedure of Baskin et al. (1983). To determine the influence of the extraction procedure on insulin output, a sample with a quantified amount of insulin was submitted to the same protocol. The mean extraction output was found to be around 40%. Plasma and OB insulin levels were determined using a solid-phase two-site enzyme immunoassay (Merckodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA) following the manufacturer's protocol. Statistical comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon rank-sum test (Statview).

Semi-quantitative RT-PCR

Animals were anesthetized, killed either in the fasted state at 09:00 a.m. (n = 6) or the satiated state at 04:00 p.m. (n = 6) and the OBs were immediately frozen. The total RNA was extracted from the entire OB using Trizol (Invitrogen), and the concentration and purity were checked by measuring the optical density at 260 and 280 nm. RNA integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis (Eurobio). IR mRNA relative abundance was measured by semi-quantitative RT-PCR using cyclophilin as reference. Reverse-transcription assays were performed from 1 μ g of total RNA with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). The following primer sequences were used: cyclophilin (sense 5'-GTGGCAAGTCCATCTACGGAG-3'; antisense 5'-CCACAGTCGGAGATGGTGATC-3', NM_017101, 265 bp), IR (sense 5'-GTCTTCGAGAACGGATCGAG-3', antisense 5'-CATGTCCGAAGAAGCAGTGA-3', NM_017071, 467 bp). PCR reactions were performed using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) with 30 and 25 cycles for IR and cyclophilin, respectively (denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 60°C,

elongation for 1 min at 72°C). Products were analysed on 2% agarose gel prestained with ethidium bromide. Relative band intensities were determined using a Kodak Digital Science 1D 2.0 system (Kodak Scientific Imaging System) and the ratio of IR to cyclophilin was determined for each sample. Statistical comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon rank-sum test (Statview).

Western Blot Analysis

Animals were anesthetized and killed either in the fasted state at 09:00 a.m. (n = 4) or the satiated state at 04:00 p.m. (n = 4). The dissected OBs were immersed for 15 min in a hypotonic buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 240 mM sucrose, and 0.5 mM dithiothreitol, pH = 7.4) supplemented with complete protease inhibitor cocktail tablets (Complete Mini, Roche). The OBs were then homogenized with a Dounce homogenizer and a B-type pestle in 60 µL of buffer. The homogenate was resuspended in 1 mL of buffer and quickly centrifuged. 50 µL of the supernatant was taken as the total fraction. Proteins (30 µg per lane) were separated on 10% SDS-PAGE and transferred onto a Hybond membrane (Amersham). Blocking was achieved by 1 h incubation at room temperature in 5% non-fat dry milk prepared in Tris-buffered saline with Tween (Sigma-Aldrich). The membranes were then probed with 0.4 µg/mL of either rabbit anti-IRβ [C-19] primary antibody (#sc-711, Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-IRα primary antibody (#sc-710, Santa Cruz Biotechnology), and mouse anti-actin α antibody (#MAB1501, Chemicon) overnight at 4°C. Blots were detected using a goat anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham) and an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). Finally, blots were exposed to autoradiographic films. Equality of protein loading was checked using Coomassie blue staining of the transferred membrane. An arbitrary unit of band intensity was obtained by densitometric analysis. Statistical comparisons were performed using a non-parametric Wilcoxon rank-sum test (Statview).

Immunofluorescence

Animals were anesthetized and killed either in the fasted state at 09:00 a.m. (n = 5) or the satiated state at 04:00 p.m. (n = 5). Immunofluorescence was performed using fresh frozen brain samples by modification of a published method (Julliard and Hartmann, 1998).

Brain cryosections were preincubated for 15 min with a blocking buffer containing 0.1 M PBS, pH = 7.4, 3% BSA (Sigma-Aldrich), and 5% normal serum from the host species of the antibodies. The sections were then incubated for 2 h at room temperature with either mouse monoclonal anti-IR β primary antibody at 4 μ g/mL (1:50, #AHR0271, Invitrogen) or mouse IgG1 for isotype control at 4 μ g/mL (1:250, #M9269, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-laminin (1:100, Sigma-Aldrich) diluted in blocking buffer. The sections were washed with 0.1 M PBS/3% BSA and incubated for 1 h at room temperature with goat anti-mouse IgG conjugated with Cy3 (1:500, Jackson Immunoresearch) and chicken anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (1:100, Molecular Probes). After the final wash with PBS, slides were mounted with a Vectashield mounting medium with DAPI (Vector laboratories). Images were acquired using a Zeiss Apotome epifluorescence microscope equipped with a digital camera and the Axiovision software. All images were acquired with the same exposure time. Quantification of IRs was performed by measurement of the pixel intensity of the IR-Cy3 fluorescent signal using the densitometric function of Axiovision software. OB layers (nerve layer, glomerular layer, external plexiform layer, mitral cells layer and granular cells layer) were hand-delimited on each image based solely on the DAPI signal. A total of 480 images were acquired and quantified: For each animal, 3 different zones of the main OB (anterior, intermediate, posterior) were analyzed. In each zone, 2 sections with left and right OBs were obtained. For each OB, 4 images corresponding to the laterodorsal, lateroventral, medioventral and mediodorsal regions of the main OB were acquired. Statistical comparisons were performed using repeated-measures ANOVA with feeding state, zones, regions and layers as factors. Student-Newman-Keuls post-hoc test completed the analysis when appropriate (Statview software).

Results

Validation of the COA paradigm in the two-tube experimental device

To validate our behavioural paradigm we measured and compared side choice corresponding to the number of licks at one tube with respect to the total number of licks in the experimental device during a five-min session, for habituation, aversion and aversion test and re-test periods (Fig. 1A). At the end of habituation, when animals had access to two

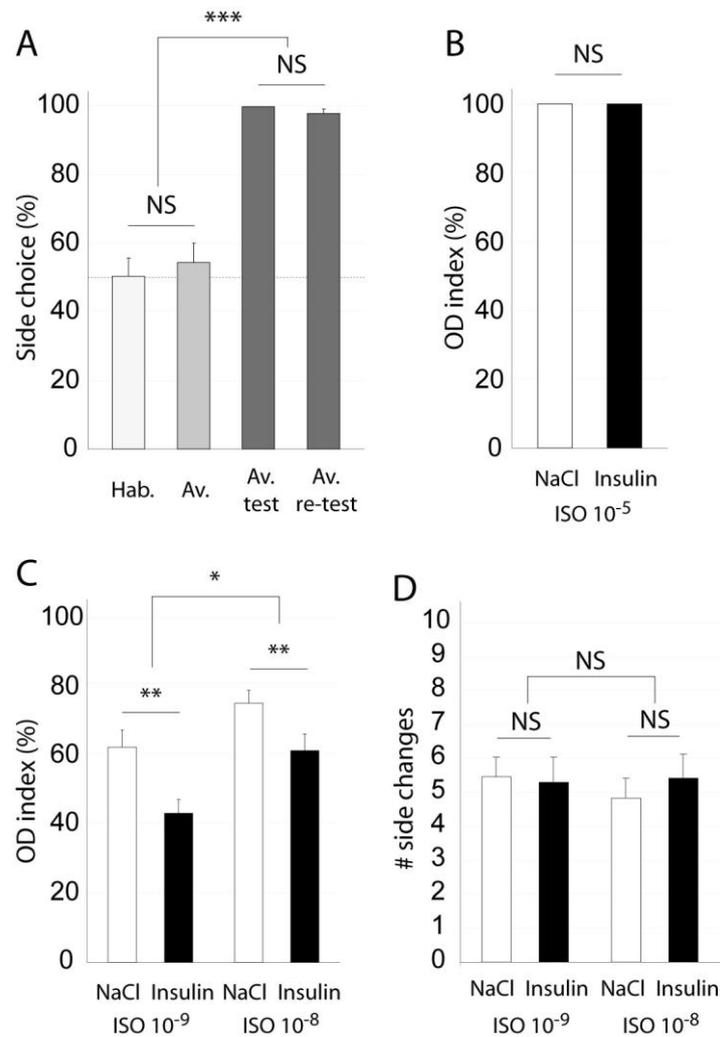


Figure 1: 14mU insulin ICV injection decreases olfactory detection for a neutral odor. (A) Validation of the COA paradigm in the two-tube experimental device. Before the conditioning, during the last day of habituation (Hab.), both tubes were filled with pure water and during the first day of aversion (Av.), both tubes were filled with ISO 10⁻⁵. Bar graphs represent percentages of side choice corresponding to the number of licks at the first sampled tube with respect to the total number of licks (mean ± SEM). Mean side choices for habituation and aversion were not statistically different (ANOVA $\alpha=0,05$ NS). After conditioning, for the aversion test (Av. test) and re-test (Av. re-test), rats had the choice between pure water and ISO 10⁻⁵. Bar graphs represent percentages of side choice corresponding to the number of licks at the pure-water tube with respect to the total number of licks in the two-tube experimental device (mean ± SEM). Mean side choices for aversion test and re-test were not statistically different (ANOVA $\alpha=0,05$ NS). Mean side choices were significantly different after the conditioning (ANOVA $***p<0.0001$). Dashed line represents the chance level (50%). (B) Insulin does not alter COA retention. Bar graphs represent the olfactory detection index (OD index) corresponding to the percentage number of licks at the pure water tube with respect to the total number of licks (mean ± SEM), when rats had the choice between pure water and ISO 10⁻⁵, 1h after NaCl ICV injection (NaCl) and 1h after 14mU insulin ICV injection (Insulin). Mean OD indexes were not statistically different (ANOVA $\alpha=0,05$ NS). (C) 14 mU Insulin ICV injection decreases olfactory detection for a neutral odor. Bar graphs represent the olfactory detection index (OD index) corresponding to the percentage number of licks at the pure water tube with respect to the total number of licks (mean ± SEM), when rats had the choice between pure water and odorized water at ISO 10⁻⁸ and ISO 10⁻⁹, 1h after NaCl ICV injection (NaCl) and 1h after 14mU insulin ICV injection (Insulin). Mean OD indexes were significantly different for odors (ANOVA * $p<0.01$) and ICV treatments (** $p<0.001$). (D) 14 mU Insulin ICV injection does not change locomotor activity. Bar graphs represent the number of side changes in the two-tube experimental device (mean ± SEM), when rats had the choice between pure water and ISO 10⁻⁸ and ISO 10⁻⁹, 1h after NaCl ICV injection (NaCl) and 1h after 14mU insulin ICV injection (Insulin). Mean side changes were not statistically different for odors or ICV treatments (ANOVA $\alpha=0,05$ NS).

pure-water tubes, rats were equally licking at both tubes (50.48 ± 5.22 % side choice for the first sampled tube). On the first day of aversion, before the aversive conditioning and when animals had access to two odorized-water tubes at ISO 10^{-5} , rats were also equally licking at both tubes (54.39 ± 5.57 % side choice for the first sampled tube). No statistical differences in side choice were seen between the last day of habituation and the first day of aversion (Student Newman Keuls (SNK), $\alpha=0.05$, non significant (n.s.)). These results indicated that animals were correctly trained to sample both tubes in the experimental device, and no lateralization bias was revealed. As expected, a repeated measures ANOVA indicated that side choice was significantly different after the LiCl aversive conditioning for ISO 10^{-5} ($F_{(3,18)} = 44.44$, $p < 0.0001$). Indeed, after the conditioning, when animals had the choice between a pure-water tube and an odorized-water tube at ISO 10^{-5} (aversion test), animals were drinking almost exclusively at the pure-water tube (99.67 ± 0.21 % side choice for the pure-water tube), showing that the COA was perfectly effective. At the end of the behavioural experiments, when animals were again given the choice between a pure-water tube and an odorized-water tube at ISO 10^{-5} (aversion re-test), animals were still drinking almost exclusively at the pure-water tube (97.81 ± 1.16 % side choice for the pure-water tube) and this result was statistically not different from the aversion test result (SNK, $\alpha=0.05$, n.s.), indicating that COA was maintained throughout the behavioural experiment.

ICV insulin injection does not alter COA retention

Central insulin administration is known to modulate several types of memories (Schwarzberg et al., 1989; Park et al., 2000; Park, 2001; Haj-ali et al., 2009). In order to test whether COA retention was altered by ICV insulin injection, rats were again given the choice between a pure-water tube and an odorized-water tube at ISO 10^{-5} and we measured the olfactory detection (OD) index, corresponding to the proportion of the number of licks at the pure water tube with respect to the total number of licks in the experimental device, 1h after 14mU ICV injection and 1h after NaCl ICV injection (Fig 1B). A repeated measures ANOVA demonstrated that OD index following 14mU insulin ICV injection ($99.79 \pm 0.17\%$) was statistically not different from OD index following NaCl ICV injection ($99.92 \pm 0.19\%$) ($F_{(1,10)} = 0.438$, $p > 0.5$), indicating that 14mU insulin ICV injection had no effect on COA retention.

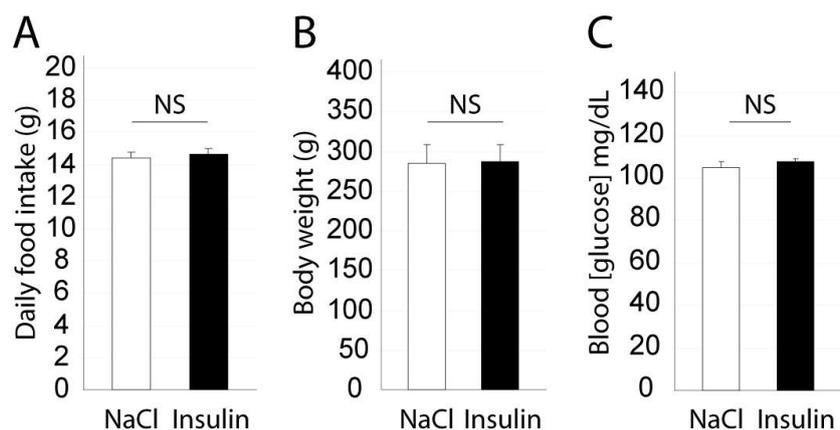


Figure 2: Acute insulin ICV injection does not alter food intake, body weight or peripheral blood glucose level. Bar graphs represent daily food intake (A) and daily body weight (B) (mean ± SEM) measured on NaCl ICV injection days (NaCl) and 14mU insulin ICV injection days (Insulin). Means were not statistically different (ANOVA $\alpha=0,05$ NS). (C) Bar graphs represent peripheral blood glucose level (mean ± SEM) measured from tail blood sample 1h after NaCl ICV injection (NaCl) and 1h after 14mU insulin ICV injection (Insulin). Means were not statistically different (paired Wilcoxon rank-sum test $\alpha=0.05$ NS).

ICV insulin injection significantly decreases olfactory detection for a neutral odor

In order to test whether olfactory sensitivity was modulated by ICV insulin injection, fasted rats were given the choice between pure-water and odorized-water at lower ISO dilutions, ISO 10^{-9} and ISO 10^{-8} . OD indexes were measured 1h after 14mU insulin ICV injection and 1h after NaCl ICV injection (Fig 1C). A repeated measures ANOVA with odour (ISO 10^{-9} and ISO 10^{-8}) and ICV treatment (insulin and NaCl) as factors demonstrated a significant effect of the odour and indicating, as expected, that OD indexes were higher for ISO 10^{-8} compared to ISO 10^{-9} ($F_{(1,17)} = 15.2$, $p < 0.01$). Importantly, a strong and significant effect of ICV treatment was also found: 14 mU insulin ICV injection significantly decreases OD index for both ISO 10^{-9} (NaCl: $61.81 \pm 4.88\%$, Insulin: 42.74 ± 4.09) and ISO 10^{-8} (NaCl: 74.38 ± 3.79 , Insulin: 60.83 ± 4.74) compared to ICV injection of NaCl ($F_{(1,17)} = 16.9$, $p < 0.001$) and this effect was independent of odor effect ($F_{(1,17)} = 0.375$, $p > 0.5$).

Insulin ICV injection does not alter locomotor activity

We determined the effect of insulin on locomotor activity in the behavioural device, by comparing the mean number of changes of side from the pure water tube to the ISO

odorized water tube during the experimental sessions 1h after 14mU ICV injection and 1h after NaCl ICV injection (Fig. 1D). A repeated measures ANOVA with odour (ISO 10⁻⁹ and ISO 10⁻⁸) and ICV treatment (insulin and NaCl) as factors demonstrated no significant effect of odour ($F_{(1,17)} = 0.074$, $p > 0.7$), no significant effect of ICV treatment ($F_{(1,17)} = 0.411$, $p > 0.5$) and no interaction ($F_{(1,17)} = 0.945$, $p > 0.3$) on the mean number of changes of side (ISO 10⁻⁹, ICV NaCl: 5.45 ± 0.67 ; ISO 10⁻⁹, ICV insulin: 5.3 ± 0.63 ; ISO 10⁻⁸, ICV NaCl: 4.84 ± 0.59 ; ISO 10⁻⁸, ICV insulin: 5.42 ± 0.72), indicating that our behavioral results were not biased by changes in locomotor activity.

Insulin ICV injection does not alter food intake, body weight or peripheral blood glucose level

Olfactory processing is modulated by the feeding state and insulin induced-hypoglycaemia (Pager et al., 1972; Pager, 1974; Cain, 1975; Chaput and Holley, 1976; Apelbaum and Chaput, 2003; Aime et al., 2007; Prud'homme et al., 2009) and central insulin administration is well-known to decrease food intake and body weight (Woods et al., 1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman and Oomura, 1986; Plata-Salaman et al., 1986; Air et al., 2002). Therefore, we wanted to address whether our ICV insulin injection protocol could alter energy homeostasis regulation. We measured and compared food intake and body weight on 14mU insulin treatment days and NaCl treatment days (fig. 2A,B). A repeated measures ANOVA indicated that daily food intake was not statistically different on insulin ICV injection days ($14.70 \pm 0.31\text{g}$) compared to NaCl injection days ($14.43 \pm 0.35\text{g}$) ($F_{(1,17)} = 1.664$, $p > 0.2$). Moreover, body weight was not statistically different on insulin ICV injection days ($286.28 \pm 3.76\text{g}$) compared to NaCl injection days ($285.40 \pm 3.70\text{g}$) ($F_{(1,17)} = 3.929$, $p > 0.05$).

Furthermore, to test the influence of 14mU insulin ICV injections on peripheral blood glucose level, glycaemia was measured on tail blood samples (fig. 2C). No significant differences in blood glucose level were revealed 1h after a 14mU ICV injection (107.41 ± 1.53 mg/dL compared to 1h after NaCl ICV injection (105.23 ± 2.22 mg/dl) (paired Wilcoxon rank-sum test, $\alpha = 0.05$, n.s.).

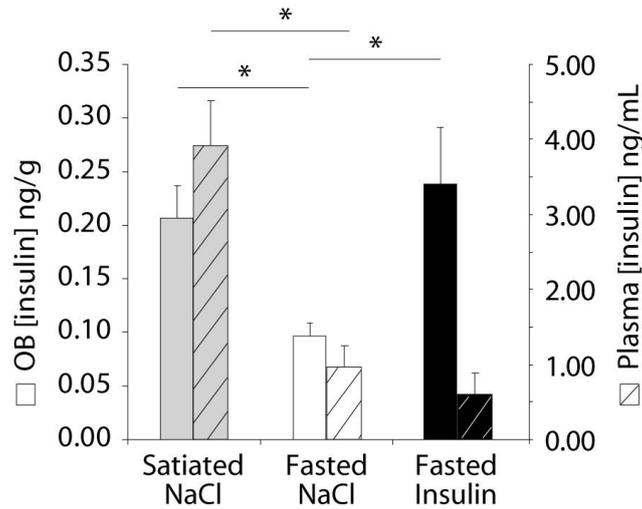


Figure 3: Nutritional status and 14mU insulin ICV injection effects on blood and OB insulin levels. Bar graphs represent insulin concentrations (mean ± SEM) in olfactory bulb (OB, full bars, left scale) and plasma (hatched bars, right scale) of fasted (fasted) and satiated (satiated) animals 1h after NaCl ICV injection (NaCl) or 1h after 14mU insulin ICV injection (Insulin). Mean OB and plasma insulin levels were statistically different in satiated compared with fasted animals, and mean OB insulin levels were statistically different in fasted animals receiving 14mU ICV insulin compared with fasted animals receiving NaCl ICV (Wilcoxon rank-sum test, * $p < 0.01$).

