



**HAL**  
open science

# Modulation par le jeûne de la représentation spatiotemporelle d'une odeur de nourriture et d'une odeur nouvelle dans le bulbe olfactif du rat

Mounir Bendahmane

► **To cite this version:**

Mounir Bendahmane. Modulation par le jeûne de la représentation spatiotemporelle d'une odeur de nourriture et d'une odeur nouvelle dans le bulbe olfactif du rat. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA11T050 . tel-00737493v2

**HAL Id: tel-00737493**

**<https://theses.hal.science/tel-00737493v2>**

Submitted on 2 Oct 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.



## **UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Ecole doctorale 419 : Biosigne, signalisation et réseaux intégratifs en biologie

Faculté de Médecine Paris-Sud

Thèse Présentée par

**Mounir BENDAHMANE**

Pour l'obtention du diplôme de doctorat

Spécialité : Neurosciences

### **MODULATION PAR LE JEÛNE DE LA REPRESENTATION SPATIOTEMPORELLE D'UNE ODEUR DE NOURRITURE ET D'UNE ODEUR NOUVELLE DANS LE BULBE OLFACTIF DE RAT**

Présentation et Soutenance publique le :

29 septembre 2011

Directeur de thèse : HIRAC GURDEN

#### **Membres du Jury :**

Christine Baly  
Nathalie Buonviso  
Frédérique Datiche  
Sylvie Granon  
Hirac Gurden  
Christophe Magnan

Co-directrice de thèse  
Rapporteur  
Examineur  
Présidente du jury  
Directeur de thèse  
Rapporteur

## Liste des abréviations

|          |   |
|----------|---|
| 5HT      | 5-Hydroxytryptamine / Sérotonine                              |
| 2-AG     | 2-arachidonoylglycérol  |
| 2-DG     | 2-DesoxyGlucose   |
| AA       | Acides Aminés   |
| AEA      | N-arachidonoyléthanolamide ou anandamide                      |
| AG       | Acides Gras   |
| AgRP     | Agouti Related Peptide  |
| AMPA     | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate         |
| AMPc     | Adénosine Monophosphate cyclique                              |
| AON      | Anterior Olfactory Nucleus / Noyau Olfactif Antérieur         |
| APV      | Acide 2-amino-5-phosphonoalérrique                            |
| ARC      | Noyau arqué   |
| ATP      | Adénosine Triphosphate  |
| BCA      | Acide bicinchonique   |
| BDNF     | Brain Derived Neurotrophic Factor                             |
| BO       | Bulbe Olfactif  |
| BOLD     | Blood Oxygenation Level-Dependent                             |
| BSA      | Bovin Serum Albumin   |
| CART     | cocaine- and amphetamine regulated transcript                 |
| CCK      | Cholécystokinine  |
| Ct       | Cycle threshold   |
| Cx30     | Connexines 30   |
| DAB      | DiaminoBenzidine  |
| DAPI     | 4',6'-diamidino-2-phénylindole                                |
| DMN      | Dorsomedial Nucleus / Noyau Dorsomédian                       |
| ECB      | Endocannabinoïdes   |
| EDTA     | Acide Ethylène Diamine Tétracétique                           |
| EGTA     | Ethylenediaminetetraacetic acid                               |
| EPL      | External Plexiform Layer / Couche Plexiforme Externe          |
| ETC      | External Tufted Cells / Cellules à Panache Externe            |
| FITC     | Fluoresceine Iso Thio Cyanate                                 |
| GABA     | Acide Gamma-AminoButyrique                                    |
| GC       | Granular Cells / Cellules granulaires                         |
| GCL      | Granular Cell Layer / Couche des Cellules Granulaires         |
| GFAP     | Glial Fibrillary Acidic Protein                               |
| GHS-R    | Récepteurs à la ghréline                                      |
| GL       | Glomerular layer / Couche Glomérulaire                        |
| GLAST    | Glial High-Affinity Glutamate Transporter                     |
| GLP1     | Glucagon Like Peptide   |
| GLT1     | Glutamate Transporter1  |
| GLUT     | Transporteur de glucose                                       |
| i.c.v    | intracérébro-ventriculaire                                    |
| i.p.     | intra péritonéale   |
| Ins R    | Récepteurs à l'insuline                                       |
| IOSI     | Imagerie Optique du Signal Intrinsèque                        |
| IP3      | Inositol TriPhosphate   |
| IPL      | Internal Plexiform Layer / Couche Plexiforme Interne          |
| IRMf     | Imagerie par Résonance Magnétique Fonctionnelle               |
| JAK/STAT | Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription |
| JC       | Juxtglomerular Cells / Cellules Juxtglomérulaires             |
| LFP      | Local Field Potential / Potentiel de Champ Local              |