Nutritional status and insulin ICV injection modulate OB insulin level

We next wanted to examine the influence of the feeding state and 14mU insulin ICV injections on OB and plasma insulin levels (Fig. 3). In control animals injected with NaCl, plasma and OB insulin levels were modulated in the same way by fasting and satiety. OB (0.21 ± 0.03 ng/g) and plasma (3.91 ± 0.60 ng/mL) insulin levels of NaCl satiated rats were significantly higher than OB (0.10 ± 0.01 ng/g, Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.01$) and plasma (0.96 ± 0.29 ng/mL, Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.005$) insulin levels of NaCl fasted animals. Plasma insulin levels of fasted rats receiving a 14mU insulin ICV injection were not significantly different with respect to NaCl fasted animals (Wilcoxon rank-sum test, $\alpha = 0.05$, n.s.). In contrast, the OB insulin level of fasted rats injected with 14 mU of insulin (0.24 ± 0.05 ng/g) was significantly higher than that of fasted rats injected with NaCl (0.10 ± 0.01 ng/g, Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.01$) and there was no significant difference between OB insulin level of fasted rats injected with 14 mU insulin and OB insulin level of NaCl satiated control rats (Wilcoxon rank-sum test, $\alpha = 0.05$, n.s.). These results indicate that the 14mU ICV injection protocol used during our behavioural test selectively increases OB insulin level, thus mimicking the physiological satiated state, without affecting peripheral blood insulin level.

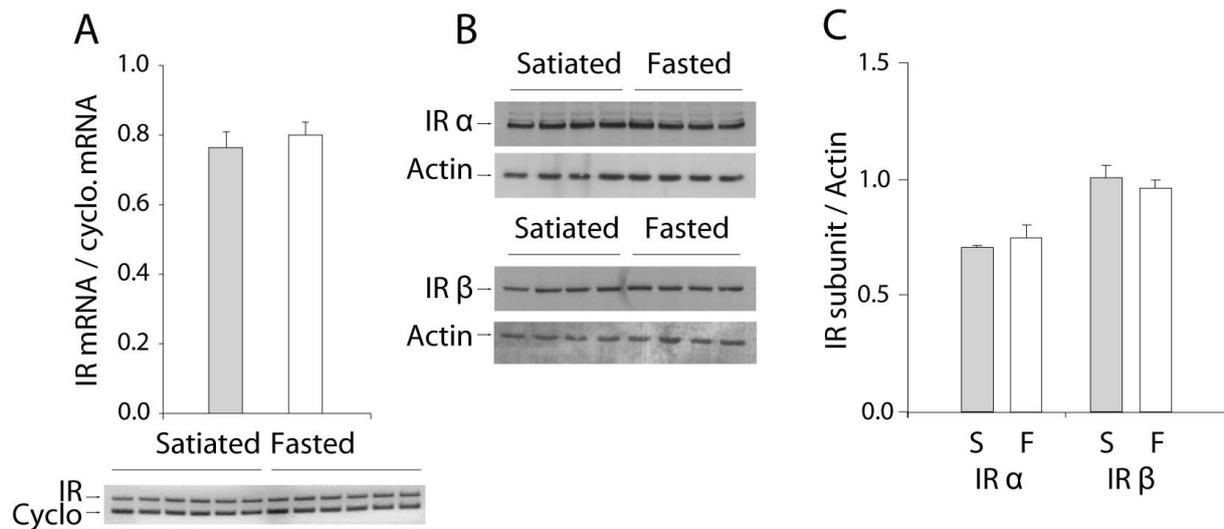


Figure 4: IR mRNA and protein levels in the OB are not modulated by nutritional states. (A) Bar graphs (top) represent the relative abundance of IR mRNA in the OB of satiated (grey bar, satiated) and fasted rats (white bar, fasted) determined by semi-quantitative RT-PCR and using cyclophilin mRNA for normalization (mean \pm SEM). Corresponding blot (bottom). Representative western blots (B) and quantitative densitometric histograms (C) of IR protein levels in the OB of satiated (grey bar, S) and fasted rats (white bar, F) (mean \pm SEM). Bar graphs represent ratios of IR subunit (alpha, IR α and beta, IR β) protein levels after normalization against actin. Means were not statistically different (paired Wilcoxon rank-sum test $\alpha=0.05$).

Nutritional status does not modulate IR mRNA and protein levels in the OB

We next wanted to examine the influence of the feeding state on OB IR content (Fig. 4). Semi-quantitative analysis of IR gene expression showed no significant difference between fasted and satiated states (Fig. 4A: satiated, 0.76 ± 0.05 ; fasted, 0.80 ± 0.04 ; Wilcoxon rank-sum test, $\alpha=0.05$, n.s.). Furthermore, western blot analysis of IR α and β subunits protein levels did not reveal any difference in IR protein content between nutritional states (Fig. 4B,C: IR α satiated, 0.71 ± 0.01 ; IR α fasted, 0.76 ± 0.05 ; IR β satiated, 1.01 ± 0.05 ; IR β fasted, 0.96 ± 0.03 ; Wilcoxon rank-sum test, $\alpha=0.05$, n.s.).

IR localization and quantification in the main OB

The OB is one of the brain regions containing the highest level of IR (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990). Using immunofluorescent densitometric signal, we quantified and studied the regionalization of IRs in the OB network of adult fasted or satiated rats (Fig. 5). To validate the specificity of the IR immunostaining, we selected a

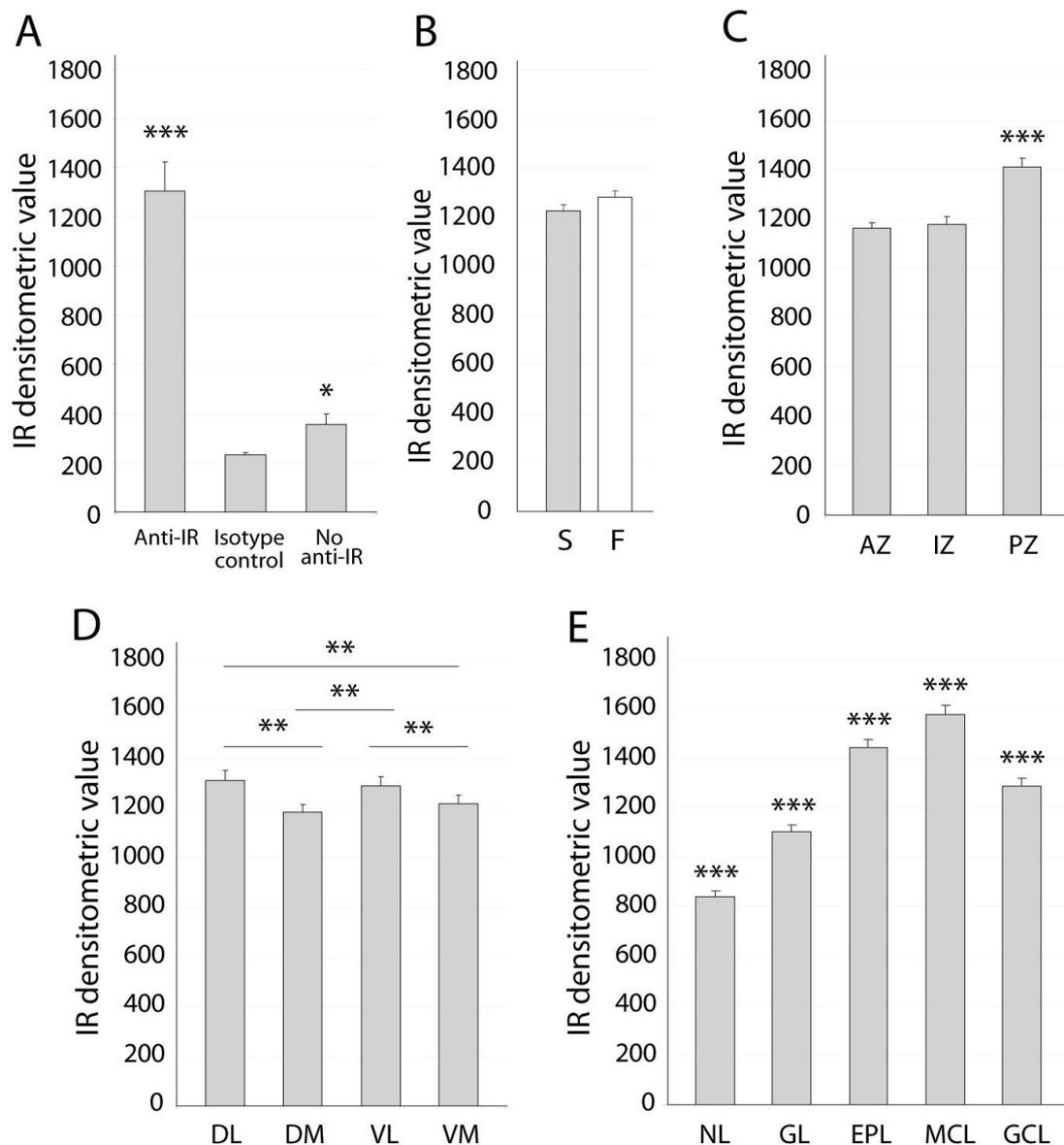


Figure 5: IR quantification in the main OB. Bar graphs represent an arbitrary unit of the IR densitometric value obtained by quantification of IR-Cy3 immunofluorescent signal on OB fresh-frozen sections (mean \pm SEM). **(A)** Specificity of the IR β antibody. Mean densitometric values were compared when immunohistochemistry procedure was completed with monoclonal mouse antibody directed against the β -subunit of the IR (anti-IR), with mouse IgG1 for isotype control (isotype control) and with omission of the primary antibody (no anti-IR). Mean densitometric value obtained with anti-IR was statistically different from mean densitometric value obtained with isotype control (Student t-test ***p<0.0001) or no anti-IR (Student t-test ***p<0.0001). Mean densitometric value obtained with isotype control was statistically different from mean densitometric value obtained with no anti-IR (Student t-test *p<0.05). **(B)** Mean IR densitometric values on OB sections of fasted (F) and satiated (S) animals were not statistically different (ANOVA $\alpha=0,05$ NS). **(C)** Mean IR densitometric values measured on OB sections from the rostral anterior zone (AZ), the intermediate zone (IZ) and the caudal posterior zone (PZ). Mean IR densitometric value was statistically different in the posterior zone (ANOVA ***p<0.0001). **(D)** Mean IR densitometric values measured in the dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), ventrolateral (VL) and ventromedial (VM) regions of the main OB (ANOVA **p<0.001). **(E)** Mean IR densitometric values measured in the nerve layer (NL), glomerular layer (GL), external plexiform layer (EPL) mitral cells layer (MCL) and granular cells layer (GCL) of the main OB were all statistically different from each other (ANOVA *** p<0.0001).

random set of 24 OB sections and assigned them to three different immunohistochemistry procedures: i) with mouse anti-IR β primary antibody ii) with an irrelevant antibody (mouse IgG1) for isotype control iii) with omission of the primary antibody (Fig. 5A). The mean densitometric value obtained when using anti-IR β primary antibody (1306.07 ± 117.12) was significantly higher than the mean densitometric value obtained when using either isotype control (232.22 ± 9.53 , Student t-test $p < 0.0001$) or no primary antibody (356.52 ± 38.90 , Student t-test $p < 0.0001$). Additionally, omission of the primary antibody brought significantly more background than the isotype control procedure (Student t-test $p < 0.05$).

A repeated-measures ANOVA on densitometric values with feeding state, OB zone, region and layer as factors revealed a significant interaction of zone ($F_{(2,16)} = 22.41$, $p < 0.0001$), region ($F_{(3,24)} = 8.30$, $p < 0.001$) and layer ($F_{(4,32)} = 183.37$, $p < 0.0001$). However, consistent with the western blot analysis of IR protein levels, there was no significant effect of the feeding state on the mean OB densitometric value (satiated = 1223.57 ± 56.24 ; fasted = 1280.62 ± 24.45 ; $F_{(1,8)} = 0.076$, $p > 0.7$, Fig. 5B). The SNK post-hoc test revealed that the posterior zone had a significantly higher mean densitometric value (1412.64 ± 34.61) than the two other zones (anterior, 1164.42 ± 22.66 ; intermediate, 1179.23 ± 31.70), whereas the latter were not significantly different from each other (Fig. 5C). Furthermore, the dorsolateral region (1314.59 ± 37.55) and the ventrolateral region (1290.19 ± 39.72) had a greater mean densitometric value than the dorsomedial (1185.52 ± 30.39) and the ventromedial (1218.09 ± 34.61) regions (Fig. 5D). Finally, the mean densitometric value of each layer of the OB was significantly different from the mean densitometric values of all the other layers (Fig. 5E). The mitral cells layer showed the highest densitometric value (1577.54 ± 40.18), whereas the nerve layer displayed the lowest densitometric value (841.69 ± 24.78). In between, the external plexiform layer (1446.06 ± 33.91), the granular cell layer (1288.91 ± 34.23) and the glomerular layer (1106.28 ± 24.41) demonstrated intermediate decreasing mean densitometric values.

Representative images of IR immunostaining among the OB layers are presented in Fig. 6.

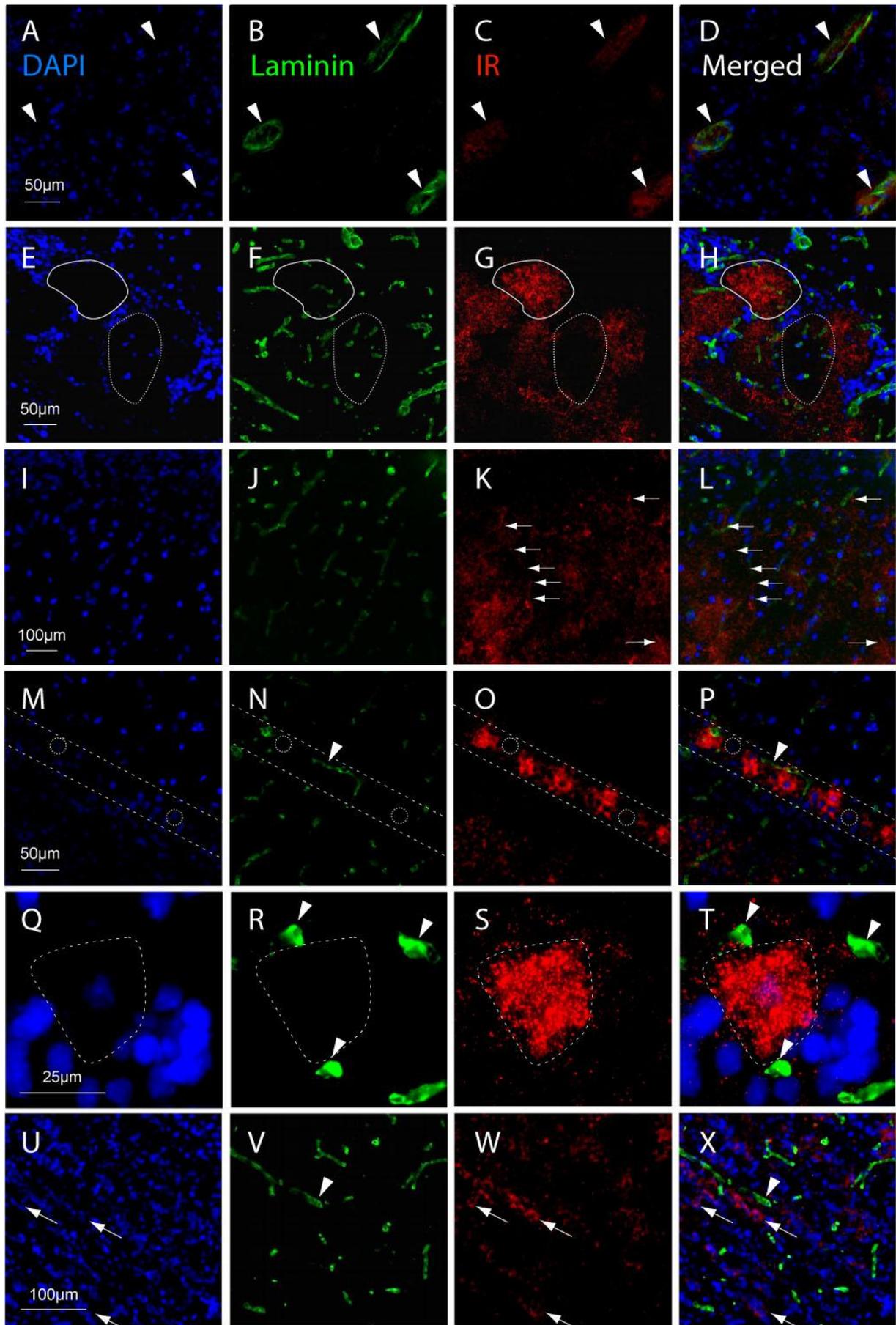


Figure 6: IR localization in the main OB layers. Representative images of frontal sections (14 μ m) of the main OB of adult rats stained with the nuclear marker DAPI (A,E,I,M,Q,U) and with double immunostaining of laminin (B,F, J, N, R, V) and IR (C,G,K,O,S,W). Signals were visualized on a epifluorescence microscope using sequential channel scanning with a merged overlay (D,H,L,P,T,X). In the nerve layer (A-D), IR β immunostaining is restricted to the endothelium of blood vessels (white arrowheads). In the glomerular layer (E-H), IR β immunostaining is restricted to the glomerulus neuropile (full line). Some glomeruli are not labelled (dotted line). In the external plexiform layer (I-K), a punctiform IR β immunostaining is scattered on labelled fibers (arrow). In the mitral cells layer, (M-P), between the dotted lines, IR β immunostaining is present in most cell bodies, although some mitral cells are not labelled (dotted circle). Labelled cell bodies are consistently surrounded by blood microvessels (arrowhead). (Q-T) Enlargement of a mitral cell body (dotted line) surrounded by 3 blood microvessels (arrowheads). In the granular cells layer (U-X), IR β immunostaining is located in clusters of labelled granular cell bodies (arrows). Labelled clusters are often located close to blood microvessel (arrowhead).

To analyse the relationship between the IR localization and the OB microvasculature, double labelling of laminin and IR β were performed on the same sections. In the nerve layer (fig. 6, A-D), IR immunoreactivity was weak and restricted to the endothelium of OB large blood vessels. In the glomerular layer (Fig. 6, E-H), IR immunoreactivity was independent of the rich microvasculature irrigating each glomerulus and was restricted to the glomerulus neuropile. However, some glomeruli were not labelled and the soma of periglomerular cells surrounding each glomerulus did not present any IR signal. A strong and diffused IR immunoreactivity was observed in the external plexiform layer (Fig. 6, I-K). IR immunoreactivity was independent of the microvasculature and some scattered labelled fibers either crossing the external plexiform layer, close to the mitral cells layer or at the entrance of the glomeruli were observed. In the mitral cells layer (Fig. 6, M-T), most cell bodies were intensively labelled although some mitral cells presented no immunoreactivity. Interestingly, labelled mitral cells were consistently surrounded by microvessels. In the granular cell layer (Fig. 6, U-X), IR immunoreactivity was patterned in clusters of labelled granular cell bodies. Some clusters presented no immunoreactivity. Labelled granular cell clusters were consistently located close to an OB microvessel.

Discussion

The present study provides new information on the role of insulin on olfactory processing at the level of the OB. We demonstrated that insulin ICV injection in fasted adult rats selectively decreased olfactory detection for a neutral odor. This effect was not biased by changes in locomotor activity or alteration of COA memory. Furthermore, insulin ICV injection in fasted rats increased OB insulin level to the physiological OB insulin level found

in satiated rats, without affecting peripheral insulin or blood glucose level, daily food intake and body weight. Moreover, we reported a regionalization of IRs in the OB network. Altogether, these data indicate that insulin may modulate olfactory information processing in the OB to decrease olfactory sensitivity.

Consistent with our results, a growing body of evidences indicates that insulin takes part in the modulation of olfactory processing. In the olfactory epithelium, IRs are expressed by olfactory sensory neurons and sustentacular cells (Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009); and insulin decreases olfactory sensory neurons evoked-response to neutral odors (Lacroix et al., 2008; Savigner et al., 2009). In the OB, several behavioural and functional results indicate a role for insulin on olfactory function. The voltage-dependent potassium channel Kv1.3 is a downstream target of the IR kinase activity (Bowlby et al., 1997). Kv1.3 channels are highly expressed in the OB and insulin application phosphorylates Kv1.3 and modulates Kv1.3 current magnitude on OB cultured neurons (Fadool and Levitan, 1998; Fadool et al., 2000). Interestingly, mice with Kv1.3 gene-targeted deletion (Kv1.3 $-/-$) have a « supersmeller » phenotype, with better olfactory detection and discrimination than their wild-type littermates (Fadool et al., 2004). However, Kv1.3 $-/-$ mice develop an abnormal low number of olfactory sensory neurons, abnormal axonal projections to the OB, smaller OBs with numerous smaller glomeruli (Fadool et al., 2004; Biju et al., 2008), indicating that changes in olfactory acuity in Kv1.3 $-/-$ mice are more susceptible to rely on olfactory system developmental alterations. A recent study indicated that repeated intranasal insulin delivery in normal mice induces *in vivo* Kv1.3 phosphorylation and increases olfactory discrimination (Marks et al., 2009). However, no changes on olfactory detection threshold were reported. By contrast, we demonstrated here that insulin ICV injection selectively decreases olfactory detection. This discrepancy might rely on the insulin amount reaching the OB following either intranasal (Marks et al., 2009) or ICV (present study) insulin administrations. Based on our ELISA measurements and the estimation of intranasal delivery method's efficiency reported by Marks et al., it appears that the amount of insulin that effectively reaches the OB following a 14 mU insulin ICV injection is ~10 times higher than using the intranasal delivery route. Importantly, the 14mU dose used in our experimental paradigm remains within the physiological range by increasing the OB insulin level of fasted rat to the OB insulin level of physiologically satiated rats. Indeed, we showed that the feeding state modulates OB insulin

content: OB insulin level was higher in satiated than in fasted rats, and this effect was correlated with the increase in plasma insulin level, suggesting that OB is highly sensitive to fluctuations of circulating insulin levels. This result is consistent with the general agreement that most insulin entering the brain is produced by the pancreas and transported across brain capillaries by a receptor-mediated saturable transport (Schwartz et al., 1990; Schwartz et al., 1992; Banks et al., 1997; Woods et al., 2003; Banks, 2004). The rate of insulin entrance into the brain is regulated by several physiological factors including nutritional status (Strubbe et al., 1988; Woods et al., 2003). When animals are fasted, the ability of insulin to cross the blood-brain barrier is reduced, leading to a positive correlation between blood and cerebro-spinal fluid insulin levels (Woods and Porte, 1977). In the present study, a 14mU insulin injection in the lateral ventricle effectively modulated olfactory sensitivity but had no effect on food consumption or body weight, although many reports have indicated that central insulin administration decreases food intake (Woods et al., 1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman and Oomura, 1986; Plata-Salaman et al., 1986; Air et al., 2002). First, we made acute injections into the lateral ventricle to preferentially target the OB, whereas in most reports, insulin is injected chronically into the third ventricle surrounded by the hypothalamus. Second, our animals were submitted to a chronic food-restriction schedule and insulin does not modulate food intake in food-deprived animals (Plata-Salaman and Oomura, 1986; Jaillard et al., 2009)

IRs are expressed in several olfactory brain regions including anterior olfactory nucleus, piriform cortex, olfactory tubercle and OB, which has been consistently reported as being the brain region containing the highest level of IRs (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990). A previous work suggested that OB insulin binding was modulated by feeding state and reduced by chronic fast (Marks and Eastman, 1989). By contrast, we demonstrated here that IR level is not modulated by the feeding state. This result is consistent with a previous report indicating that, in brain regions involved in energy homeostasis regulation, nutrient availability does not modulate IR levels (Clegg et al., 2005). We found that the mitral cells layer presented the highest density of IR, followed by the external plexiform, the granular cell and the glomerular cell layers. Among the various neurons of the OB network, IR was abundantly expressed in mitral cell and granular cell bodies, whereas no staining was observed in periglomerular cell bodies. The localization of

mitral and granular cells expressing IRs close to blood vessels rendered them particularly sensitive to plasma insulin level fluctuations. Mitral cells are OB projection neurons and granular cells are gabaergic interneurons known to modulate mitral cells activity through dendrodendritic synapses in the external plexiform layer (Price and Powell, 1970a, b, c; Jahr and Nicoll, 1980, 1982; Mugnaini et al., 1984; Trombley and Shepherd, 1992; Isaacson and Strowbridge, 1998; Sassoe-Pognetto and Ottersen, 2000). Indeed, IRs were found in the external plexiform layer, where dendrodendritic synapses have been demonstrated to be major insulin-receptive sites (Matsumoto and Rhoads, 1990). IRs were also found in some glomerular neuropils, a OB functional unit receiving direct excitatory glutamatergic inputs from olfactory sensory neurons and specific inhibitory input by periglomerular gabaergic interneurons (Pinching and Powell, 1971a, b, c; Mugnaini et al., 1984; Didier et al., 1994; Nickell et al., 1994; Ennis et al., 1996; Giustetto et al., 1997; Bonino et al., 1999; Aroniadou-Anderjaska et al., 2000; Palouzier-Paulignan et al., 2002; Wachowiak and Shipley, 2006). The whole of these data indicate that insulin activity in the main projection neurons, in interneurons and in synaptic contacts layers may participate in the modulation of synaptic transmission of odor-related stimuli. Our quantitative immunofluorescence procedure demonstrated for the first time a regionalization of the OB IRs along the rostro-caudal and latero-medial axes of the OB. Indeed, the posterior and lateral regions of the main OB presented the highest amount of IRs. Several recent studies have reported that the mammalian OB exhibits a spatial organization of odor maps in relation to the molecular features of odorants (Mori, 2003; Mori et al., 2006; Johnson et al., 2007) and the olfactory stimulation routes (Scott et al., 2007). Thus, OB posterior and lateral parts are preferentially activated by odorants with high water solubility and by retronasal presentations of odorants (Johnson et al., 2007; Scott et al., 2007). During food consumption, because of warming and mastication (Burdach et al., 1984), the odorant concentration reaching the nasal cavity through retronasal stimulation is much higher than through orthonasal stimulation. In Humans, retronasal olfactory stimulation influences satiation and takes part in food intake behaviours (Ruijschop et al., 2009a; Ruijschop et al., 2009b; Ruijschop et al., 2010). Therefore we suggest that the high amount of IRs in posterior and lateral regions of the OB is directly linked to food intake-related odor processing.

We recently reported that fasting increases olfactory detection whereas satiation decreases olfactory detection (Aime et al., 2007) and leptin ICV injection decreases olfactory detection (Julliard et al., 2007). Leptin and insulin are adiposity signals that are released in direct proportion to body fat (Polonsky et al., 1988; Considine et al., 1996). Leptin and insulin are both able to cross the blood brain barrier to reach the central nervous system (Frank et al., 1986; Duffy and Pardridge, 1987; Schwartz et al., 1990; Banks et al., 1996; Banks et al., 1997; Kastin et al., 1999; Kastin and Akerstrom, 2000) and act on their respective hypothalamic receptors to decrease food intake and body weight (Woods et al., 1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman and Oomura, 1986; Plata-Salaman et al., 1986; Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995; Air et al., 2002). Central insulin and leptin also decrease olfactory sensitivity, indicating that in addition to their classically described roles in energy homeostasis regulation, adiposity signals reach the brain to act on receptors located on the olfactory system (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990; Shioda et al., 1998; Fadool et al., 2000; Getchell et al., 2006; Baly et al., 2007; Marks et al., 2009; Prud'homme et al., 2009) to modulate food intake-related odor processing and influence feeding behaviors.

References

- Aime P, Duchamp-Viret P, Chaput MA, Savigner A, Mahfouz M, Julliard AK (2007) Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav Brain Res* 179:258-264.
- Air EL, Benoit SC, Blake Smith KA, Clegg DJ, Woods SC (2002) Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 72:423-429.
- Apelbaum AF, Chaput MA (2003) Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 28:389-395.
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT (2000) Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol* 84:1194-1203.
- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix MC, Durieux D, Schlegel C, Salesse R, Caillol M (2007) Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 1129:130-141.
- Banks WA (2004) The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 490:5-12.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18:1257-1262.
- Banks WA, Kastin AJ, Pan W (1999) Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* 20:373-378.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17:305-311.
- Baskin DG, Porte D, Jr., Guest K, Dorsa DM (1983) Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* 112:898-903.

- Biju KC, Marks DR, Mast TG, Fadool DA (2008) Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 506:161-179.
- Bonino M, Cantino D, Sassoe-Pognetto M (1999) Cellular and subcellular localization of gamma-aminobutyric acidB receptors in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 274:195-198.
- Bowlby MR, Fadool DA, Holmes TC, Levitan IB (1997) Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J Gen Physiol* 110:601-610.
- Brief DJ, Davis JD (1984) Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res Bull* 12:571-575.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Burdach KJ, Kroeze JH, Koster EP (1984) Nasal, retronasal, and gustatory perception: an experimental comparison. *Percept Psychophys* 36:205-208.
- Cain DP (1975) Effects of insulin injection on responses of olfactory bulb and amygdala single units to odors. *Brain Res* 99:69-83.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
- Chaput MA, Holley A (1976) Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chemical senses* 2:189-201.
- Clegg DJ, Benoit SC, Reed JA, Woods SC, Dunn-Meynell A, Levin BE (2005) Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R981-986.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295.
- Didier A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1994) Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *Neuroreport* 6:145-148.
- Duffy KR, Pardridge WM (1987) Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res* 420:32-38.
- Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT (1996) Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport* 7:989-992.
- Fadool DA, Levitan IB (1998) Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 18:6126-6137.
- Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA (2000) Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83:2332-2348.
- Fadool DA, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons AD, Overton JM, Koni PA, Flavell RA, Kaczmarek LK (2004) Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces "Super-Smeller Mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron* 41:389-404.
- Frank HJ, Pardridge WM, Morris WL, Rosenfeld RG, Choi TB (1986) Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabetes* 35:654-661.
- Getchell TV, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML (2006) Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 87:848-856.
- Giustetto M, Bovolín P, Fasolo A, Bonino M, Cantino D, Sassoe-Pognetto M (1997) Glutamate receptors in the olfactory bulb synaptic circuitry: heterogeneity and synaptic localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 and AMPA receptor subunit 1. *Neuroscience* 76:787-798.
- Haj-ali V, Mohaddes G, Babri SH (2009) Intracerebroventricular insulin improves spatial learning and memory in male Wistar rats. *Behav Neurosci* 123:1309-1314.

- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
- Henquin JC (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52:739-751.
- Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J (1986) Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17:1127-1138.
- Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749-761.
- Jahr CE, Nicoll RA (1980) Dendrodendritic inhibition: demonstration with intracellular recording. *Science* 207:1473-1475.
- Jahr CE, Nicoll RA (1982) An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol* 326:213-234.
- Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, Lorsignol A (2009) Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58:1544-1549.
- Johnson BA, Arguello S, Leon M (2007) Odorants with multiple oxygen-containing functional groups and other odorants with high water solubility preferentially activate posterior olfactory bulb glomeruli. *J Comp Neurol* 502:468-482.
- Julliard AK, Hartmann DJ (1998) Spatiotemporal patterns of expression of extracellular matrix molecules in the developing and adult rat olfactory system. *Neuroscience* 84:1135-1150.
- Julliard AK, Chaput MA, Apelbaum A, Aime P, Mahfouz M, Duchamp-Viret P (2007) Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav Brain Res* 183:123-129.
- Kastin AJ, Akerstrom V (2000) Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. *Peptides* 21:679-682.
- Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsberger P (1999) Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* 20:1449-1453.
- Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20:1176-1190.
- Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA (2009) Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:6734-6751.
- Marks JL, Eastman CJ (1989) Effect of starvation on insulin receptors in rat brain. *Neuroscience* 30:551-556.
- Marks JL, Porte D, Jr., Stahl WL, Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127:3234-3236.
- Matsumoto H, Rhoads DE (1990) Specific binding of insulin to membranes from dendrodendritic synaptosomes of rat olfactory bulb. *J Neurochem* 54:347-350.
- Mori K (2003) Grouping of odorant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb. *Biochem Soc Trans* 31:134-136.
- Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M (2006) Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 86:409-433.
- Mugnaini E, Oertel WH, Wouterlood FF (1984) Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett* 47:221-226.
- Nickell WT, Behbehani MM, Shipley MT (1994) Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Res Bull* 35:119-123.

- Pager J (1974) A selective modulation of the olfactory bulb electrical activity in relation to the learning of palatability in hungry and satiated rats. *Physiol Behav* 12:189-195.
- Pager J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J (1972) A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 9:573-579.
- Palouzier-Paulignan B, Duchamp-Viret P, Hardy AB, Duchamp A (2002) GABA(B) receptor-mediated inhibition of mitral/tufted cell activity in the rat olfactory bulb: a whole-cell patch-clamp study in vitro. *Neuroscience* 111:241-250.
- Park CR (2001) Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:311-323.
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 68:509-514.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
- Pinching AJ, Powell TP (1971a) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305-345.
- Pinching AJ, Powell TP (1971b) The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:379-409.
- Pinching AJ, Powell TP (1971c) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:347-377.
- Plata-Salaman CR, Oomura Y (1986) Effect of intra-third ventricular administration of insulin on food intake after food deprivation. *Physiol Behav* 37:735-739.
- Plata-Salaman CR, Oomura Y, Shimizu N (1986) Dependence of food intake on acute and chronic ventricular administration of insulin. *Physiol Behav* 37:717-734.
- Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E (1988) Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81:442-448.
- Price JL, Powell TP (1970a) The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:125-155.
- Price JL, Powell TP (1970b) The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:91-123.
- Price JL, Powell TP (1970c) The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:631-651.
- Prud'homme MJ, Lacroix MC, Badonnel K, Gougis S, Baly C, Salesse R, Caillol M (2009) Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience* 162:1287-1298.
- Ruijschop RM, Boelrijk AE, de Graaf C, Westerterp-Plantenga MS (2009a) Retronasal aroma release and satiation: a review. *J Agric Food Chem* 57:9888-9894.
- Ruijschop RM, Burgering MJ, Jacobs MA, Boelrijk AE (2009b) Retro-nasal aroma release depends on both subject and product differences: a link to food intake regulation? *Chem Senses* 34:395-403.
- Ruijschop RM, Boelrijk AE, Burgering MJ, de Graaf C, Westerterp-Plantenga MS (2010) Acute effects of complexity in aroma composition on satiation and food intake. *Chem Senses* 35:91-100.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Sassoe-Pognetto M, Ottersen OP (2000) Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 20:2192-2201.
- Savigner A, Duchamp-Viret P, Grosmaître X, Chaput M, Garcia S, Ma M, Palouzier-Paulignan B (2009) Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J Neurophysiol* 101:2898-2906.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr. (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414.
- Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ, Jr., Bergman RN, Woods SC, Porte D, Jr. (1990) Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 259:E378-383.

- Schwarzberg H, Bernstein HG, Reiser M, Gunther O (1989) Intracerebroventricular administration of insulin attenuates retrieval of a passive avoidance response in rats. *Neuropeptides* 13:79-81.
- Scott JW, Acevedo HP, Sherrill L, Phan M (2007) Responses of the rat olfactory epithelium to retronasal air flow. *J Neurophysiol* 97:1941-1950.
- Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y (1998) Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243:41-44.
- Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC (1997) What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Animal Learning & Behaviour* 25:357-369.
- Strubbe JH, Porte D, Jr., Woods SC (1988) Insulin responses and glucose levels in plasma and cerebrospinal fluid during fasting and refeeding in the rat. *Physiol Behav* 44:205-208.
- Trombley PQ, Shepherd GM (1992) Noradrenergic inhibition of synaptic transmission between mitral and granule cells in mammalian olfactory bulb cultures. *J Neurosci* 12:3985-3991.
- Unger J, McNeill TH, Moxley RT, 3rd, White M, Moss A, Livingston JN (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31:143-157.
- Wachowiak M, Shipley MT (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411-423.
- Woods SC, Porte D, Jr. (1977) Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *Am J Physiol* 233:E331-334.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW (2003) Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 9:795-800.

Discussion générale

La discussion de l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse sera scindée en trois parties principales. À l'issue d'une synthèse des principaux résultats expérimentaux, nous examinerons certains aspects méthodologiques associés à nos protocoles expérimentaux. Enfin, nous discuterons l'apport de nos résultats dans la compréhension de la modulation de la perception olfactive par les états alimentaires et métaboliques et nous en dégagerons un modèle fonctionnel illustrant les mécanismes et les implications d'une telle modulation sur la régulation des comportements alimentaires en conditions physiologiques et pathologiques.

1) Résumé des principaux résultats expérimentaux

Les résultats expérimentaux présentés dans ce travail de thèse étendent les connaissances actuellement acquises sur les interactions entre la perception olfactive et le système de régulation de l'homéostasie énergétique.

La première étude chez le rat a été conduite afin de valider notre paradigme comportemental, basé sur une aversion olfactive conditionnée, pour l'étude des capacités de détection olfactive des rongeurs (Aime et al., 2007). La première expérience, menée chez des animaux nourris *ad libitum* a démontré que les performances de détection olfactive des animaux dans le test comportemental évoluent en fonction de la concentration de boisson odorisée proposée. En effet, lorsque les animaux sont rendus aversifs à une certaine concentration d'odeur, ils sont capables de transférer cette aversion aux plus faibles concentrations, dans la mesure de leur capacité de détection olfactive. Ainsi, l'évolution des proportions de consommation d'eau et de boisson odorisée pour diverses concentrations, donne une mesure fidèle des capacités de détection olfactive des animaux. De plus, cette première expérience nous a permis d'observer que la répétition d'une même concentration d'odeur ne modifiait pas les résultats de détection olfactive, démontrant ainsi l'absence de biais d'habituation ou d'apprentissage lors de présentations successives d'une même stimulation odorante. Ce résultat est particulièrement important, étant donné que les études conduites par la suite ont toutes reposé sur la comparaison de la capacité de détection d'une odeur présentée successivement pour deux conditions expérimentales: en état de faim *versus*

en état de rassasiement, pour l'administration d'une hormone ou d'un neuropeptide *versus* leurs véhicules. La deuxième expérience, menée afin de comparer les capacités de détection olfactive d'odeurs présentées aux mêmes animaux affamés puis rassasiés, a permis de mettre en évidence une modulation très nette de la capacité de détection olfactive par les états alimentaires : les animaux affamés présentent une meilleure sensibilité olfactive que les animaux rassasiés. Ce résultat apporte pour la première fois une preuve expérimentale du fait intuitif selon lequel la perception olfactive est modulée par l'état alimentaire. Ce fait expérimental est un résultat particulièrement robuste, qui a été reproduit de nombreuses fois au cours de mes travaux de thèse, notamment pour d'autres souches (les rats Zucker) et une autre espèce (la souris).