|             |  |
|-------------|--|
| LHA         | Lateral Hypothalamic Area / Aire hypothalamique latérale                     |
| LOT         | Lateral Olfactory Tract / Tractus Olfactif Latéral                           |
| MAP kinases | Mitogen-Activated Protein kinases  |
| MCH         | Melanin Concentrating Hormone  |
| MCL         | Mitral Cell Layer / Couche des Cellules Mitrales                             |
| mGluR       | Récepteurs métabotropiques au glutamate                                      |
| MO          | Muqueuse Olfactive   |
| M/TC        | Mitral and Tufted Cells / Cellules Mitrales et à Panache                     |
| NBQX        | 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione              |
| NMDA        | N-Methyl-D-aspartic acid   |
| NPY         | Neuro-Peptide Y  |
| NTS         | Noyau du Tractus Solitaire   |
| ObR         | Récepteurs à la leptine  |
| OMP         | Olfactory Marker Protein   |
| ONL         | Olfactory Nerve Layer / Couche du Nerf Olfactif                              |
| OSN         | Olfactory Sensory Neurons / Neurones Sensoriels Olfactifs                    |
| PYY         | Peptide Tyrosine Tyrosine  |
| PBS         | Phosphate Buffer Solution  |
| PGC         | PeriGlomerular Cells / Cellules Périglomérulaires                            |
| PMSF        | phenylmethanesulfonylfluoride  |
| POMC        | Cocaine- and amphetamine regulated transcript                                |
| PVN         | Paraventricular Nucleus / Noyau Paraventriculaire                            |
| RMS         | Rostral Migratory Stream   |
| RO          | Récepteurs aux Odeurs  |
| ROI         | Region of Interest/ Région d'intérêt   |
| RT-PCR      | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction                              |
| SAC         | Short Axon Cells / Cellules à Axone Court                                    |
| SNC         | Système Nerveux Central  |
| SpH         | Synapto-pHluorine  |
| SVZ         | Sub Ventricular Zone   |
| THC         | $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol   |
| TTX         | Tetrodotoxine  |
| VMN         | Ventromedial Nucleus / Noyau ventromédian                                    |
| VSDI        | Voltage Sensitive Dyes Imaging / Imagerie par Colorants Sensibles au Voltage |

## **Abstract**

Olfactory cues are important for many vital functions as reproduction, social interactions, food detection and feeding behavior. However, the nutritional impact on the olfactory system has not been precisely described. Here we studied the effects of fasting on the spatiotemporal activities in the main olfactory bulb (OB), a structure supporting the first step of odor coding in the brain.

Odorant signals undergo a complex processing that starts in the Main Olfactory Epithelium where the olfactory sensitive neurons (OSN) are located. OSN project into the OB where odorant features (among them identity and concentration) evoke spatiotemporal patterns of activities located respectively at the glomerular and mitral/granule cells levels. The spatial coding at the glomerular level is classically studied by optical imaging of odor-evoked activities on the surface of the MOB in response to different odors at different concentrations. The temporal coding is characterized by specific variations in the oscillatory activity of the Local Field Potential (LFP) in deeper layers.

We tested odor responses in the OB in 17 hours-fasted rats compared to ad libitum-fed rats. We used two olfactory stimuli at different concentrations: the first one (almond aroma odor) is associated to food since it is incorporated into a homemade cake that rats love to eat; the second is the pure odorant hexanal which is new and neutral for them. Using these odorants at low concentrations to probe threshold modifications, we analyzed both types of OB coding (spatial and temporal) at the levels where they occur (glomerular layer and mitral/granule cell layers respectively) in anesthetized rats. Using intrinsic optical signals imaging and local field potential recording, we observed that odor maps and changes in oscillatory patterns of activity in the OB are present for both types of stimuli at low concentrations in all fasted rats but not in all fed animals. For higher odor concentrations, further fed animals responded. We conclude that fasting deeply impacts the overall odor threshold detection in the OB.