Le résultat complémentaire démontrant une modulation de la sensibilité olfactive chez la souris, a confirmé et étendu le résultat obtenu chez le rat, en apportant, toutefois, une information supplémentaire. En effet, lors de notre première étude, la détection olfactive des rats était mesurée 1) le matin en l'état affamé et 2) le soir en l'état rassasié, au cours de la même journée. Or, les études chez l'Humain suggèrent que l'acuité olfactive subit des variations diurnes, indépendantes de l'état alimentaire (Koelega, 1994). Le protocole modifié pour la souris, nous a permis de comparer la capacité de détection olfactive des souris en réalisant nos mesures au même moment de la journée quelque soit l'état alimentaire. Ce protocole expérimental nous permet d'affirmer que les variations de l'acuité olfactive que nous mesurons sont bien le résultat de l'influence des états alimentaires, et ne sont pas majoritairement dépendantes d'éventuelles variations circadiennes de l'acuité olfactive.

La deuxième étude, réalisée avec les rats Zucker fa/fa, Zucker fa/+ et LouC, a révélé des différences fondamentales de la modulation de la perception olfactive pour des animaux présentant des métabolismes énergétiques extrêmes. Les rats obèses Zucker fa/fa présentent comme leurs témoins une modulation de la détection olfactive par les états alimentaires. Ces animaux semblent également présenter de meilleures performances olfactives et démontrent une détection plus rapide de l'odeur que leurs témoins non-obèses. Les rats résistants à l'obésité LouC ne présentent pas de modulation de la perception olfactive par les états alimentaires. De plus, ils possèdent de bien meilleures performances olfactives que leurs témoins et démontrent une détection plus rapide ainsi qu'une sensibilité olfactive accrue

pour l'ensemble des concentrations d'odeurs testées. Bien qu'ils s'agissent de données préliminaires, les performances olfactives des rats obèses et résistants à l'obésité mesurées en état de faim et en état de rassasiement, apportent une preuve supplémentaire de la modulation de la perception olfactive par le système de régulation de l'homéostasie énergétique. Toutefois, les mécanismes sous-tendant les différences d'acuité olfactive entre les animaux obèses et résistants à l'obésité, restent à être élucidés.

Les données de la littérature, alimentées par la mise en évidence des modulations de la perception olfactive par les états alimentaires et métaboliques au niveau comportemental, nous ont menés à étudier le rôle des hormones et des neuropeptides impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique sur les performances olfactives. Une troisième étude a donc été menée dans le but d'analyser le rôle de l'orexine A, un neuropeptide orexigène hypothalamique, et de la leptine, une hormone d'adiposité anorexigène, sur les capacités de détection olfactive des rats (Julliard et al., 2007). Il a ainsi été montré que l'administration centrale d'orexine A, en mimant un état de faim chez des animaux nourris *ad libitum*, induit une augmentation de la détection olfactive. À l'inverse, l'administration centrale de leptine, en mimant un état de rassasiement chez des animaux affamés, induit une diminution dose-dépendante de la détection olfactive.

Une quatrième et dernière étude a été conduite afin d'analyser l'action de l'insuline au niveau du bulbe olfactif et ainsi que son rôle dans la modulation de la détection olfactive, par les états alimentaires et métaboliques. Ainsi, nous avons démontré que l'administration centrale d'insuline chez des animaux affamés, induit une diminution de la détection olfactive. Cet effet sur la détection olfactive n'est pas biaisé par d'éventuels changements d'activité locomotrice ou de rétention de l'aversion olfactive conditionnée. De plus, nous avons montré que le taux d'insuline dans le bulbe olfactif est modulé par l'état alimentaire : il est augmenté en état de faim et diminué en état de rassasiement, corrélativement aux taux plasmatiques d'insuline. L'injection intracérébroventriculaire d'insuline utilisée lors du test comportemental, élève le taux d'insuline dans le bulbe olfactif des rats affamés au même niveau que le taux d'insuline mesuré dans le bulbe olfactif des rats physiologiquement rassasiés, sans altérer les taux plasmatiques d'insuline et de glucose et sans affecter la prise alimentaire, ni la masse corporelle. Nous avons également démontré que les récepteurs de

l'insuline étaient abondamment exprimés au sein du réseau bulbaire. Les récepteurs de l'insuline sont préférentiellement exprimés au niveau des cellules mitrales et granulaires situées à proximité des vaisseaux sanguins, ainsi qu'au niveau des zones riches en contacts synaptiques telles que la couche plexiforme externe et les neuropiles glomérulaires. Enfin, nous avons mis en évidence une régionalisation de la répartition des récepteurs de l'insuline qui semblent être préférentiellement localisés dans les régions postérieures et latérales du bulbe olfactif principal. Ces résultats indiquent que l'insuline, libérée en périphérie en fonction de l'état alimentaire et métabolique, est capable d'agir au niveau du réseau bulbaire pour moduler l'activité des neurones de projection et des interneurons gabaergiques, afin de modifier le traitement de l'information olfactive et conduire à une diminution de la sensibilité olfactive.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux démontre que les états alimentaires et métaboliques modulent la perception olfactive. De plus, il apparaît que les hormones et les neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique exercent cette modulation de deux manières. D'une part, les molécules orexigènes (comme l'orexine), libérées en état de faim ou de carence énergétique pour stimuler la prise alimentaire, augmentent les performances olfactives. D'autre part, les molécules anorexigènes (comme l'insuline ou la leptine), libérées en état de rassasiement ou d'abondance énergétique pour arrêter la prise alimentaire, diminuent les performances olfactives.

2) Considérations méthodologiques

2.1) Le protocole de restriction alimentaire et hydrique

Afin de synchroniser l'état alimentaire des animaux et de garantir une consommation de boisson suffisante lors des sessions expérimentales du test comportemental, les animaux ont été placés en restriction alimentaire et hydrique quotidienne. Notre protocole de restriction alimentaire impose aux animaux une période de privation d'une durée comprise entre 20 et 22h (en fonction des études), suivie d'un unique repas quotidien de 2 à 4h, au cours duquel les animaux peuvent se nourrir autant qu'ils le désirent. Les repas sont accompagnés de 10 à 15 ml de boisson. Par ailleurs, au cours des sessions expérimentales

quotidiennes, les animaux ont la possibilité satisfaire leurs besoins hydriques et ont accès à un total de 60 ml de boisson supplémentaires.

Plusieurs éléments ont été pris en considération pour limiter l'impact physiologique et comportemental d'un tel protocole de restriction alimentaire et hydrique. Les rongeurs sont des animaux nocturnes qui consomment la majorité de leurs repas en période d'obscurité (Rowland, 2007). Afin de respecter au mieux le cycle nycthemeral des rongeurs, nous avons pris soin de les placer en cycle inversé. Après une longue période d'acclimatation en condition *ad libitum*, les animaux ont été habitués à consommer leurs repas au milieu de leur phase nocturne. Par ailleurs, comme les épisodes de consommation de boisson sont généralement associés à la consommation de nourriture (Rowland, 2007), nous avons accompagné chaque repas d'un complément hydrique. De plus, afin de minimiser le stress induit par un changement brutal de disponibilité en eau et en nourriture, nous avons progressivement habitué nos animaux au protocole de restriction. Ainsi, les animaux nourris et abreuvé *ad libitum* ont tout d'abord été placés en restriction alimentaire seule, tout en conservant un accès illimité à l'eau de boisson. Après plusieurs jours d'acclimatation à ce régime, les animaux ont ensuite été placés en restriction alimentaire et hydrique. Au début de cette période, les rats disposent d'une grande quantité d'eau de boisson pour chaque repas consommé dans la cage d'élevage. Cette quantité est ensuite progressivement réduite, afin d'inciter les animaux à consommer de plus en plus d'eau dans la cage expérimentale.

Par ailleurs, dans le but d'évaluer les conséquences d'un tel protocole de restriction alimentaire sur l'état physiologique de nos animaux, la masse corporelle et la prise alimentaire ont été quotidiennement mesurées et contrôlées. Un exemple représentatif de l'évolution de ces paramètres lors de la mise en place du protocole de restriction, est présenté par la figure 24. Dans les conditions classiques d'élevage en laboratoire, un rat adulte nourri et abreuvé *ad libitum* consomme quotidiennement jusqu'à ~30 g de nourriture et ~45 ml de boisson (Rowland, 2007). Contraints par le protocole de restriction suivi lors de nos études comportementales, les animaux consomment en moyenne entre 15 et 20 g de nourriture et entre 20 et 25 ml d'eau par jour. Ce protocole entraîne donc les animaux à consommer 60% de leurs consommations journalières spontanées d'eau et de nourriture.

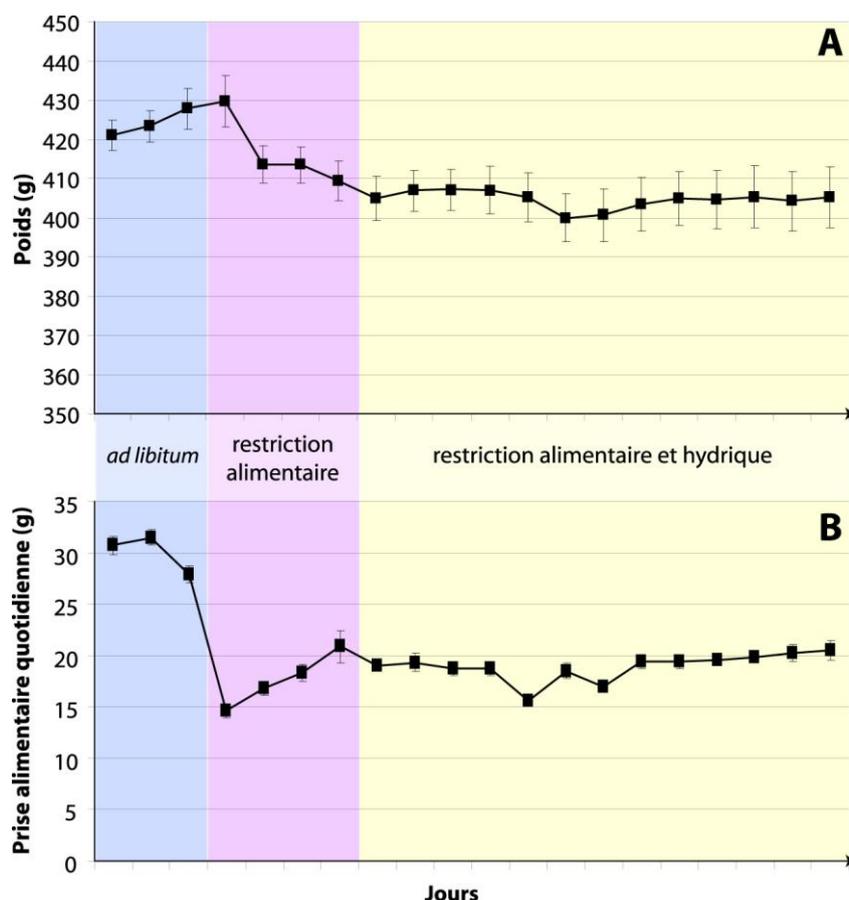


Figure 24 : Evolution du poids (A) et de la prise alimentaire (B) de rats Wistar adultes (n=10) placés successivement en conditions *ad libitum* puis en restriction alimentaire seule, et enfin en restriction alimentaire et hydrique, correspondant au protocole utilisé lors de la réalisation de nos études comportementales.

La zone bleue indique les valeurs moyennes de poids et de prise alimentaire obtenues lorsque les rats sont nourris et abreuvés *ad libitum* (*ad libitum*). La zone rose indique les valeurs moyennes de poids et de prise alimentaire obtenues lorsque les rats sont placés en restriction alimentaire de 22h par jour, tout en conservant un accès illimité à l'eau de boisson (restriction alimentaire). La zone jaune indique les valeurs moyennes de poids et de prise alimentaire obtenues lorsque les rats sont placés en restriction alimentaire de 22h par jour, avec un accès limité à l'eau de boisson (restriction alimentaire et hydrique). Dans cette dernière condition, les animaux ont accès à de l'eau de boisson pendant les sessions expérimentales et à chaque repas quotidien, accompagné de 10 à 15 ml d'eau.

L'accès limité à la nourriture s'accompagne inévitablement d'une réduction de la prise alimentaire et, en conséquence, de la masse corporelle. Cette chute de la masse corporelle apparaît dans les premiers jours de la restriction alimentaire puis se stabilise. Dans nos conditions expérimentales, les animaux parviennent à maintenir leur poids à un niveau d'équilibre qui se situe à ~95% de leur poids initial et ne démontrent aucune altération comportementale. Il est classiquement décrit dans la littérature que la déprivation hydrique induit une diminution de la prise alimentaire (Watts, 1999). Cette anorexie réversible est notamment sous-tendue par une augmentation de la synthèse du neuropeptide anorexigène

CRF au sein de l'hypothalamus latéral (Watts et al., 1999). En comparant la prise alimentaire mesurée lors de la période de restriction alimentaire seule et celle mesurée lors de la période de restriction alimentaire couplée à une restriction hydrique (figure 24), il apparaît que les consommations de nourriture restent sensiblement identiques, indiquant que l'anorexie induite par la deshydratation est très limitée dans nos conditions expérimentales.

2.2) La nature de la stimulation odorante

Le test comportemental que nous avons développé pour l'étude de la détection olfactive des rongeurs est basé sur la consommation d'une boisson odorisée à l'acétate d'isoamyle. Cette molécule odorante, un ester perçu comme une odeur de banane, est couramment utilisée dans le domaine de l'olfaction. L'acétate d'isoamyle est considéré comme une odeur *a priori* neutre, dégagee d'une quelconque valeur alimentaire pour les animaux. Elle est connue pour activer largement le réseau bulbaire chez le rat et la souris (Johnson et al., 1998; Johnson et al., 2009), (Figure 25).

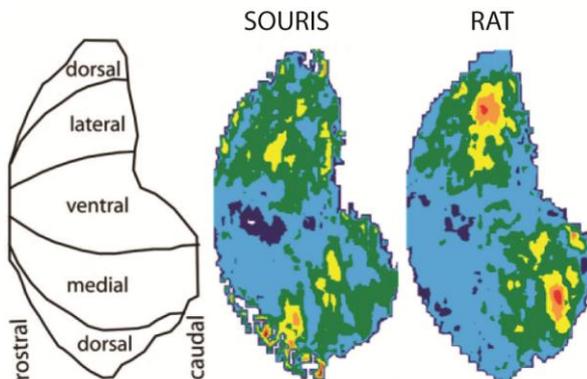


Figure 25 : Cartes d'activation glomérulaire obtenue pour une stimulation à l'acétate d'isoamyle chez la souris et le rat (D'après Johnson 2009)

Représentations, par un code couleur, du niveau d'accumulation du 2-déoxyglucose dans la couche glomérulaire du bulbe olfactif de rat et de souris obtenue par une stimulation odorante d'acétate d'isoamyle. Un diagramme de l'orientation anatomique des cartes glomérulaires est présenté sur la gauche.

De plus, cette odeur a été utilisée à de nombreuses reprises pour l'étude des interactions entre la perception olfactive et les états alimentaires. Il a notamment été démontré que la réponse des neurorécepteurs olfactifs évoquée par l'acétate d'isoamyle est diminuée par l'application d'insuline et que l'activité des cellules mitrales, en réponse à une stimulation par l'acétate d'isoamyle, est modulée par l'état alimentaire et l'application d'orexine A (Apelbaum and Chaput, 2003; Apelbaum et al., 2005; Prud'homme et al., 2009).

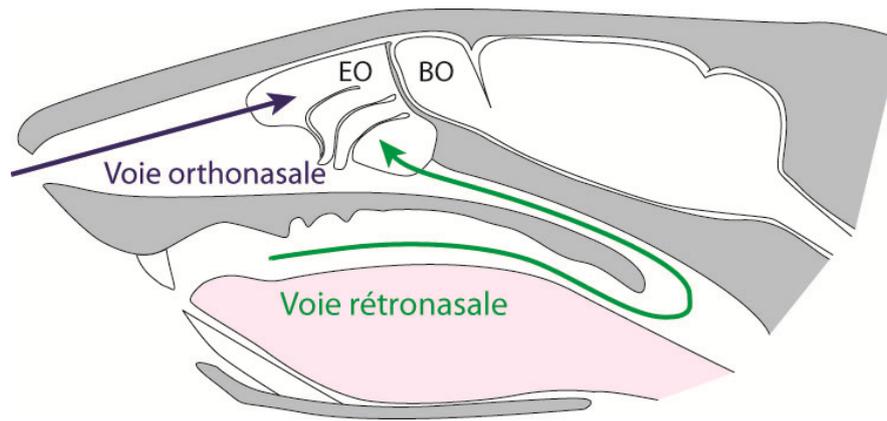


Figure 26 : Les voies olfactives orthonasale et rétronasale.

Schéma d'une coupe sagittale de tête de rat. La voie orthonasale correspond à l'entrée de molécules odorantes par les narines lors du flux d'air inspiratoire (en bleu). La voie rétronasale correspond à l'entrée de molécules odorantes situées dans la cavité buccale et portées par le flux d'air expiratoire pour atteindre l'épithélium olfactif. EO = Epithélium olfactif, BO = Bulbe olfactif.

Lors de nos expériences comportementales, l'acétate d'isoamyle était dilué dans l'eau de boisson. Il a été clairement établi que, pour une concentration inférieure à 0,1% (ISO 10^{-3}), une solution d'acétate d'isoamyle ne possède pas de propriété gustative et qu'elle est uniquement détectée par le système olfactif (Slotnick et al., 1997). Il existe deux types de stimulations olfactives : les stimulations olfactives orthonasales et les stimulations olfactives rétronasales (Figure 26). Lorsque que l'animal perçoit une odeur en suspension dans l'air, comme c'est le cas lorsque la stimulation est délivrée par un olfactomètre ou sur un support odorisé, la stimulation olfactive est orthonasale. Une telle stimulation est portée par le flux d'air inspiratoire lors du flairage de la source odorante. En revanche, lorsque l'animal consomme une boisson odorisée, la stimulation olfactive est principalement rétronasale et portée par le flux d'air expiratoire. Ce dernier mode de présentation de l'odeur permet de reproduire fidèlement la stimulation olfactive provoquée par la mastication et l'ingestion de nourriture et présente, de fait, un apport majeur pour l'étude de la variation de la perception olfactive en fonction des états alimentaires et métabolique. En outre, la stimulation odorante rétronasale, engendrée par la présentation d'une boisson odorisée, permet de générer une aversion olfactive conditionnée puissante et durable (Slotnick et al., 1997; Chapuis et al., 2007; Desgranges et al., 2009). Cette présentation de l'odeur constitue donc une stimulation pertinente pour la validité de notre paradigme comportemental. D'un point de vue

fonctionnel, il a été démontré que l'acétate d'isoamyle est capable de stimuler l'épithélium et le bulbe olfactif qu'elle soit présentée de manière orthonasale ou rétronasale (Scott et al., 2007). Toutefois, il apparaît que la réponse électrophysiologique évoquée par l'acétate d'isoamyle présenté de manière rétronasale est plus faible que la réponse évoquée par la stimulation orthonasale.