Then, we sought to identify putative molecular candidates that could trigger this olfactory plasticity in fasted conditions. We have checked the variation of receptor expression for leptin and insulin, two anorexigen hormones, in the OB but did not find any significant changes between the two groups. In addition, i.p. injection of leptin did not reverse the oscillatory profile induced in fasted rats. We concluded that leptin does not act solely in signalling the nutritional state that induces the OB plasticity. We are still looking for specific modifications of OB circuits during fasting and we present interesting preliminary data about astrocytic plasticity in this manuscript. Finally, we have also run a new and exciting project dealing with the role of endocannabinoids in food intake: since THC, a potent agonist of endocannabinoids CB1 receptors which are expressed in the OB, selectively increases food intake when injected at low doses, we tested its effects on the OB oscillatory activity in fasted mice. We found that THC inhibits olfactory desensitization that is triggered in control mice by repeated odor presentation.

## Résumé

L'olfaction est importante pour de nombreuses fonctions vitales comme la reproduction, les interactions sociales, la détection des aliments et le comportement alimentaire. Toutefois, l'impact nutritionnel sur le système olfactif n'a pas été précisément décrit. Dans ce contexte, le sujet de cette thèse consistait en l'étude des effets du jeûne sur la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le bulbe olfactif principal (BO), une structure assurant la première étape du codage de l'information olfactive dans le cerveau.

Dans le BO, les caractéristiques des molécules odorantes sont représentées sous forme d'activité spatiale et temporelle respectivement dans la couche glomérulaire et celles des cellules mitrales et granulaires. Pour étudier le codage spatial au niveau glomérulaire, nous avons utilisé l'imagerie optique du signal intrinsèque qui permet de cartographier l'activité évoquée sur la surface du BO en réponse à des odeurs. Pour étudier le codage temporel des odeurs, nous avons enregistré les variations spécifiques de l'activité oscillatoire du potentiel de champ local (LFP) dans les couches profondes. Nous avons testé les réponses aux odeurs chez des rats mis à jeun pendant 17 heures par rapport aux rats nourris ad libitum. Nous avons utilisé deux stimuli olfactifs à des concentrations différentes: la première (odeur commerciale d'arôme d'amande) est associée à la nourriture car elle est préalablement incorporée dans une pâte sucrée présentée aux rats quotidiennement ; le second (hexanal), est une molécule odorante pure, nouvelle et neutre pour eux. L'utilisation de ces odeurs dans une gamme de concentrations faibles nous a permis d'étudier les modifications de seuil d'activation du BO. Nous avons analysé les deux types de représentation spatiale et temporelle chez des rats anesthésiés, à jeun versus nourris. Nous avons observé que les cartes spatiales et les changements des profils oscillatoires évoqués dans le BO sont présents pour les deux types de stimuli à de faibles concentrations chez tous les rats à jeun mais pas chez tous les animaux nourris. Par contre, pour les fortes concentrations d'odeurs, nous avons observé plus de réponses chez les animaux nourris. Nous avons conclu que le jeûne affecte profondément le seuil d'activation spatiotemporelle du BO.