Nous ne pouvons pas exclure que l'acétate d'isoamyle dilué dans l'eau de boisson, aie également été perçu de manière orthonasale par les animaux lors du flairage de l'extrémité du biberon dans la cage expérimentale. Ceci est certainement le cas pour les fortes concentrations d'acétate d'isoamyle (10^{-3} et 10^{-5}), pour lesquelles la voie orthonasale venait probablement suppléer la voie rétronasale. En effet, après le conditionnement, nous avons fréquemment observé que certains animaux s'approchaient effectivement du biberon de boisson odorisée et aversive, le flairaient, puis prenaient la décision de boire de l'autre coté dans le biberon d'eau pure, sans même laper une seule fois dans le biberon d'eau odorisée. En revanche, pour les plus faibles concentrations, les animaux assoiffés et placés intentionnellement sous le biberon d'eau odorisée, consommaient généralement de l'eau odorisée à plusieurs reprises, échantillonnaient le biberon d'eau pure, puis consommaient à nouveau de l'eau odorisée avant de réellement démontrer une préférence pour l'une ou l'autre des boissons. Ainsi pour les concentrations les plus faibles, la voie rétronasale représentait probablement la voie majeure de détection de l'acétate d'isoamyle dilué dans l'eau de boisson.

En conclusion, l'acétate d'isoamyle apparaît comme un bon modèle d'odeur et sa présentation sous forme diluée dans l'eau de boisson semble être particulièrement pertinente pour l'étude de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaire et métabolique, basée sur un paradigme d'aversion olfactive conditionnée.

2.3) La voie d'administration centrale des molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Les études portant sur les rôles de l'orexine A, de la leptine et de l'insuline sur la détection olfactive ont été conduites en injectant ces molécules dans les ventricules latéraux. Ce mode d'administration générale dans le liquide céphalo-rachidien, incite à nous

demander si les changements mis en évidence sur la perception olfactive sont dus à une action directe de ces molécules sur le système olfactif ou à une action indirecte sur d'autres structures cérébrales se projetant à leur tour sur le système olfactif pour en moduler l'activité. En effet, les récepteurs de ces trois molécules sont exprimés tant au niveau du système olfactif qu'au niveau des noyaux hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990; Mercer et al., 1996; Fei et al., 1997; Shioda et al., 1998; Trivedi et al., 1998; Hervieu et al., 2001; Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Prud'homme et al., 2009). De plus, des fibres orexinergiques émanant de l'hypothalamus latéral se projettent au niveau de plusieurs structures olfactives telles que le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). Nous ne pouvons donc en aucun cas exclure une action indirecte de ces molécules sur d'autres structures cérébrales.

Certains éléments indiquent, cependant, que ces molécules sont effectivement capables d'agir localement au niveau du bulbe olfactif lorsqu'elles sont injectées dans le ventricule latéral. Tout d'abord, le ventricule latéral est la cavité ventriculaire anatomiquement la plus proche du bulbe olfactif. Ensuite, il a été démontré que l'administration d'orexine A dans le ventricule latéral modifie l'activité électrique des cellules mitrales, certes, avec un délai plus long, mais de la même manière et dans les mêmes proportions que lorsque l'orexine A est appliquée directement sur le bulbe olfactif (Apelbaum et al., 2005). De plus, l'administration d'orexine et de leptine dans le ventricule latéral induit une expression du marqueur d'activité neuronal *c-fos* dans le bulbe olfactif (Prud'homme et al., 2009). Enfin, lors de nos études comportementales, les doses d'orexine, de leptine et d'insuline qui ont été administrées n'ont pas induit de modifications de la prise alimentaire ou de la masse corporelle, suggérant une action limitée au niveau du système de régulation de l'homéostasie énergétique. En revanche, des effets importants ont été révélés sur la détection olfactive. Dans le cas de l'insuline, il est probable que cet effet sur la prise alimentaire n'ait pas été révélé car l'insuline était administrée dans le ventricule latéral. En effet, une étude a clairement démontré que cette hormone n'a pas d'effet sur la régulation de l'homéostasie énergétique lorsqu'elle est administrée dans le ventricule latéral (Manin et al., 1988); alors qu'elle diminue efficacement la prise alimentaire et la masse corporelle lorsqu'elle est administrée dans le 3^{ème} ventricule, bordé par l'hypothalamus (Woods et al.,

1979; Brief and Davis, 1984; Plata-Salaman et al., 1986; Air et al., 2002; Jaillard et al., 2009). Par ailleurs, il est probable que cet effet ait été simplement masqué par le fait que nos animaux subissaient un jeûne alimentaire chronique. En support de cette hypothèse, une étude a démontré que l'injection intracérébroventriculaire d'insuline ne diminue pas la prise alimentaire et la masse corporelle chez des animaux en restriction alimentaire (Plata-Salaman and Oomura, 1986; Jaillard et al., 2009). Afin de valider le mode d'administration ainsi que la dose d'insuline utilisée lors du test comportemental, nous avons mesuré la quantité d'insuline qui atteignait effectivement le bulbe olfactif. Nous avons ainsi démontré que l'administration de 14mU d'insuline dans le ventricule latéral induit une augmentation massive de la quantité d'insuline dans le bulbe olfactif. Cette augmentation d'insuline reste dans des gammes physiologiques puisque la quantité d'insuline bulbaire mesurée à la suite de l'injection d'insuline est similaire à la quantité d'insuline bulbaire mesurée chez des animaux rassasiés.

En administrant des doses physiologiques de ces peptides dans le ventricule latéral, il semble donc possible de dissocier les effets comportementaux des hormones et des neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique sur la perception olfactive, d'une part, et sur la masse corporelle et la prise alimentaire, d'autre part. En outre, les dosages de ces molécules apparaissent essentiels pour nous permettre de valider les doses et la méthode d'administration utilisée.

Au-delà des preuves expérimentales et des précautions que nous avons prises pour démontrer l'action de nos molécules d'intérêt sur le système olfactif, la manipulation de ces molécules et de leurs voies de signalisation au sein du réseau bulbaire permettrait de démontrer sans équivoque le rôle direct de ces molécules sur le bulbe olfactif. Il convient de noter ici que, dans le contexte de l'étude du rôle de l'insuline sur la détection olfactive, nous avons testé l'effet d'une déplétion locale des récepteurs de l'insuline dans le bulbe olfactif, sur les capacités de détection olfactive de rats Wistar. Pour cela, sous anesthésie générale, nous avons infusé un lentivirus portant une séquence anti-sens du récepteur de l'insuline (LV-IRAS, n = 10) dans le bulbe olfactif. Nous avons également réalisé la même opération pour un groupe contrôle, infusé avec un lentivirus portant une séquence non-pertinente (LV-contrôle, n = 10).

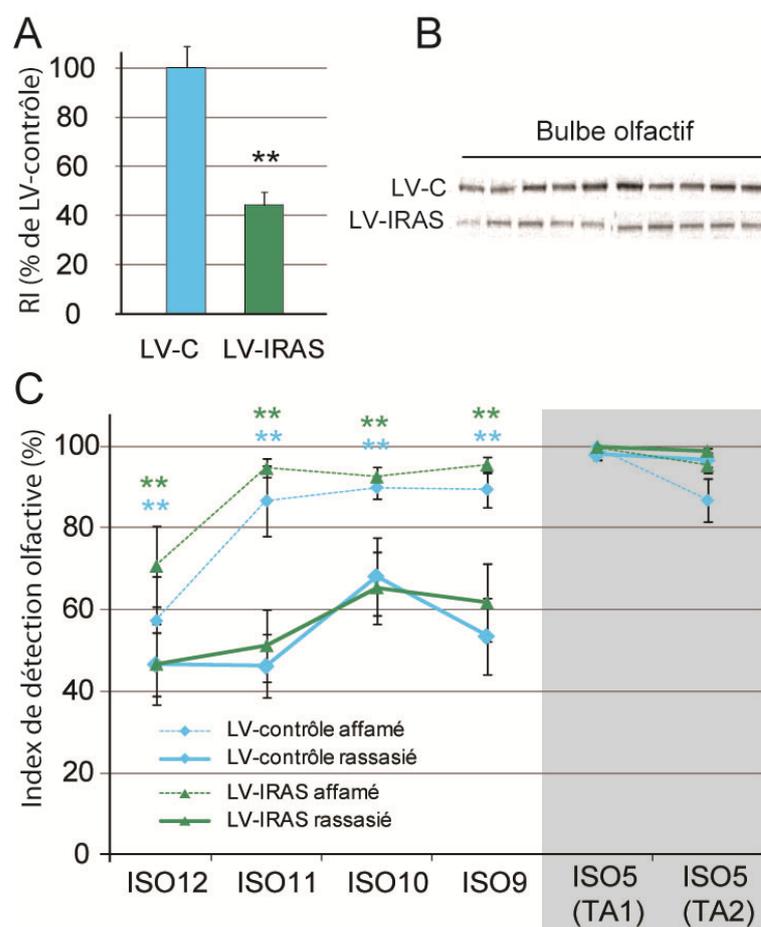


Figure 27 : Effet de l'infusion intrabulbaire d'un lentivirus codant pour une séquence anti-sens du récepteur de l'insuline sur la quantité de récepteur de l'insuline dans le bulbe olfactif (A) et la détection olfactive (B).

(A) Quantification densitométrique du récepteur de l'insuline (sous-unité β) réalisé par western-blot à partir des protéines extraites du bulbe olfactif de rats Wistar ayant reçu une infusion intrabulbaire d'un lentivirus codant pour une séquence anti-sens du récepteur de l'insuline (LV-IRAS, n=5) normalisé par rapport au groupe contrôle de rats Wistar ayant reçu une infusion intrabulbaire d'un lentivirus codant pour une séquence irrelevante (LV-C, n=5). Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de la quantité de signal mesurée (moyenne +/- SEM). Test de Wilcoxon **p<0,001 **(B)** Image du western-blot utilisé pour réaliser la quantification densitométrique. **(C)** Evaluation de la détection olfactive des rats Wistar ayant reçu une infusion intrabulbaire d'un lentivirus codant pour une séquence anti-sens du récepteur de l'insuline (LV-IRAS, n=10) et des rats Wistar ayant reçu une infusion intrabulbaire d'un lentivirus codant pour une séquence irrelevante (LV-contrôle, n=10). Les résultats sont représentés par un index de détection olfactive, correspondant au nombre de lapements d'eau pure divisé par le nombre de lapements total au cours de chaque session expérimentale (moyenne +/- SEM). Les courbes représentent les résultats du test de détection olfactive pour les dilutions d'acétate d'isoamyle de 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} (ISO12, ISO11, ISO10, ISO9) pour les animaux affamés (trait fin et pointillés) et rassasiés (trait épais et plein). Les droites de la zone grisée représentent les résultats des tests de l'aversion pour la dilution d'acétate d'isoamyle de 10^{-5} , au début du test comportemental (ISO5 (TA1) pour le test de l'aversion) et à la fin du test comportemental (ISO5 (TA2) pour le re-test de l'aversion). L'ANOVA à mesurées répétées indique un effet de l'état alimentaire pour deux groupes d'animaux (**p<0,001) mais pas d'effet du groupe. Pour les tests d'aversion, l'ANOVA à mesurées répétées ne révèle pas d'effet du test (ISO5TA1 ou ISO5TA2) et pas d'effet de l'état alimentaire.

Le matériel génétique porté par le LV-IRAS s'insère dans le génome de l'hôte et donne lieu à la transcription d'une séquence anti-sens qui s'apparie à la séquence endogène de l'ARNm du récepteur de l'insuline. Cet appariement anormal est ensuite naturellement dégradé par la cellule, conduisant à une diminution de la quantité de récepteur de l'insuline dans les cellules infectées. La diminution quantitative du récepteur de l'insuline est effective au bout de trois semaines et peut perdurer pendant plusieurs mois.

Nous avons validé cette méthode en démontrant par western blot, une diminution de 60% du récepteur de l'insuline dans le bulbe olfactif des animaux LV-IRAS par rapport à leurs témoins LV-contrôle (Figure 27A,B). Les animaux LV-IRAS et les animaux LV-contrôle présentent une modulation très nette de la détection olfactive par l'état alimentaire, en démontrant une meilleure acuité olfactive en état de faim qu'en état de rassasiement, confirmant une nouvelle fois les résultats obtenus initialement chez les rats Wistar (Aime et al., 2007). Cependant, l'évaluation des capacités de détection olfactive n'a pas révélé de différences significatives entre les deux groupes.

Ce résultat peut s'expliquer de plusieurs manières. Premièrement, le bulbe olfactif est la structure du système nerveux central comportant la plus grande densité de récepteurs de l'insuline (Hill et al., 1986; Unger et al., 1989; Marks et al., 1990). Il est donc probable qu'une déplétion de 60% du nombre de récepteurs de l'insuline dans le bulbe olfactif ne soit pas suffisante pour observer un effet comportemental. Dans ce cas, il serait intéressant de réitérer cette expérience en infusant une quantité plus importante de matériel viral dans le bulbe olfactif, afin d'induire une déplétion plus étendue et quasi-totale des récepteurs de l'insuline. Deuxièmement, comme nous l'avons évoqué à de nombreuses reprises, il existe une importante redondance des molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique capables d'agir au niveau du système olfactif. Il est donc possible que la diminution partielle du nombre de récepteurs de l'insuline dans le bulbe olfactif ait été compensée par d'autres systèmes de régulation, masquant ainsi un éventuel effet comportemental. Troisièmement, ces résultats sont concordants avec les résultats que nous avons obtenus lors de notre étude sur le rôle de l'insuline. En effet, nos dosages indiquent que la quantité d'insuline dans le bulbe est doublée en état de rassasiement alors que la quantité de récepteur reste constante quelque soit l'état alimentaire. Ces données tendent à

démontrer que le paramètre pertinent permettant l'action de l'insuline dans le bulbe olfactif est plus lié à la quantité d'insuline qui a accès à cette structure, qu'à la quantité de récepteurs présente dans le réseau bulbaire. Quatrièmement, il est probable que le LV-IRAS, infusé au centre du bulbe olfactif, n'ait pas uniformément atteint les différentes catégories cellulaires (les cellules granulaires et les cellules mitrales) qui expriment le récepteur de l'insuline. L'analyse quantitative des récepteurs de l'insuline présents dans les différentes couches du bulbe olfactif des animaux LV-IRAS n'a pu être réalisée, et aurait sans-doute pu éclaircir ce point. Ce type d'approche, consistant à manipuler l'action de neuropeptides et d'hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau bulbaire, est envisagé pour les perspectives de recherche de l'équipe, afin de démontrer le rôle direct des acteurs du système de régulation de l'homéostasie énergétique au niveau bulbaire.

2.4) L'analyse de la fonction olfactive

Pour l'ensemble de nos études comportementales, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de la capacité de *détection olfactive* des rongeurs. En nous intéressant à la détection olfactive pour une odeur neutre, nous souhaitons obtenir une mesure simple de la perception, reflétant un niveau de base de l'activité du système olfactif pour l'analyse quantitative de l'information olfactive. De plus, nous ne voulions pas faire appel à des niveaux de traitements plus complexes, tout en nous affranchissant d'éventuels biais induits par des changements de motivation ou d'activité locomotrice. Bien évidemment, les capacités de traitement du système olfactif ne se limitent pas à l'analyse de la détection olfactive et il serait particulièrement intéressant de développer l'étude des autres aspects de la fonction olfactive et de leur modulation par les états alimentaires et métaboliques.

La transduction chimio-électrique, débutant lors de la fixation d'une molécule odorante sur les cils des neurorécepteurs olfactifs, est souvent considérée comme la première étape de genèse de l'information olfactive. Cependant, le flairage de la source odorante, qui précède cette transduction, intervient également dans la perception olfactive. En effet, il a notamment été démontré, chez l'Homme, que le comportement de flairage influence directement la détection olfactive : à concentrations égales, plus le flairage de la source odorante est fort, plus l'intensité perçue de l'odeur est élevée (Mainland and Sobel, 2006). Le flairage correspond à l'acte olfacto-moteur effectué lors de l'exploration active de

l'environnement olfactif. Lors du flairage, les molécules odorantes gagnent l'épithélium olfactif par la voie orthonasale. Ainsi, l'analyse du comportement de flairage est parfaitement complémentaire aux études que nous avons menées sur l'étude de la détection olfactive lors de stimulations odorantes rétronasales. Ce champ d'investigation fait partie des perspectives directes de l'équipe. Nous avons très récemment acquis des données préliminaires indiquant que le comportement de flairage des animaux est modulé par l'état alimentaire : les animaux affamés flairent l'environnement plus activement que les animaux rassasiés. Lors d'une étude en collaboration, nous avons également démontré que l'infusion chronique de ghréline dans le ventricule latéral induit d'une part, une augmentation du comportement exploratoire en réponse à une stimulation alimentaire ; et d'autre part une augmentation de la détection olfactive. Parmi les données de la littérature disponibles à l'heure actuelle, certains auteurs ont également analysé la modulation des capacités d'exploration et de discrimination des odeurs par les états alimentaires et métaboliques. Il a été démontré que les rats explorent plus longuement une odeur alimentaire en état de faim qu'en état de rassasiement (Prud'homme et al., 2009). De plus, l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste de l'orexine A ou de leptine diminue le comportement exploratoire d'animaux rassasiés en réponse à une odeur de nourriture. L'ensemble de ces résultats étend la portée des données que nous avons exposées dans ce manuscrit, en suggérant que le comportement de flairage et d'exploration des odeurs alimentaires est augmenté en état de faim ou sous l'influence de molécules orexigènes ; et diminué en état de rassasiement ou sous l'influence de molécules anorexigènes.

Notons toutefois qu'il semble difficile de dissocier l'influence des états alimentaires et métaboliques sur le comportement de flairage spécifique de la fonction olfactive ; d'un effet global sur l'activité locomotrice. En effet, Prud'Homme et al. (2009) ont observé que la motricité des animaux était globalement augmentée en état de faim et diminuée en état de rassasiement ou lors d'injections intracérébroventriculaires d'un antagoniste de l'orexine A. De nombreuses données indiquent que le rôle de l'orexine A ne se limite pas à la régulation de l'homéostasie énergétique. Le système orexinergique se projette sur de nombreuses structures cérébrales et, en particulier, sur des systèmes neuromodulateurs, comme le locus coeruleus et le noyau du raphé, impliqués dans la régulation de l'éveil et du cycle veille/sommeil (Peyron et al., 1998). En conséquence, l'administration centrale d'orexine A

provoque la mise en place de nombreux comportements caractéristiques de l'état d'éveil, comme une augmentation de l'activité locomotrice (Smart and Jerman, 2002). Le paradigme comportemental que nous avons utilisé pour l'étude de la détection olfactive nous a permis de nous affranchir des modifications d'activité locomotrice induites par l'orexine A. Afin d'évaluer cet effet, nous avons comparé le nombre de changements de côté effectués dans la cage expérimentale par chaque animal recevant une injection intracérébroventriculaire d'orexine A ou de NaCl. Il apparaît, dans nos conditions expérimentales, que l'activité motrice des animaux n'était pas affectée par l'administration centrale d'orexine A (Julliard et al., 2007).