Nous avons alors cherché à identifier les candidats moléculaires qui pourraient déclencher cette plasticité olfactive à jeun. Nous avons analysé dans le BO la variation de l'expression des récepteurs à deux hormones satiétogènes, la leptine et l'insuline, mais n'avons pas trouvé de changement significatif entre les deux groupes de rats. En outre, l'injection intrapéritonéale de leptine n'a pas inversé le profil oscillatoire induit chez des rats à jeun. Nous avons conclu que la leptine n'agit pas à elle seule dans la signalisation de l'état nutritionnel qui induit la plasticité bulbaire. Nous avons également cherché des modifications spécifiques des circuits du BO pendant le jeûne et avons obtenu des données préliminaires intéressantes sur la plasticité astrocytaire. Enfin, nous avons mené un nouveau projet sur le rôle des endocannabinoïdes dans la prise alimentaire. Le THC est un agoniste des récepteurs CB1 aux endocannabinoïdes qui induit une hyperphagie. Les CB1 étant présents dans le BO, nous avons testé ses effets sur l'activité oscillatoire chez des souris à jeun. Nous avons trouvé que le THC inhibe la désensibilisation olfactive qui est déclenchée chez les souris contrôles par la présentation d'odeurs répétées.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Chapitre I : Le système olfactif</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>I. Description anatomofonctionnelle du système olfactif</b> .....   | <b>13</b> |
| I.1. La Muqueuse Olfactive .....   | 14        |
| I.1.1. Anatomie de la MO .....   | 14        |
| I.1.2. Définition d'une molécule odorante et transduction du message olfactif par les OSN.....   | 17        |
| I.1.3. Connexions principales de la MO .....   | 18        |
| I.2. Le bulbe olfactif principal .....   | 19        |
| I.2.1. Anatomie du BO .....  | 19        |
| I.2.2. Types cellulaires du BO .....   | 20        |
| I.3. Connexions principales du BO .....  | 24        |
| I.4. Répartition de l'activité dans le BO .....  | 25        |
| <b>II - Le codage spatial dans le BO</b> .....   | <b>27</b> |
| II.1. Techniques d'étude de la représentation spatiale des odeurs.....   | 27        |
| II.1.1. Cartographies par utilisation des propriétés métaboliques et vasculaires .....   | 27        |
| II.1.2. Cartographie par utilisation de traceurs exogènes dépendants de l'activité .....   | 31        |
| II.1.3. Cartographie par utilisation de souches d'animaux transgéniques .....  | 33        |
| II.1.4. Autres techniques en cours de développement pour l'étude du codage spatial dans le BO  | 34        |
| II.2. Caractéristiques des cartes d'activation glomérulaires .....   | 35        |
| II.3. Aspect temporel des cartes d'activation glomérulaires .....  | 40        |
| <b>III. Le codage temporel dans le BO</b> .....  | <b>42</b> |
| III.1. Les oscillations du LFP dans le BO en activité spontanée et en réponse aux odeurs.....  | 44        |
| III.1.1. Les oscillations thêta ou la modulation respiratoire .....  | 44        |
| III.1.2. Les oscillations bêta .....   | 46        |
| III.1.3. Les oscillations gamma .....  | 47        |
| III.1.4. Les réponses oscillatoires aux odeurs.....  | 48        |
| III.2. Codage temporel des odeurs par assemblées de neurones : activité unitaire et synchronisation .....                                      | 52        |
| III.3. Plasticité du codage temporel des odeurs .....  | 57        |
| <b>Chapitre II. Régulation de la prise alimentaire par les systèmes périphériques et centraux.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>I. Signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.....</b>  | <b>63</b> |
| I.1. Les nutriments .....  | 63        |
| I.1.1. Production des nutriments par digestion des aliments .....  | 63        |
| I.1.2. Glucose et acides gras circulants comme signaux détectés par le cerveau .....   | 64        |
| I.2. Les peptides du tube digestif.....  | 64        |
| I.2.1 La Cholecystokinine CCK .....  | 65        |
| I.2.2 Le Peptide tyrosine tyrosine PYY .....   | 65        |
| I.2.3 Le Glucagon like peptide .....   | 65        |
| I.3. Les hormones .....  | 65        |
| I.3.1. La ghréline .....   | 65        |
| I.3.2. L'insuline .....  | 66        |
| I.3.3. La leptine.....   | 66        |
| <b>II. Régulation centrale de la prise alimentaire</b> .....   | <b>68</b> |
| II.1. Structures cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.....   | 68        |
| II.1.1. Les noyaux hypothalamiques.....  | 68        |
| II.1.2. Les neuropeptides hypothalamiques .....  | 70        |
| II.1.3. Autres structures du système limbique et le noyau du tractus solitaire .....   | 72        |
| II.2. Fonctionnement intégré de la signalisation périphérique et de la signalisation centrale dans la régulation de la prise alimentaire ..... | 73        |
| <b>III. Un nouveau régulateur de la prise alimentaire : le système des endocannabinoïdes .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>III. Rôle des systèmes sensoriels dans la régulation de la prise alimentaire .....</b>  | <b>78</b> |
| III.1. Le sens gustatif.....   | 79        |

|  |            |
|--|------------|
| III.2. Le sens olfactif .....  | 80         |
| <b>Chapitre III. Problématique.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>Chapitre IV .....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>I. Animaux.....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>II. Protocole de restriction alimentaire .....</b>  | <b>91</b>  |
| <b>III. Reconnaissance de l'odeur alimentaire.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>IV Etude des effets du jeûne sur la représentation spatiale des odeurs dans le BO par imagerie optique du signal intrinsèque chez le rat.....</b> | <b>92</b>  |
| IV.1. Dispositif expérimental .....  | 92         |
| IV.1.1. Microscope.....  | 92         |
| IV.1.2. Source de lumière.....   | 92         |
| IV.1.3. Camera .....   | 92         |
| IV.1.4. Olfactomètre.....  | 93         |
| IV.1.5. Enregistrement des données .....   | 93         |
| IV.2. Protocole expérimental d'imagerie optique .....  | 94         |
| IV.2.1. Anesthésie des rats .....  | 94         |
| IV.2.2. Chirurgie pour accéder au BO.....  | 95         |
| IV.2.3. Stimulations olfactives .....  | 95         |
| IV.3. Traitement des résultats d'imagerie optique .....  | 96         |
| IV.3.1. Obtention des cartes d'activation .....  | 96         |
| IV.3.2. Décours temporels des signaux optiques.....  | 97         |
| <b>V. Etude des effets du jeûne, de la leptine et du THC sur le codage temporel dans le BO.....</b>  | <b>97</b>  |
| V.1. Dispositif expérimental.....  | 97         |
| V.2. Protocole expérimental d'électrophysiologie .....   | 98         |
| V.2.1. Anesthésie des rats et des souris.....  | 98         |
| V.2.2. Chirurgie.....  | 99         |
| V.2.3. Stimulations olfactives .....   | 99         |
| V.3. Traitement des résultats d'électrophysiologie .....   | 102        |
| V.3.1. Les cartes temps-fréquence .....  | 102        |
| V.3.2. Calcul des puissances des oscillations.....   | 102        |
| <b>VI. Etude des effets du jeûne sur l'expression de protéines astrocytaires (GFAP, Connexine 30, GLAST, GLT1).....</b>                              | <b>103</b> |
| VI.1. Protocole d'immunohistochimie .....  | 104        |
| VI.1.1. Perfusion .....  | 104        |
| VI.1.2. Coupes et montages.....  | 105        |
| VI.1.3. Marquages immunohistochimiques.....  | 105        |
| VI.1.4. Traitement des résultats.....  | 106        |
| VI.1.5. Le Western Blot .....  | 106        |
| VI.2. Protocole de biologie moléculaire.....   | 107        |
| VI.2.1. Prélèvement des échantillons .....   | 107        |
| VI.2.2. Dosages sanguins .....   | 107        |
| VI.2.3. Préparation des ARNs.....  | 107        |
| VI.2.4. PCR quantitatives en temps réel (PCRq) .....   | 108        |
| VI.2.5. Choix des couples d'amorces et validation de leur spécificité .....  | 108        |
| VI.2.6. Mesure d'expression en série.....  | 109        |
| VI.2.7. Analyse des données .....  | 110        |
| <b>Chapitre V – Résultats .....</b>  | <b>111</b> |
| <b>I. Étude des effets du jeûne sur le codage spatiotemporel dans le BO de rat.....</b>  | <b>113</b> |
| I.1. Effets du jeûne sur la physiologie des rats .....   | 113        |
| I.2. Reconnaissance de l'odeur alimentaire.....  | 113        |
| I.3. Effets du jeûne sur les cartes spatiales .....  | 114        |
| I.3.1. Effets du jeûne sur les cartes spatiales induites par une odeur alimentaire.....  | 114        |
| I.3.2. Effets du jeûne sur les cartes spatiales induites par une odeur non alimentaire.....  | 117        |
| I.3.3. Récapitulatif.....  | 118        |
| I.4. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires .....  | 118        |