Outre la détection olfactive et le comportement de flairage, la capacité de discrimination olfactive serait un aspect intéressant de la fonction olfactive à analyser. Certains auteurs ont démontré que l'administration intranasale d'insuline induit une augmentation de la capacité de discrimination olfactive (Marks et al., 2009). Ce résultat va à l'encontre de notre hypothèse de travail selon laquelle les performances olfactives seraient globalement augmentées par les molécules orexigènes et diminuées par les molécules anorexigènes, et nous incite d'autant plus à élargir notre champ d'investigation à l'étude de la capacité de discrimination olfactive des rongeurs. Par ailleurs, ces données présentent certaines faiblesses méthodologiques que nous développerons ci-après. Lors de cette étude, les auteurs ont utilisé une tâche d'habituation et de déshabituaiton et ont comparé le temps d'exploration d'une odeur présentée successivement au cours de sept essais (habituation) au temps d'exploration d'une nouvelle odeur (déshabituaiton). Les animaux recevant un traitement d'insuline par voie intranasale, tout comme leurs témoins, passent significativement plus de temps à explorer la nouvelle odeur que l'odeur utilisée pour l'habituation, indiquant que les deux groupes d'animaux discriminent les deux odeurs. De plus, les animaux recevant un traitement d'insuline intranasale passent significativement plus de temps que leurs témoins à explorer la nouvelle odeur suggérant que ces animaux discriminent « mieux » les deux odeurs que les témoins. Cependant, ces auteurs ont également observé que l'administration intranasale d'insuline augmente le temps d'exploration d'un nouvel objet non-odorisé. Sur la base de ce résultat supplémentaire, on peut se demander si les animaux recevant une administration intranasale d'insuline ont réellement de meilleures capacités de discrimination olfactive ou si ce traitement provoque

simplement un attrait ou une curiosité accrue pour la nouveauté, qui ne soit pas nécessairement dépendant de caractéristiques olfactives.

En conclusion, ces données suggèrent que les états alimentaires et métaboliques modulent la fonction olfactive également à d'autres niveaux de traitements que la détection olfactive. En revanche, la caractérisation comportementale de l'influence du système de régulation de l'homéostasie énergétique sur le comportement exploratoire ou les capacités de discrimination nécessitent la mise en place de tests olfactifs permettant de s'affranchir de l'influence des états alimentaires et métaboliques sur la mise en place d'un état d'éveil comportemental qui ne soit pas forcément spécifique du traitement de l'information olfactive.

3) Implications fonctionnelles

Au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré que la perception olfactive est modulée par les états alimentaires. Nous avons également complété les données de la littérature pour démontrer que des peptides orexigènes surexprimés en état de faim, tels que l'orexine et - très récemment - la ghréline, sont libérés pour stimuler la prise alimentaire et augmenter les performances olfactives. A l'inverse, l'insuline et la leptine, deux hormones anorexigènes, sont sécrétées en état de rassasiement ou d'abondance énergétique, pour arrêter la prise alimentaire et diminuer les performances olfactives. Ces données suggèrent que les rôles des molécules impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle ne se limitent pas à une action restreinte au niveau des centres intégrateurs du système de régulation de l'homéostasie énergétique, tels que l'hypothalamus ou le tronc cérébral, mais s'étendent largement au niveau du système olfactif. Ainsi, sur la base de nos observations et sur les données de la littérature, nous proposons ici un modèle spéculatif de régulation du comportement alimentaire en fonction des états de faim et de satiété. Ce modèle, incluant à la fois le chef d'orchestre de la régulation de l'homéostasie énergétique (l'hypothalamus), et le premier relais central de l'olfaction (le bulbe olfactif), est résumé par la figure 28.

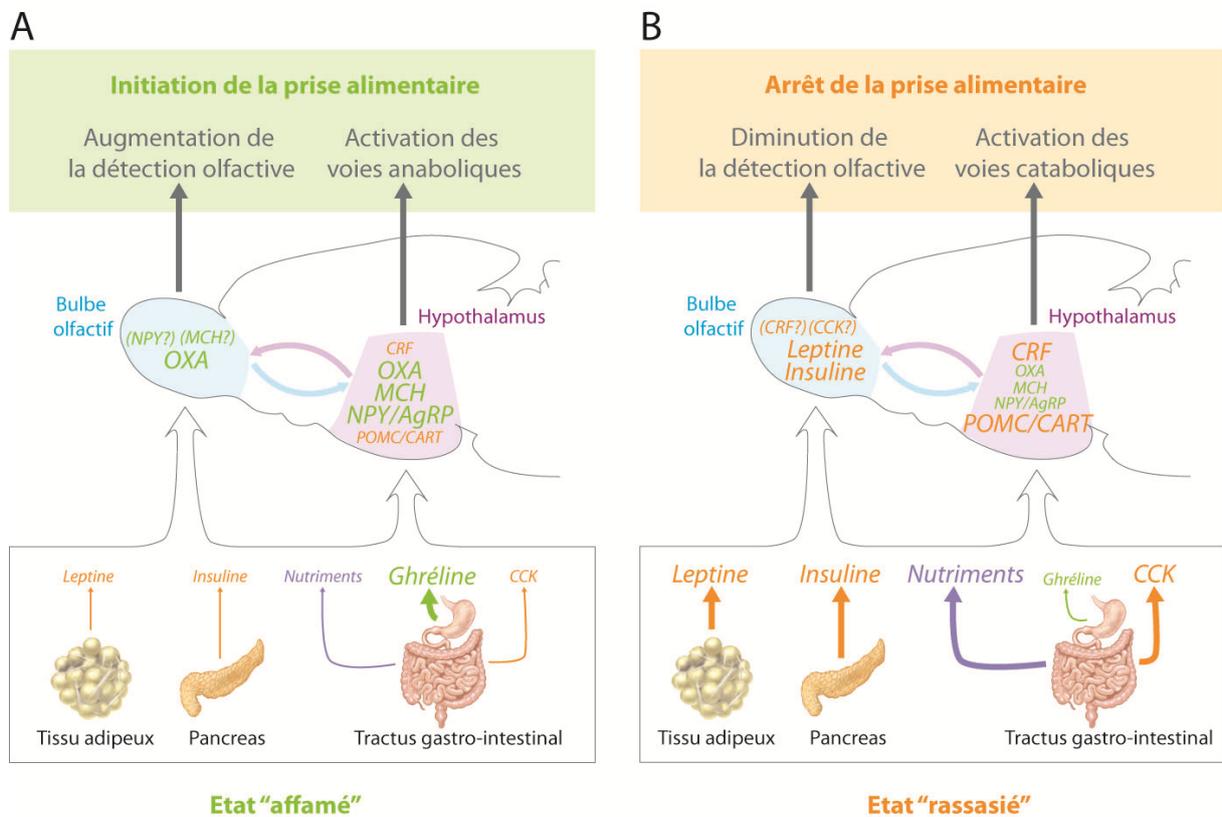


Figure 28 : Modèle spéculatif résumant les implications fonctionnelles de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaires sur la régulation du comportement alimentaire chez le rat.

Représentation schématique reportant les principaux signaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique en état de faim (A) et en état de rassasiement (B). Les quantités relatives de ces signaux sont corrélées à la taille du texte (grande police = grande quantité, petite police = petite quantité). L'encadré du bas illustre la sécrétion de divers signaux métaboliques (leptine, insuline, nutriments, ghréline et cholecystokinine (CCK)) dans la circulation sanguine. Ces signaux gagnent le système nerveux central pour moduler l'expression de neuropeptides centraux (le corticotropin-releasing factor (CRF), l'orexine A (OXA), la melanin-concentrating hormone (MCH), le neuropeptide Y (NPY), l'agouti-related protein (AgRp), la proopiomélanocortine (POMC) et le cocaïne- and amphetamine-regulated transcript (CART)). L'action de l'ensemble des neuropeptides et des hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique modulent les voies métaboliques anaboliques et cataboliques d'une part et modulent la détection olfactive d'autre part, pour influencer le comportement alimentaire en initiant ou en conduisant à l'arrêt de la prise alimentaire. Les actions de l'orexine A, de la leptine et de l'insuline sur la détection olfactive ont été expérimentalement démontrées alors que les actions du NPY, de la MCH, du CRF et de la CCK restent à être démontrées au niveau comportemental.

En état de faim (Figure 28A), le taux circulant de ghréline, l'unique hormone orexigène périphérique, est élevé (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001). A l'inverse, les taux circulants de nutriments et d'hormones anorexigènes périphériques, telles que la leptine et l'insuline, sont bas. Ces variations périphériques conduisent, d'une part, à une augmentation des taux d'expression des neuropeptides hypothalamiques orexigènes comprenant notamment l'AgRP, le NPY, la MCH et l'orexine A (Qu et al., 1996; Hahn et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Cai et al., 1999; Mizuno and Mobbs, 1999) ; d'autre part, à une diminution des taux d'expression des neuropeptides hypothalamiques anorexigènes POMC et CART (Kristensen et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Benoit et al., 2002). L'action de ces neuropeptides et de ces hormones au niveau de l'hypothalamus, également relayée par le tronc cérébral et de nombreuses structures nerveuses effectrices, conduit à l'activation de voies anaboliques. Cette action anabolisante est orchestrée par les centres intégrateurs qui activent le système nerveux autonome et l'axe hypothalamo-hypophysaire, contrôlant à leur tour de multiples tissus et organes. Conjointement, certaines de ces molécules, comme l'orexine A, agissent également au niveau du bulbe olfactif pour augmenter la détection olfactive. Bien que cet effet n'ait pas été démontré au niveau comportemental, certaines données suggèrent que le MCH et le NPY pourraient également agir au niveau de leurs récepteur largement exprimés au sein du réseau bulbaire (Hervieu et al., 2000; Migita et al., 2001; Blakemore et al., 2006) et moduler le traitement de l'information olfactive. Ensemble, l'activation de voies anaboliques et l'augmentation de la détection olfactive favorisent la mise en place d'une réponse comportementale adaptée et conduisent à l'initiation de la prise alimentaire.

En état de rassasiement (Figure 28B), les taux de nutriments, de leptine et d'insuline sont élevés (Saladin et al., 1995; Schoeller et al., 1997; Henquin, 2009). Le taux de cholecystokinine, l'hormone de satiété périphérique, est également élevé (Liddle et al., 1985). En conséquence, les taux d'expression des neuropeptides hypothalamiques anorexigènes POMC, CART et CRF sont augmentés et les taux d'expression des neuropeptides hypothalamiques orexigènes tels que l'AgRP, le NPY, le MCH et l'orexine A sont diminués. L'ensemble de ces neuropeptides et de ces hormones agit au niveau de divers noyaux hypothalamiques, relayés par l'activation de structures effectrices, pour induire des changements de l'activité métabolique et conduire à la mise en place des voies cataboliques.

Simultanément, la leptine et l'insuline agissent au niveau du bulbe olfactif, pour diminuer la capacité de détection olfactive. Bien que ce soit encore hypothétique, la cholecystokinine et le CRF, qui possèdent des récepteurs au niveau du bulbe olfactif (De Souza et al., 1985; Mercer et al., 2000; Mercer and Beart, 2004; Chen et al., 2005), pourraient également agir au niveau du réseau bulbaire afin de diminuer les performances olfactives. L'activation des voies cataboliques et la diminution de la capacité de détection olfactive, conduisent ensemble à l'arrêt de la prise alimentaire.

En accord avec ce modèle il apparaît que la régulation du comportement alimentaire fait intervenir deux types d'informations : des informations internes permettant une perception des besoins homéostatiques et reposant sur de nombreux facteurs neuro-endocriniens ; et des informations externes, correspondant aux stimuli sensoriels apportés par la perception de l'environnement extérieur. La perception des informations internes et la perception des informations externes semblent être indissociables et un état interne donné donne lieu à un éveil comportemental spécifique et adapté au rétablissement de l'homéostasie énergétique. A titre d'exemple, en état de faim, l'état interne est caractérisé par une prépondérance des facteurs orexigènes qui engendrent la mise en place d'un éveil comportemental spécifique, permettant de faciliter l'accès d'informations externes pertinentes et en particulier d'augmenter la réactivité du système olfactif aux stimuli signalant la présence de nourriture.

Les Humains et la majeure partie des mammifères satisfont leurs besoins énergétiques de manière fractionnée au cours de repas disséminés tout le long de la journée. Chez les animaux, le rythme d'alimentation est essentiellement régi par les besoins homéostatiques et la disponibilité de l'aliment. Ainsi, une augmentation de la perception olfactive en période pré-prandiale joue un rôle éco-éthologique fondamental et place l'animal dans un état d'éveil sensoriel, lui permettant de rechercher puis de localiser une éventuelle source de nourriture sur la base d'indices distaux. Chez l'Homme, en particulier dans les sociétés occidentales où l'incidence de l'obésité progresse à une cadence épidémique, de la nourriture est disponible en toutes circonstances et à tous moments de la journée. Ainsi, l'initiation des repas est rarement basée sur un déficit homéostatique. En revanche, les repas débutent sur la base d'apprentissages et de conditionnements alimentaires ou de

circonstances sociales, et sont largement dépendants de l'anticipation de la palatabilité et de la notion d'hédonicité associées à la consommation de nourriture. L'étude des mécanismes participant à l'initiation du comportement alimentaire chez l'Homme apparaît donc cruciale pour tenter de comprendre les facteurs impliqués dans le développement et le maintien de troubles du comportement alimentaire tels que l'obésité et l'anorexie.

L'obésité est un syndrome métabolique multifactoriel dont la mise en place repose, d'une part, sur des prédispositions génétiques et, d'autre part, sur l'influence de l'environnement (Volkow and Wise, 2005). La part réelle d'obésités génétiques demeure faible et l'influence environnementale semble être responsable de l'explosion récente de la prévalence mondiale de l'obésité. Le facteur environnemental le plus impliqué est certainement la disponibilité permanente de nourriture peu onéreuse, très palatable et très dense en énergie qui incite à l'initiation du comportement alimentaire et à la surconsommation de nourriture, chez des individus prédisposés et particulièrement sensibles à cet environnement dit « obésogène ». Les attributs sensoriels de la nourriture sont ainsi particulièrement impliqués dans l'établissement et le maintien de comportements alimentaires anormaux. Chez les sujets obèses, la présentation de nourriture (incluant la vue et l'odeur d'un repas) induit une sur-activation corticale qui est corrélée à une augmentation de la sensation de faim. Chez les sujets sains comme les sujets obèses, la présentation distale d'un aliment, stimule le désir de consommation de nourriture (Karhunen et al., 1997). Chez des sujets normo-pondérés, le désir de consommation et le jugement d'hédonicité évoqué par des odeurs alimentaires sont élevés avant le repas et drastiquement diminués après le repas (Jiang et al., 2008). A l'inverse, l'évaluation de l'hédonicité évoquée par les odeurs alimentaires, en état de faim et en état de rassasiement, semble être largement diminuée chez les patientes anorexiques, qui démontrent également des déficits de discrimination et d'identification des odeurs (Schreder et al., 2008).

Certaines données cliniques établissent une importance cruciale des interactions entre la fonction olfactive et le comportement alimentaire. Elles démontrent notamment que les altérations de la perception olfactive sont généralement des facteurs aggravants de différentes conditions physiologiques fragiles ou de conditions pathologiques. Lors du vieillissement normal, les personnes âgées présentent généralement une diminution des

performances olfactives au-delà de 65 ans (Doty et al., 1984). Au cours du vieillissement pathologique, en particulier chez les patients atteints de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, des déficits de détection, de discrimination et de reconnaissance des odeurs sont les premières altérations cognitives mesurables (Mesholam et al., 1998). Les modifications de la perception olfactive observées au cours du vieillissement normal ou pathologique sont généralement associées à une diminution de l'attrait évoqué par la nourriture, de l'appétit et des apports énergétiques conduisant à une sous-nutrition, une diminution de la masse corporelle et une réduction globale de la condition physique (Schiffman and Graham, 2000). Cet effet a également été reporté chez les patients atteints de cancer qui présentent de multiples déficits de la fonction olfactive dus à la destruction cellulaire et tissulaire mais également à la mise en place d'aversion olfacto-gustatives conditionnées induites par les traitements chimiothérapeutiques. L'altération de la fonction olfactive est à l'origine de troubles du comportement alimentaire conduisant à une restriction des choix alimentaires, à des apports énergétiques inappropriés ainsi qu'à une sous-nutrition globale qui sont généralement associés à un mauvais pronostic de survie (Schiffman and Graham, 2000). Plusieurs études menées sur des populations de sujets âgés ont démontré que le renforcement des saveurs alimentaires par l'apport d'odeurs (au sens strict, sans apport de sel ni d'épices) directement mélangées aux plats de chaque repas permet d'augmenter la prise alimentaire, les fonctions immunitaires ainsi que la force musculaire des sujets âgés (Schiffman and Warwick, 1993; Schiffman, 1998, 2000; Schiffman and Graham, 2000). Ces auteurs proposent que le renforcement des saveurs alimentaires puisse être utilisé pour lutter contre la cachexie et ainsi renforcer la condition physique et la survie des patients atteints de cancer.

Bibliographie

-
- Abraham NM, Spors H, Carleton A, Margrie TW, Kuner T, Schaefer AT (2004) Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44:865-876.
- Ahokas AJ, Goetzl FR (1951) The influence of distention of the stomach upon olfactory acuity and sensations associated with food intake. *Perm Found Med Bull* 9:105-113.
- Ahren B, Holst JJ (2001) The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 50:1030-1038.
- Aime P, Duchamp-Viret P, Chaput MA, Savigner A, Mahfouz M, Julliard AK (2007) Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav Brain Res* 179:258-264.
- Air EL, Benoit SC, Blake Smith KA, Clegg DJ, Woods SC (2002) Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 72:423-429.
- Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N (2002) The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B312-320.
- Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123-140.
- Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B (1964) Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* 207:1146-1154.
- Anastasi A, Erspamer V, Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27:166-167.
- Anika SM, Houpt TR, Houpt KA (1980) Insulin as a satiety hormone. *Physiol Behav* 25:21-23.
- Apelbaum AF, Chaput MA (2003) Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 28:389-395.
- Apelbaum AF, Perrut A, Chaput M (2005) Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul Pept* 129:49-61.

- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT (2000) Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol* 84:1194-1203.
- Astic L, Saucier D (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res Bull* 16:445-454.
- Astic L, Saucier D, Holley A (1987) Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 424:144-152.
- Astic L, Saucier D, Coulon P, Lafay F, Flamand A (1993) The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. *Brain Res* 619:146-156.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT (2003) Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623-629.

B

-
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19:RC26.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M (1985) An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331:172-175.
- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix MC, Durieux D, Schlegel C, Salesse R, Caillol M (2007) Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 1129:130-141.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. (2000a) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275:14563-14572.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997a) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18:1257-1262.
- Banks WA, Kastin AJ, Pan W (1999) Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* 20:373-378.

- Banks WA, Clever CM, Farrell CL (2000b) Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1158-1165.
- Banks WA, Jaspan JB, Huang W, Kastin AJ (1997b) Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18:1423-1429.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17:305-311.
- Barone FC, Wayner MJ, Scharoun SL, Guevara-Aguilar R, Aguilar-Baturoni HU (1981) Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res Bull* 7:75-88.
- Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW (1997) Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138:4463-4472.
- Barry WS, Bray GA (1969) Plasma triglycerides in genetically obese rats. *Metabolism* 18:833-839.
- Baskin DG, Porte D, Jr., Guest K, Dorsa DM (1983) Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* 112:898-903.
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr. (2003) STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421:856-859.
- Beck B (2000) Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 16:916-923.
- Beck B, Richy S (1999) Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 258:119-122.
- Beck B, Burlet A, Nicolas JP, Burlet C (1990) Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese Zucker rats: implications in feeding and sexual behaviors. *Physiol Behav* 47:449-453.
- Beck B, Stricker-Krongrad A, Nicolas JP, Burlet C (1992) Chronic and continuous intracerebroventricular infusion of neuropeptide Y in Long-Evans rats mimics the feeding behaviour of obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16:295-302.
- Beglinger C, Degen L, Matzinger D, D'Amato M, Drewe J (2001) Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1149-1154.

- Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL (2005) Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306:309-316.
- Bellisle F, Louis-Sylvestre J, Demozay F, Blazy D, Le Magnen J (1985) Cephalic phase of insulin secretion and food stimulation in humans: a new perspective. *Am J Physiol* 249:E639-645.
- Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20:69-81.
- Belluscio L, Lodovichi C, Feinstein P, Mombaerts P, Katz LC (2002) Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature* 419:296-300.
- Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson IC, Carlsson LM, Carlsson B (1998) Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* 67:29-36.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC (2002) The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22:9048-9052.
- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26:393-428.
- Berthoud HR, Powley TL (1992) Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J Comp Neurol* 319:261-276.
- Berthoud HR, Neuhuber WL (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85:1-17.
- Berthoud HR, Morrison C (2008) The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 59:55-92.
- Biju KC, Marks DR, Mast TG, Fadool DA (2008) Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 506:161-179.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319:218-245.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS (1998) Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139:3485-3491.

- Blakemore LJ, Levenson CW, Trombley PQ (2006) Neuropeptide Y modulates excitatory synaptic transmission in the olfactory bulb. *Neuroscience* 138:663-674.
- Blevins JE, Stanley BG, Reidelberger RD (2000) Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Res* 860:1-10.
- Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3419-3423.
- Bodyak N, Slotnick B (1999) Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory. *Chem Senses* 24:637-645.
- Bonino M, Cantino D, Sassoe-Pognetto M (1999) Cellular and subcellular localization of gamma-aminobutyric acidB receptors in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 274:195-198.
- Booth D, Brookover T (1968) Hunger elicited in the rat by a single injection of bovine crystalline insulin. *Physiol Behav* 3:439-446.
- Bouna S, Gysling K, Calas A, Araneda S (1994) Some noradrenergic neurons of locus ceruleus-olfactory pathways contain neuropeptide-Y. *Brain Res Bull* 34:413-417.
- Bowlby MR, Fadool DA, Holmes TC, Levitan IB (1997) Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J Gen Physiol* 110:601-610.
- Breer H (2003) Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. *Anal Bioanal Chem* 377:427-433.
- Breiner M, Weiland M, Becker W, Muller-Wieland D, Streicher R, Fabry M, Joost HG (1993) Heterogeneity of insulin receptors in rat tissues as detected with the partial agonist B29,B29'-suberoyl-insulin. *Mol Pharmacol* 44:271-276.
- Brief DJ, Davis JD (1984) Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res Bull* 12:571-575.
- Broadwell RD, Jacobowitz DM (1976) Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. III. The ipsilateral centrifugal fibers to the olfactory bulbar and retrobulbar formations. *J Comp Neurol* 170:321-345.
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402:460-474.
- Brown LM, Benoit SC, Woods SC, Clegg DJ (2007) Intraventricular (i3vt) ghrelin increases food intake in fatty Zucker rats. *Peptides* 28:612-616.

- Brunet LJ, Gold GH, Ngai J (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17:681-693.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187.
- Buonviso N, Chaput MA (1990) Response similarity to odors in olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *J Neurophysiol* 63:447-454.
- Buonviso N, Chaput MA, Scott JW (1991a) Mitral cell-to-glomerulus connectivity: an HRP study of the orientation of mitral cell apical dendrites. *J Comp Neurol* 307:57-64.
- Buonviso N, Revial MF, Jourdan F (1991b) The Projections of Mitral Cells from Small Local Regions of the Olfactory Bulb: An Anterograde Tracing Study Using PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin). *Eur J Neurosci* 3:493-500.
- Burdakov D, Luckman SM, Verkhratsky A (2005) Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2227-2235.
- Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV (2000) The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 71:187-195.

C

-
- Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD (1994) Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13:339-352.
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48:2132-2137.
- Caillol M, Aioun J, Baly C, Persuy MA, Salesse R (2003) Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 960:48-61.
- Cain DP (1975) Effects of insulin injection on responses of olfactory bulb and amygdala single units to odors. *Brain Res* 99:69-83.

- Campfield LA, Brandon P, Smith FJ (1985) On-line continuous measurement of blood glucose and meal pattern in free-feeding rats: the role of glucose in meal initiation. *Brain Res Bull* 14:605-616.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
- Carson KA, Burd GD (1980) Localization of acetylcholinesterase in the main and accessory olfactory bulbs of the mouse by light and electron microscopic histochemistry. *J Comp Neurol* 191:353-371.
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24:5670-5683.
- Cashion MF, Banks WA, Kastin AJ (1996) Sequestration of centrally administered insulin by the brain: effects of starvation, aluminum, and TNF-alpha. *Horm Behav* 30:280-286.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100:703-711.
- Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N (2007) Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav Neurosci* 121:1383-1392.
- Chaput MA, Holley A (1976) Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chemical senses* 2:189-201.
- Chavez M, Kaiyala K, Madden LJ, Schwartz MW, Woods SC (1995) Intraventricular insulin and the level of maintained body weight in rats. *Behav Neurosci* 109:528-531.
- Chen A, Perrin M, Brar B, Li C, Jamieson P, Digruccio M, Lewis K, Vale W (2005) Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 19:441-458.
- Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78:823-834.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492.
- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271:994-996.

- Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, McOsker CC, Seeley RJ (2002) Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* 51:3196-3201.
- Coker GT, 3rd, Studelska D, Harmon S, Burke W, O'Malley KL (1990) Analysis of tyrosine hydroxylase and insulin transcripts in human neuroendocrine tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 8:93-98.
- Coleman DL (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294-298.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-578.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295.
- Corp ES, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG (1986) Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 70:17-22.
- Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930.
- Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ (1997) Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 12:229-241.
- Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Lavoie JM, Favier R (2002) Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 10:188-195.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- Cowley MA et al. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
- Crews L, Hunter D (1994) Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspect Dev Neurobiol* 2:151-161.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719.

Cummings S, Elde R, Ells J, Lindall A (1983) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 3:1355-1368.

D

Danger JM, Tonon MC, Jenks BG, Saint-Pierre S, Martel JC, Fasolo A, Breton B, Quirion R, Pelletier G, Vaudry H (1990) Neuropeptide Y: localization in the central nervous system and neuroendocrine functions. *Fundam Clin Pharmacol* 4:307-340.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327.

De Matteis R, Dashtipour K, Ognibene A, Cinti S (1998) Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc Nutr Soc* 57:441-448.

De Olmos J, Hardy H, Heimer L (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol* 181:213-244.

De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ (1985) Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci* 5:3189-3203.

Desgranges B, Sevelinges Y, Bonnefond M, Levy F, Ravel N, Ferreira G (2009) Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *Eur J Neurosci* 29:1654-1662.

DeSimone JA, Lyall V (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract III. Salty and sour taste: sensing of sodium and protons by the tongue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G1005-1010.

Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 269:8445-8454.

Didier A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1994) Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *Neuroreport* 6:145-148.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.

Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L, Rosenberg L (1984) Smell identification ability: changes with age. *Science* 226:1441-1443.

Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC (2006) Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 147:23-30.

Duffy KR, Pardridge WM (1987) Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res* 420:32-38.

Durkin MM, Walker MW, Smith KE, Gustafson EL, Gerald C, Branchek TA (2000) Expression of a novel neuropeptide Y receptor subtype involved in food intake: an in situ hybridization study of Y5 mRNA distribution in rat brain. *Exp Neurol* 165:90-100.

E

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432:1-19.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375-1385.

Engeset RM, Ritter RC (1980) Intracerebroventricular 2-DG causes feeding in the absence of other signs of glucoprivation. *Brain Res* 202:229-233.

Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT (1996) Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport* 7:989-992.

Ennis M, Hamilton K, Hayar A (2007) Neurochemistry of the Main Olfactory System *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*:137-204.

Ennis M, Zhou FM, Ciombor KJ, Aroniadou-Anderjaska V, Hayar A, Borrelli E, Zimmer LA, Margolis F, Shipley MT (2001) Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol* 86:2986-2997.

F

Fadool DA, Levitan IB (1998) Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 18:6126-6137.

- Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA (2000) Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83:2332-2348.
- Fadool DA, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons AD, Overton JM, Koni PA, Flavell RA, Kaczmarek LK (2004) Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces "Super-Smeller Mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron* 41:389-404.
- Fan W, Ellacott KL, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD (2004) Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 7:335-336.
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7001-7005.
- Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Vassalli A, Mombaerts P (2004) Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* 117:833-846.
- Feldman M, Richardson CT (1986) Role of thought, sight, smell, and taste of food in the cephalic phase of gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology* 90:428-433.
- Ferrero D, Liberles S (2009) The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2:23-33.
- Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211-218.
- Flynn FW (1989) Fourth ventricle bombesin injection suppresses ingestive behaviors in rats. *Am J Physiol* 256:R590-596.
- Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, Gaylinn BD, Thorner MO, Cummings DE (2008) Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1971-1979.
- Frank HJ, Pardridge WM, Morris WL, Rosenfeld RG, Choi TB (1986) Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabetes* 35:654-661.
- Frings S (2001) Chemoelectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 58:510-519.
- Fulton S, Richard D, Woodside B, Shizgal P (2004) Food restriction and leptin impact brain reward circuitry in lean and obese Zucker rats. *Behav Brain Res* 155:319-329.

Furchtgott E, Friedman MP (1960) The effects of hunger on taste and odor RLs. *Journal of comparative and physiological psychology* 53:576-581.

G

Gall C, Seroogy KB, Brecha N (1986) Distribution of VIP- and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Res* 374:389-394.

Garcia J, Ervin F, Frank R, Koelling R (1966) Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science* 5:121-122.

Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ (1983) Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376.

Getchell TV, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML (2006) Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 87:848-856.

Giachetti I, MacLeod P (1977) Olfactory input to the thalamus: evidence for a ventroposteromedial projection. *Brain Res* 125:166-169.

Giachetti I, MacLeod P, Le Magnen J (1970) [Influence of hunger and satiety states on responses of the olfactory bulb in rats]. *J Physiol (Paris)* 62 Suppl 2:280-281.

Giardino L, Calza L, Zanni M, Parchi P, Battistini N, Marrama P (1989) Iodinated-NPY binding sites: autoradiographic study in the rat brain. *Neuropeptides* 13:23-28.

Gibbs J, Kulkosky PJ, Smith GP (1981) Effects of peripheral and central bombesin on feeding behavior of rats. *Peptides* 2 Suppl 2:179-183.

Gibbs J, Fauser DJ, Rowe EA, Rolls BJ, Rolls ET, Maddison SP (1979) Bombesin suppresses feeding in rats. *Nature* 282:208-210.

Giddings SJ, Chirgwin J, Permutt MA (1985) Evaluation of rat insulin messenger RNA in pancreatic and extrapancreatic tissues. *Diabetologia* 28:343-347.

Giduck SA, Threatte RM, Kare MR (1987) Cephalic reflexes: their role in digestion and possible roles in absorption and metabolism. *J Nutr* 117:1191-1196.

Giustetto M, Bovolin P, Fasolo A, Bonino M, Cantino D, Sassoe-Pognetto M (1997) Glutamate receptors in the olfactory bulb synaptic circuitry: heterogeneity and synaptic localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 and AMPA receptor subunit 1. *Neuroscience* 76:787-798.

Glaze J (1928) Psychological effects of fasting. *American journal of psychology* 40:236-253.

- Glaze J (1929) Sensitivity to odors and other phenomena during a fast. *American journal of psychology* 40:569-576.
- Goetzl FR, Stone F (1947) Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology* 9:444-453.
- Goetzl FR, Stone F (1948) The influence of amphetamine sulfate upon olfactory acuity and appetite. *Gastroenterology* 10:708-713.
- Goetzl FR, Abel MS, Ahokas AJ (1950) Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *Journal of applied physiology* 2:553-562.
- Goetzl FR, Ahokas AJ, Goldschmidt M (1951) Influence of sucrose in various concentrations upon olfactory acuity and sensations associated with food intake. *J Appl Physiol* 4:30-36.
- Graziadei GA, Graziadei PP (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8:197-213.
- Grider JR (1994) Role of cholecystikinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J Nutr* 124:1334S-1339S.
- Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D (1999) Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262:77-80.
- Grill HJ, Ginsberg AB, Seeley RJ, Kaplan JM (1998) Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J Neurosci* 18:10128-10135.
- Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA (1982) Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat* 135:83-88.
- Guerre-Millo M (1997) Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Biomed Pharmacother* 51:318-323.
- Guevara-Aguilar R, Jimenez-Montufar LL, Garcia-Diaz DE, Wayner MJ, Armstrong DL (1988) Olfactory and visceral projections to the paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20:799-801.
- Guild AA (1956) Olfactory acuity in normal and obese human subjects : diurnal variations and the effect of d-amphetamine sulfate *Journal of laryngology and otology* 70:408-414.

Gutzwiller JP, Degen L, Matzinger D, Prestin S, Beglinger C (2004) Interaction between GLP-1 and CCK-33 in inhibiting food intake and appetite in men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R562-567.

H

Haberly LB, Price JL (1977) The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129:152-157.

Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83--132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-52.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1:271-272.

Hakansson ML, Hulting AL, Meister B (1996) Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. *Neuroreport* 7:3087-3092.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM (1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8878-8883.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.

Hardy AB, Aioun J, Baly C, Julliard KA, Caillol M, Salesse R, Duchamp-Viret P (2005) Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: patch-clamp study on slices and immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology* 146:4042-4053.

Harrold JA, Dovey T, Cai XJ, Halford JC, Pinkney J (2008) Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1196:59-64.

Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, Cone RD (1999) Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology* 140:1408-1415.

Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK, Baskin DG, Dallman MF, Weigle DS, Schwartz MW (2000) Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes* 49:244-252.

- Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT (2004) External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci* 24:6676-6685.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-1105.
- Heimer L (1968) Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *J Anat* 103:413-432.
- Henquin JC (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52:739-751.
- Hervey G (1959) The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145:336-352.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA (2001) Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103:777-797.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, Leslie RA (2000) The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 12:1194-1216.
- Hetherington A, Ranson S (1942a) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 76:475-499
- Hetherington AW, Ranson SW (1942b) The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 76:475-499.
- Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J (1986) Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17:1127-1138.
- Honda T, Wada E, Battey JF, Wank SA (1993) Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol Cell Neurosci* 4:143-154.
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19:1072-1087.
- Hotta M, Shibasaki T, Yamauchi N, Ohno H, Benoit R, Ling N, Demura H (1991) The effects of chronic central administration of corticotropin-releasing factor on food intake, body weight, and hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones. *Life Sci* 48:1483-1491.

Hou Z, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S (2006) Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul Pept* 134:126-131.

Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, DeCarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velazquez N, McCaleb ML (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem* 271:26315-26319.

Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE (1998) Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 400:469-486.

I

Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Ronnekleiv OK, Low MJ, Kelly MJ (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144:1331-1340.

Imaki T, Nahon JL, Sawchenko PE, Vale W (1989) Widespread expression of corticotropin-releasing factor messenger RNA and immunoreactivity in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 496:35-44.

Ingram SM, Krause RG, 2nd, Baldino F, Jr., Skeen LC, Lewis ME (1989) Neuronal localization of cholecystokinin mRNA in the rat brain by using in situ hybridization histochemistry. *J Comp Neurol* 287:260-272.

Innis RB, Correa FM, Uhl GR, Schneider B, Snyder SH (1979) Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity: histochemical localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:521-525.

Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749-761.

Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR (2008) Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 26:1298-1306.

J

Jacobowitz DM, O'Donohue TL (1978) alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:6300-6304.

- Jahr CE, Nicoll RA (1980) Dendrodendritic inhibition: demonstration with intracellular recording. *Science* 207:1473-1475.
- Jahr CE, Nicoll RA (1982) An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol* 326:213-234.
- Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, Lorsignol A (2009) Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58:1544-1549.
- Janowitz HD, Grossman MI (1949) Gustoolfactory thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *J Appl Physiol* 2:217-222.
- Jiang T, Soussignan R, Rigaud D, Martin S, Royet JP, Brondel L, Schaal B (2008) Alliesthesia to food cues: heterogeneity across stimuli and sensory modalities. *Physiol Behav* 95:464-470.
- Johnson BA, Woo CC, Leon M (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 393:457-471.
- Johnson BA, Xu Z, Ali SS, Leon M (2009) Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: similarities and differences in chemotopic organization. *J Comp Neurol* 514:658-673.
- Jones DT, Reed RR (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244:790-795.
- Joost HG (1995) Structural and functional heterogeneity of insulin receptors. *Cell Signal* 7:85-91.
- Julliard AK, Chaput MA, Apelbaum A, Aime P, Mahfouz M, Duchamp-Viret P (2007) Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav Brain Res* 183:123-129.

K

-
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2000) Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141:4797-4800.
- Kappeler L, Zizzari P, Alliot J, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2004a) Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 80:273-283.

- Kappeler L, Zizzari P, Grouselle D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2004b) Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J Neuroendocrinol* 16:980-988.
- Karhunen LJ, Lappalainen RI, Vanninen EJ, Kuikka JT, Uusitupa MI (1997) Regional cerebral blood flow during food exposure in obese and normal-weight women. *Brain* 120 (Pt 9):1675-1684.
- Kastin AJ, Akerstrom V (2000) Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. *Peptides* 21:679-682.
- Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsberger P (1999) Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* 20:1449-1453.
- Kateb CC, Merali Z (1992) A single meal elicits regional changes in bombesin-like peptide levels in the gut and brain. *Brain Res* 596:10-16.
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:578-596.
- Kleene SJ, Gesteland RC (1991) Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci* 11:3624-3629.
- Knutson VP (1991) Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 5:2130-2138.
- Koelega HS (1994) Diurnal variations in olfactory sensitivity and the relationship to food intake. *Percept Mot Skills* 78:215-226.
- Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF (1996) Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4162-4165.
- Koster NL, Norman AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Pixley SK, Shipley MT (1999) Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol* 411:666-673.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391:115-132.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76.

Kulkosky PJ, Gibbs J, Smith GP (1982) Feeding suppression and grooming repeatedly elicited by intraventricular bombesin. *Brain Res* 242:194-196.

L

Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20:1176-1190.

Langfeld H (1914) On the psychophysiology of a prolonged fast. *Psychological monographs* 16.

Larhammar D, Ericsson A, Persson H (1987) Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2068-2072.

Larsson LI, Rehfeld JF (1978) Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry* 58:23-31.

Larue C, Le Magnen J (1968) [Increase in hyperphagia and in obesity induced in rats by medioventral lesion of the hypothalamus under the effects of an ablation of the olfactory bulbs]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 267:2348-2351.

Le Magnen J (1999) Increased food intake induced in rats by changes in the satiating sensory input from food (first published in French in 1956). *Appetite* 33:33-35.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635.

Leung CT, Coulombe PA, Reed RR (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10:720-726.

Li C, Friedman JM (1999) Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9677-9682.

Li C, Ioffe E, Fidahusein N, Connolly E, Friedman JM (1998) Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice. *J Biol Chem* 273:10078-10082.

Li HY, Hwang HW, Hu YH (2002) Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 323:203-206.

- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA (1985) Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 75:1144-1152.
- Lin HC, Chey WY (2003) Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept* 114:131-135.
- Linster C, Hasselmo ME (1999) Behavioral responses to aliphatic aldehydes can be predicted from known electrophysiological responses of mitral cells in the olfactory bulb. *Physiol Behav* 66:497-502.
- Linster C, Johnson BA, Morse A, Yue E, Leon M (2002) Spontaneous versus reinforced olfactory discriminations. *J Neurosci* 22:6842-6845.
- Linster C, Johnson BA, Yue E, Morse A, Xu Z, Hingco EE, Choi Y, Choi M, Messiha A, Leon M (2001) Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers. *J Neurosci* 21:9837-9843.
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM, Elmquist JK (2003) Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23:7143-7154.
- Liu WL, Shipley MT (1994) Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol* 346:541-558.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lobel D, Jacob M, Volkner M, Breer H (2002) Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes. *Chem Senses* 27:39-44.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288:2379-2381.
- Lorenz DN, Goldman SA (1982) Vagal mediation of the cholecystokinin satiety effect in rats. *Physiol Behav* 29:599-604.
- Louis-Sylvestre J (1976) Preabsorptive insulin release and hypoglycemia in rats. *Am J Physiol* 230:56-60.
- Louis-Sylvestre J, Le Magnen J (1980) Fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neurosci Biobehav Rev* 4 Suppl 1:13-15.
- Lu XC, Slotnick BM (1998) Olfaction in rats with extensive lesions of the olfactory bulbs: implications for odor coding. *Neuroscience* 84:849-866.