|  |            |
|--|------------|
| I.4.1. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires à l'odeur alimentaire.....   | 119        |
| I.4.2. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires à l'odeur non alimentaire.....   | 123        |
| I.4.3. Récapitulatif.....  | 129        |
| I.5. Signaux du statut nutritionnel responsables de la plasticité du BO .....  | 130        |
| I.5.1. Effet du jeûne sur la transcription bulbaire des signaux du statut nutritionnel .....   | 130        |
| I.5.2. Effet de la leptine sur les réponses oscillatoires aux odeurs chez les animaux à jeun .....   | 131        |
| I.6. Récapitulatif général de l'étude des effets du jeûne sur le codage spatiotemporel dans le BO de rat.....  | 134        |
| <b>II. Etude de l'impact du jeûne sur les protéines astrocytaires du BO : une étude préliminaire</b>   | <b>134</b> |
| <b>III. Etude du rôle des récepteurs aux endocannabinoides CB1 sur le codage temporel des odeurs</b>   | <b>137</b> |
| <b>Chapitre VI. Discussion</b>   | <b>142</b> |
| <b>I. Choix techniques</b>   | <b>143</b> |
| I.1. Choix de l'odeur alimentaire.....   | 143        |
| I.2. Choix de la période de jeûne.....   | 144        |
| I.3 Choix de l'anesthésie .....  | 144        |
| I.4. Choix de la technique d'imagerie optique <i>in vivo</i> .....   | 144        |
| I.5. Choix de la technique d'enregistrement des oscillations des LFP <i>in vivo</i> .....  | 145        |
| <b>II. Plasticité des cartes spatiales induite par le statut nutritionnel pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire</b>                                | <b>145</b> |
| II.1. Hypothèses de mécanismes induisant la plasticité des cartes olfactives chez des rats à jeun .  | 145        |
| II.2. Les astrocytes glomérulaires : un candidat potentiel pour expliquer les changements de cartes olfactives chez les rats à jeun ?.....                           | 147        |
| II.3. Perspectives d'étude en imagerie.....  | 149        |
| <b>III. Plasticité de la représentation temporelle d'une odeur alimentaire et d'une odeur non alimentaire</b>  | <b>149</b> |
| III.1. Changements des profils oscillatoires chez les rats à jeun .....  | 150        |
| III.2. Hypothèses de mécanismes induisant la plasticité des profils oscillatoires chez des rats à jeun pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire ..... | 151        |
| <b>IV. Signaux responsables de la plasticité spatiotemporelle de la représentation des odeurs chez les animaux à jeun : leptine et ECB</b>                           | <b>155</b> |
| IV.1. Absence de modulation par la leptine .....   | 155        |
| IV.1.1. Effet à court et à long terme de la leptine.....   | 156        |
| IV.1.2. Action locale de la leptine sur les astrocytes du BO versus action sur les structures envoyant les fibres centrifuges sur le BO.....                         | 156        |
| IV.1.3. Perspectives d'étude en électrophysiologie.....  | 157        |
| IV.2. Modulation de l'activité du BO par les ECB .....   | 158        |
| IV.2.1. ECB et BO.....   | 158        |
| IV.2.2. Hypothèses concernant les mécanismes de désensibilisation induits par le THC.....  | 159        |
| IV.3. Une vue intégrée des mécanismes de régulation de l'activité du BO à jeun.....  | 161        |
| <b>Conclusion</b>  | <b>164</b> |
| <b>Références bibliographiques</b>   | <b>165</b> |
| <b>Index des figures</b>   | <b>187</b> |
| <b>Index des tableaux</b>  | <b>188</b> |
| <b>Annexe 1 : Publication, formations et enseignements</b>   | <b>189</b> |
| <b>Annexe 2 : Articles</b>   | <b>191</b> |

# Introduction

Le système olfactif est vital pour la plupart des mammifères : il permet la perception d'odeurs d'aliments, de prédateurs ou de congénères. Dans un milieu naturel, une activité soutenue des animaux consiste en la recherche de nourriture pour satisfaire leur besoin énergétique. Le système olfactif est constamment sollicité pour effectuer cette recherche et présente plusieurs caractéristiques qui en font un système cérébral activement impliqué dans la prise alimentaire.