Lubow RE, Moore AU (1959) Latent inhibition: the effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus. *J Comp Physiol Psychol* 52:415-419.

M

Mainen ZF (2006) Behavioral analysis of olfactory coding and computation in rodents. *Curr Opin Neurobiol* 16:429-434.

Mainland J, Sobel N (2006) The sniff is part of the olfactory percept. *Chem Senses* 31:181-196.

Mandairon N, Sultan S, Rey N, Kermen F, Moreno M, Busto G, Farget V, Messaoudi B, Thevenet M, Didier A (2009) A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *J Neurosci Methods* 180:296-303.

Manin M, Balage M, Larue-Achagiotis C, Grizard J (1988) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin failed to alter brain insulin-binding sites, food intake, and body weight. *J Neurochem* 51:1689-1695.

Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA (2009) Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:6734-6751.

Marks JL, Porte D, Jr., Stahl WL, Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127:3234-3236.

Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24:389-397.

Martinez-Marcos A (2009) On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol* 87:21-30.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033.

Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T (2009) Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 450:186-190.

McClain DA (1992) Mechanism and role of insulin receptor endocytosis. *Am J Med Sci* 304:192-201.

- McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V (1978) A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue. *Gut* 19:767-774.
- McLaughlin CL, Baile CA (1980) Decreased sensitivity of Zucker obese rats to the putative satiety agent cholecystokinin. *Physiol Behav* 25:543-548.
- McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G, Reyher CK (1989) Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol* 285:339-349.
- Meguid MM, Gleason JR, Yang ZJ (1993) Olfactory bulbectomy in rats modulates feeding pattern but not total food intake. *Physiol Behav* 54:471-475.
- Meguid MM, Koseki M, Yang ZJ, Gleason JR, Laviano A (1997) Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. *Neuroreport* 8:1439-1444.
- Meisami E, Bhatnagar KP (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 43:476-499.
- Menco BP, Cunningham AM, Qasba P, Levy N, Reed RR (1997) Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study. *J Neurocytol* 26:691-706.
- Merali Z, Kateb CC (1993) Rapid alterations of hypothalamic and hippocampal bombesin-like peptide levels with feeding status. *Am J Physiol* 265:R420-425.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116.
- Mercer LD, Beart PM (2004) Immunolocalization of CCK1R in rat brain using a new anti-peptide antibody. *Neurosci Lett* 359:109-113.
- Mercer LD, Le VQ, Nunan J, Jones NM, Beart PM (2000) Direct visualization of cholecystokinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. *Neurosci Lett* 293:167-170.
- Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV (1982) Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat* 165:385-396.
- Meshulam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL (1998) Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Neurol* 55:84-90.

- Migita K, Loewy AD, Ramabhadran TV, Krause JE, Waters SM (2001) Immunohistochemical localization of the neuropeptide Y Y1 receptor in rat central nervous system. *Brain Res* 889:23-37.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1983) Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 114:541-548.
- Miranda MI, Ferreira G, Ramirez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11417-11422.
- Miro JL, Canguilhem B, Schmitt P (1980) Effects of bullectomy on hibernation, food intake and body weight in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Physiol Behav* 24:859-862.
- Miro JL, Canguilhem B, Schmitt P, Koch A (1982) Hyperphagia and obesity after olfactory bullectomy performed at different times of the year in the European hamster. *Physiol Behav* 29:681-685.
- Miselis RR, Epstein AN (1975) Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *Am J Physiol* 229:1438-1447.
- Mitchell SE, Nogueiras R, Rance K, Rayner DV, Wood S, Dieguez C, Williams LM (2006) Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats. *J Endocrinol* 190:571-579.
- Mizrahi A, Katz LC (2003) Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:1201-1207.
- Mizuno TM, Mobbs CV (1999) Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 140:814-817.
- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV (1998) Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47:294-297.
- Mizuno Y, Oomura Y (1984) Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 307:109-116.
- Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS (1989) Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 3:1263-1269.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.

- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T, Matsukura S (1999) Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci Lett* 273:45-48.
- Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M (2005) Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept* 126:55-59.
- Moody TW, Getz R, O'Donohue TL, Rosenstein JM (1988) Localization of receptors for bombesin-like peptides in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 547:114-130.
- Moran TH, Baldessarini AR, Salorio CF, Lowery T, Schwartz GJ (1997) Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol* 272:R1245-1251.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140:5995-5998.
- Mori K, Kishi K, Ojima H (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol* 219:339-355.
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y (1999) The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715.
- Moriizumi T, Tsukatani T, Sakashita H, Miwa T (1994) Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience* 61:733-738.
- Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA (1990) Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J* 9:2409-2413.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8:1298-1308.
- Mugnaini E, Oertel WH, Wouterlood FF (1984) Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett* 47:221-226.
- Muroya S, Yada T, Shioda S, Takigawa M (1999) Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci Lett* 264:113-116.

N

- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243-260.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381-390.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416:199-202.
- Newman R, Winans SS (1980) An experimental study of the ventral striatum of the golden hamster. II. Neuronal connections of the olfactory tubercle. *J Comp Neurol* 191:193-212.
- Nickell WT, Behbehani MM, Shipley MT (1994) Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Res Bull* 35:119-123.
- Nicolaidis S, Rowland N (1976) Metering of intravenous versus oral nutrients and regulation of energy balance. *Am J Physiol* 231:661-668.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231.
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM (2004) Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 53:2552-2558.

O

- Obici S, Zhang BB, Karkanas G, Rossetti L (2002a) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8:1376-1382.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L (2002b) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51:271-275.
- Obrebowski A, Obrebowska-Karsznia Z, Gawlinski M (2000) Smell and taste in children with simple obesity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 55:191-196.

Oetting RL, Vanderweele DA (1985) Insulin suppresses intake without inducing illness in sham feeding rats. *Physiol Behav* 34:557-562.

Ohki-Hamazaki H (2000) Neuromedin B. *Prog Neurobiol* 62:297-312.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138.

Oohara M, Negishi M, Shimizu H, Sato N, Mori M (1993) Alpha-melanocyte stimulating hormone (MSH) antagonizes the anorexia by corticotropin releasing factor (CRF). *Life Sci* 53:1473-1477.

Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ (1969) Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222:282-284.

P

Pager J (1974) A selective modulation of the olfactory bulb electrical activity in relation to the learning of palatability in hungry and satiated rats. *Physiol Behav* 12:189-195.

Pager J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J (1972) A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 9:573-579.

Palkovits M, Mezey E, Eskay RL (1987) Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res* 436:323-338.

Palmerino CC, Rusiniak KW, Garcia J (1980) Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 208:753-755.

Pangborn RM, Witherly SA, Jones F (1979) Parotid and whole-mouth secretion in response to viewing, handling, and sniffing food. *Perception* 8:339-346.

Parker RM, Herzog H (1999) Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci* 11:1431-1448.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.

Perrin D, Soulage C, Pequignot JM, Geloën A (2003) Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 46:1489-1496.

- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Schobitz K, Pelaez B, Amat P, Rodriguez EM (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* 132:10-26.
- Pes D, Pelosi P (1995) Odorant-binding proteins of the mouse. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112:471-479.
- Pevsner J, Reed RR, Feinstein PG, Snyder SH (1988) Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science* 241:336-339.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015.
- Phillips RJ, Powley TL (2000) Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 34:1-26.
- Pinching AJ, Powell TP (1971a) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305-345.
- Pinching AJ, Powell TP (1971b) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:347-377.
- Plata-Salaman CR, Oomura Y (1986) Effect of intra-third ventricular administration of insulin on food intake after food deprivation. *Physiol Behav* 37:735-739.
- Plata-Salaman CR, Oomura Y, Shimizu N (1986) Dependence of food intake on acute and chronic ventricular administration of insulin. *Physiol Behav* 37:717-734.
- Plum L et al. (2006) Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *J Clin Invest* 116:1886-1901.
- Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E (1988) Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81:442-448.
- Price JL, Powell TP (1970a) The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:91-123.
- Price JL, Powell TP (1970b) The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:631-651.
- Price JL, Powell TP (1970c) The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:125-155.
- Price JL, Powell TP (1971) Certain observations on the olfactory pathway. *J Anat* 110:105-126.

Price JL, Slotnick BM (1983) Dual olfactory representation in the rat thalamus: an anatomical and electrophysiological study. *J Comp Neurol* 215:63-77.

Price JL, Slotnick BM, Reval MF (1991) Olfactory projections to the hypothalamus. *J Comp Neurol* 306:447-461.

Primeaux SD, Barnes MJ, Bray GA (2007) Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behav Brain Res* 180:190-196.

Prud'homme MJ, Lacroix MC, Badonnell K, Gougis S, Baly C, Salesse R, Caillol M (2009) Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience* 162:1287-1298.

Q

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.

Quirk MC, Sosulski DL, Feierstein CE, Uchida N, Mainen ZF (2009) A defined network of fast-spiking interneurons in orbitofrontal cortex: responses to behavioral contingencies and ketamine administration. *Front Syst Neurosci* 3:13.

R

Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R (2003) Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17:350-358.

Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73:597-609.

Ricardo JA, Koh ET (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26.

Richardson BE, Vander Woude EA, Sudan R, Thompson JS, Leopold DA (2004) Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obes Surg* 14:967-969.

- Rolls BJ, Van Duijvenvoorde PM, Rolls ET (1984) Pleasantness changes and food intake in a varied four-course meal. *Appetite* 5:337-348.
- Rolls BJ, Rolls ET, Rowe EA, Sweeney K (1981) Sensory specific satiety in man. *Physiol Behav* 27:137-142.
- Rolls ET, Rolls JH (1997) Olfactory sensory-specific satiety in humans. *Physiol Behav* 61:461-473.
- Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD (1993) Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8856-8860.
- Rowland NE, Nasrallah NA, Robertson KL (2004) LiCl-induced flavor avoidance compared between rats and mice using a nondeprivation protocol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R260-268.
- Rowland NE (2007) Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp Med* 57:149-160.
- Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H (1988) Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270:559-568.
- Royet JP, Distel H, Hudson R, Gervais R (1998) A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res* 788:35-42.

S

-
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23:531-536.
- Sakurai T et al. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

- Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD (1990) Increased hypothalamic content of preproneuroptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127:730-737.
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ (2008) The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol* 70:513-535.
- Sassoe-Pognetto M, Ottersen OP (2000) Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 20:2192-2201.
- Saucier D, Astic L (1986) Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Res Bull* 16:455-462.
- Savigner A, Duchamp-Viret P, Grosmaître X, Chaput M, Garcia S, Ma M, Palouzier-Paulignan B (2009) Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J Neurophysiol* 101:2898-2906.
- Schiffman SS (1998) Sensory enhancement of foods for the elderly with monosodium glutamate and flavors *Food Reviews International* 14:321-333.
- Schiffman SS (2000) Intensification of sensory properties of foods for the elderly. *J Nutr* 130:927S-930S.
- Schiffman SS, Warwick ZS (1993) Effect of flavor enhancement of foods for the elderly on nutritional status: food intake, biochemical indices, and anthropometric measures. *Physiol Behav* 53:395-402.
- Schiffman SS, Graham BG (2000) Taste and smell perception affect appetite and immunity in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 54 Suppl 3:S54-63.
- Schild D, Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78:429-466.
- Schneider RA, Wolf S (1955) Olfactory perception thresholds for citral utilizing a new type olfactorium. *Journal of applied physiology* 8:337-342.
- Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK, Caro JF (1997) Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest* 100:1882-1887.
- Schoenfeld TA, Marchand JE, Macrides F (1985) Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol* 235:503-518.
- Schreder T, Albrecht J, Kleemann AM, Schopf V, Kopietz R, Anzinger A, Demmel M, Linn J, Pollatos O, Wiesmann M (2008) Olfactory performance of patients with anorexia nervosa and healthy subjects in hunger and satiety. *Rhinology* 46:175-183.

- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr. (1992a) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414.
- Schwartz MW, Figlewicz DF, Kahn SE, Baskin DG, Greenwood MR, Porte D, Jr. (1990a) Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides* 11:467-472.
- Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ, Jr., Bergman RN, Woods SC, Porte D, Jr. (1990b) Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 259:E378-383.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. (1992b) Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608-3616.
- Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269:33-49.
- Sclafani A (2004) The sixth taste? *Appetite* 43:1-3.
- Scott JW (1981) Electrophysiological identification of mitral and tufted cells and distributions of their axons in olfactory system of the rat. *J Neurophysiol* 46:918-931.
- Scott JW, McBride RL, Schneider SP (1980) The organization of projections from the olfactory bulb to the piriform cortex and olfactory tubercle in the rat. *J Comp Neurol* 194:519-534.
- Scott JW, Acevedo HP, Sherrill L, Phan M (2007) Responses of the rat olfactory epithelium to retronasal air flow. *J Neurophysiol* 97:1941-1950.
- Scott JW, Ranier EC, Pemberton JL, Orona E, Mouradian LE (1985) Pattern of rat olfactory bulb mitral and tufted cell connections to the anterior olfactory nucleus pars externa. *J Comp Neurol* 242:415-424.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW (1997) Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 390:349.
- Seguy M, Perret M (2005) Changes in olfactory inputs modify the energy balance response to short days in male gray mouse lemurs. *Physiol Behav* 84:23-31.
- Seino S, Bell GI (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159:312-316.
- Serizawa S, Ishii T, Nakatani H, Tsuboi A, Nagawa F, Asano M, Sudo K, Sakagami J, Sakano H, Ijiri T, Matsuda Y, Suzuki M, Yamamori T, Iwakura Y (2000) Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat Neurosci* 3:687-693.

- Seroogy KB, Brecha N, Gall C (1985) Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:373-383.
- Shepherd GM (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52:864-917.
- Shibata M, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Suzuki H, Ueta Y (2008) Distribution of orexins-containing fibers and contents of orexins in the rat olfactory bulb. *Neurosci Res* 61:99-105.
- Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y (1998) Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243:41-44.
- Shibley MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12:669-688.
- Shibley MT, Halloran FJ, de la Torre J (1985) Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 329:294-299.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44:147-151.
- Slotnick B (2001) Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci* 5:216-222.
- Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC (1997) What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous odors and potentiation of taste by odors. *Animal Learning & Behaviour* 25:357-369.
- Smart D, Jerman J (2002) The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacol Ther* 94:51-61.
- Smithson KG, Weiss ML, Hatton GI (1989) Supraoptic nucleus afferents from the main olfactory bulb--I. Anatomical evidence from anterograde and retrograde tracers in rat. *Neuroscience* 31:277-287.
- Song C, Leonard BE (2005) The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:627-647.
- Sorensen LB, Moller P, Flint A, Martens M, Raben A (2003) Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:1152-1166.
- Soulage C, Zarrouki B, Soares AF, Lagarde M, Geloën A (2008) Lou/C obesity-resistant rat exhibits hyperactivity, hypermetabolism, alterations in white adipose tissue cellularity, and lipid tissue profiles. *Endocrinology* 149:615-625.

Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3:757-758.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530-532.

Steward O (1976) Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 167:285-314.

Strubbe JH, Porte D, Jr., Woods SC (1988) Insulin responses and glucose levels in plasma and cerebrospinal fluid during fasting and refeeding in the rat. *Physiol Behav* 44:205-208.

T

Taleux N, De Potter I, Deransart C, Lacraz G, Favier R, Leverve XM, Hue L, Guigas B (2008) Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity. *Int J Obes (Lond)* 32:639-647.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.

Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R, Cambillau C (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1482:229-240.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15:80-101.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-75.

Trombley PQ, Shepherd GM (1992) Noradrenergic inhibition of synaptic transmission between mitral and granule cells in mammalian olfactory bulb cultures. *J Neurosci* 12:3985-3991.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.

Turner P, Patterson DS (1967) Smell threshold as a test of central nervous function. *Acta otolaryngologica* 62:149-156.

U

Uchida N, Mainen ZF (2003) Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 6:1224-1229.

Unger J, McNeill TH, Moxley RT, 3rd, White M, Moss A, Livingston JN (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31:143-157.

V

Vassar R, Ngai J, Axel R (1993) Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74:309-318.

Veyrac A, Nguyen V, Marien M, Didier A, Jourdan F (2007) Noradrenergic control of odor recognition in a nonassociative olfactory learning task in the mouse. *Learn Mem* 14:847-854.

Vicentic A, Lakatos A, Jones D (2006) The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 27:1934-1937.

Volkow ND, Wise RA (2005) How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* 8:555-560.

W

Wachowiak M, Shipley MT (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411-423.

Wada E, Way J, Lebacqz-Verheyden AM, Battey JF (1990) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *J Neurosci* 10:2917-2930.

Wada E, Wray S, Key S, Battey J (1992) Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in postnatal rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 3:446-460.

Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (1998a) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93:47-60.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998b) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-688.

- Watts AG (1999) Dehydration-associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol Behav* 65:871-878.
- Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB (1999) Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci* 19:6111-6121.
- Watts AG (2000) Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm Behav* 37:261-283.
- Wellendorph P, Johansen LD, Brauner-Osborne H (2009) Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Mol Pharmacol* 76:453-465.
- Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FA (1987) Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using *in vitro* autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121:1562-1570.
- White BD, He B, Dean RG, Martin RJ (1994) Low protein diets increase neuropeptide Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr* 124:1152-1160.
- Whitman MC, Greer CA (2009) Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89:162-175.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306-316.
- Willhite DC, Nguyen KT, Masurkar AV, Greer CA, Shepherd GM, Chen WR (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12592-12597.
- Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GC, Lowe G, Gaggar A, Xia Z, Gold GH, Storm DR (2000) Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27:487-497.
- Woods SC, D'Alessio DA (2008) Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S37-50.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Woods SC, Stein LJ, McKay LD, Porte D, Jr. (1984) Suppression of food intake by intravenous nutrients and insulin in the baboon. *Am J Physiol* 247:R393-401.

Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W (2006) Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1219-1235.

Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184:291-318.

Wyss JM (1981) An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 199:495-512.

Y

Yamamoto Y, Ueta Y, Yamashita H, Asayama K, Shirahata A (2002) Expressions of the prepro-orexin and orexin type 2 receptor genes in obese rat. *Peptides* 23:1689-1696.

Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849:248-252.

Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T (2000) Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859:404-409.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701-713.

Yang Z (2008) Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular interneurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 506:347-358.

Yokoi M, Mori K, Nakanishi S (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3371-3375.

Young WS, 3rd (1986) Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides* 8:93-97.

Z

Zafra MA, Molina F, Puerto A (2006) The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1032-1044.

- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schonert BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW (1997) Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387:206-209.
- Zhang X, Firestein S (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5:124-133.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH (2007) Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 56:1647-1654.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494:528-548.
- Zilstorff-Pedersen K (1955) Olfactory threshold determinations in relation of food intake. *Acta oto-laryngologica* 45:86-91.
- Zou DJ, Chesler A, Firestein S (2009) How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat Rev Neurosci* 10:611-618.
- Zou Z, Horowitz LF, Montmayeur JP, Snapper S, Buck LB (2001) Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* 414:173-179.
- Zucker LM, Zucker TF (1961) Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 52:275-278.
- Zucker LM, Antoniades HN (1972) Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90:1320-1330.
- Zufall F, Leinders-Zufall T (2007) Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* 17:483-489.