Le bulbe olfactif (BO) est la structure cérébrale qui reçoit les informations des neurones olfactifs de la muqueuse olfactive (MO) chargés de détecter les molécules odorantes. Il est la première structure centrale qui traite l'information olfactive et présente les traits anatomofonctionnels communs aux différents cortex sensoriels primaires chargés de représenter les informations sensorielles dans le système nerveux central. Ces cortex sont constitués de modules fonctionnels qui ont la forme de colonnes cellulaires qui s'étendent sur plusieurs couches en profondeur : colonnes d'orientation visuelle, cortex somatosensoriel en tonneaux, ou encore l'ensemble constitué du glomérule et de sa colonne de cellules mitrales sous jacentes dans le BO. Deux dimensions au moins sont clairement utilisées dans les interactions cellulaires à l'intérieur de ces modules et vont permettre d'aboutir à un « code » cérébral de l'information sensorielle : l'espace et le temps. L'information sensorielle, après détection dans une toute première étape par des récepteurs sensoriels spécifiques (photorécepteurs de la rétine, vibrisses, récepteurs olfactifs de la muqueuse olfactive...) est distribuée ultérieurement parmi les modules fonctionnels dans différentes zones des cortex sensoriels : c'est la représentation spatiale de l'information détectée sous forme de cartes spatiales à la surface du cerveau (visuelles, somatosensorielles, olfactives...) par les techniques d'imagerie neurofonctionnelle. De plus, les activités synaptiques et les décharges cellulaires associées à ce traitement sont dynamiques dans le temps, peuvent se synchroniser et aboutir à des oscillations qui sont observables dans les enregistrements de potentiel de champ local dans le cortex visuel, somatosensoriel ou le BO. Le traitement sensoriel et plus particulièrement bulbaire consiste donc en une représentation spatiotemporelle des stimuli olfactifs. L'information envoyée par les neurones olfactifs de la MO est traitée et raffinée dans le BO et véhiculée rapidement vers les structures cérébrales faisant partie d'un réseau olfactif et limbique intégré constitué des cortex piriforme, orbitofrontal et entorhinal, l'hippocampe, l'amygdale ou l'hypothalamus, pour lui donner une identité, une valeur hédonique et participer en réponse à un comportement adéquat dont la prise alimentaire.

Chez l'être humain, mais aussi très probablement chez l'animal, la régulation de la prise alimentaire ne se limite pas strictement au contrôle de l'homéostasie énergétique par des facteurs circulants comme les nutriments, glucose et acides ou les hormones, comme l'insuline, la leptine ou la ghréline,

classiquement décrits dans la littérature. Ainsi, des notions de palatabilité et de plaisir dépendent grandement des informations sensorielles qui entrent en jeu et régulent les quantités d'aliments ingérées. Chez les animaux, dès les années 1950 Jacques Le Magnen a montré que l'odeur des aliments pouvait contrôler les quantités de nourriture consommée. A la fin des années 1960, l'alliesthésie, définie par le fait que la valeur hédonique des odeurs -notamment alimentaires- peut changer en fonction de l'état interne, est introduite dans la littérature par Michel Cabanac. En y pensant, nous avons tous conscience de ces changements sensoriels : une odeur alimentaire nous est plus agréable lorsque nous avons faim qu'après un repas copieux. Ceci suppose que le système olfactif et ses différents relais ne fonctionnent pas de la même façon dans une situation de faim par rapport à une situation de satiété, donc qu'il existe une plasticité de ce système suivant le statut nutritionnel.

La compréhension des différents mécanismes du système nerveux central régulant la prise alimentaire est une des grandes préoccupations de la société civile et de la communauté scientifique face à la pandémie mondiale des maladies liées aux troubles du comportement alimentaire comme l'obésité. Cette thèse a consisté plus spécifiquement en l'étude des effets du statut nutritionnel sur la représentation spatiotemporelle des odeurs au niveau du BO chez le rongeur. Les travaux ont été menés dans le cadre d'une collaboration entre deux unités : le laboratoire interdisciplinaire d'Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie (IMNC-UMR8165, CNRS, Orsay) et le laboratoire de Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie (NOeMI, INRA, Jouy).

Nous avons étudié l'effet du jeûne sur l'activation du BO chez des rats anesthésiés en nous intéressant aux seuils d'activation spatiotemporelle d'une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire chez le rat. Nous avons également cherché des pistes moléculaires responsables de la plasticité du BO comme par exemple l'effet du jeûne sur la transcription des récepteurs aux hormones du statut nutritionnel comme la leptine. Nous avons également testé l'effet de la leptine sur la représentation temporelle d'une odeur alimentaire chez des rats à jeun. Enfin, dans une étude parallèle et en collaboration avec l'équipe « Endocannabinoïdes et Neuroadaptation » du Neurocentre Magendie de Bordeaux qui a montré un fort effet du delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) sur la prise alimentaire, nous avons analysé les effets de cette molécule sur la représentation temporelle des odeurs chez la souris.

Dans ce manuscrit, nous présenterons en introduction une revue bibliographique exposant l'organisation et le fonctionnement du système olfactif (chapitre I) suivie d'un descriptif des différentes voies de régulation de la prise alimentaire (chapitre II). Dans ce contexte scientifique, nous exposerons la problématique de cette thèse (chapitre III) et nous expliquerons nos différents protocoles expérimentaux (chapitre IV) avant de présenter l'ensemble de nos résultats (chapitre V) et des les discuter (chapitre VI).

# **Chapitre I : Le système olfactif**

**I. Description anatomofonctionnelle du système olfactif**

**II. Représentation spatiale des odeurs dans le BO**

**III. Représentation temporelle des odeurs dans le BO**

Parmi les différentes modalités sensorielles, l'olfaction occupe une place primordiale dans le règne animal, notamment chez les mammifères. Nombreux sont les animaux qui se basent sur ce sens pour trouver leur nourriture, fuir un prédateur, trouver un partenaire ou reconnaître sa progéniture. Ce sont là des fonctions nécessaires à la survie de l'individu et de l'espèce.

Chez l'être humain, l'importance de l'olfaction dans la perception sensorielle et le comportement a largement été sous-estimée dans l'histoire. Il a fallu attendre la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et Friedrich Nietzsche pour que l'olfaction soit un sens "noble", et par là ayant droit de cité chez les philosophes (Chantal Jaquet, Philosophie de l'odorat, Ed. PUF - 2010). Nietzsche va jusqu'à relier l'odeur à la pensée et aux mots : « *Tout mot a son odeur, il y a une harmonie et une discordance des odeurs et donc des mots* » (Friedrich Nietzsche, Ainsi parlait Zarathoustra, 1883-1885). Plus tard, Marcel Proust, en plus du souvenir que lui laissent les madeleines de son enfance, parle avec talent des odeurs comme étant l'une des dernières traces mnésiques qui restent : *"Mais, quand d'un passé ancien rien ne subsiste, après la mort des êtres, après la destruction des choses, seules, plus frêles et plus vivaces, immatérielles, plus persistantes, plus fidèles, l'odeur et la saveur restent encore longtemps, comme des âmes, à se rappeler, à attendre, à espérer, sur la ruine de tout le reste, à porter sans fléchir, sur leur gouttelette presque impalpable, l'édifice immense du souvenir ."* (Marcel Proust. Du côté de chez Swann, 1913).

D'un point de vue scientifique, chez l'animal, l'intérêt croissant pour l'étude de l'olfaction remonte également à la même période puisque grâce à un marquage au nitrate d'argent qui porte son nom, Camillo Golgi a fourni une des premières descriptions réalistes, très élégamment dessinée, du système olfactif, et notamment du bulbe olfactif principal (BO) (figure I.1). Tout au long du 20<sup>ème</sup> siècle la description du système olfactif a été enrichie par l'apport des techniques d'anatomie, d'électrophysiologie et d'imagerie. Au niveau fonctionnel, c'est la représentation temporelle de l'information sensorielle dans le BO qui a été décrite le plus précocément. En pleine seconde guerre mondiale (1942), Sir Edgar Adrian, par ailleurs Prix Nobel de Médecine et de Physiologie avec son mentor Sir Sherrington en 1932 sur les fonctions des neurones, décrit, grâce à des enregistrements d'oscillations dans le BO de hérisson stimulé par la fumée de cigarette, les premières données sur la dynamique temporelle de l'activité olfactive (Adrian, 1942). Cette publication précède de 33 ans les premières images de l'activité glomérulaire répartie dans l'espace du BO et visualisée par imagerie radioisotopique *ex vivo* (Sharp et al., 1977; Stewart et al., 1979).

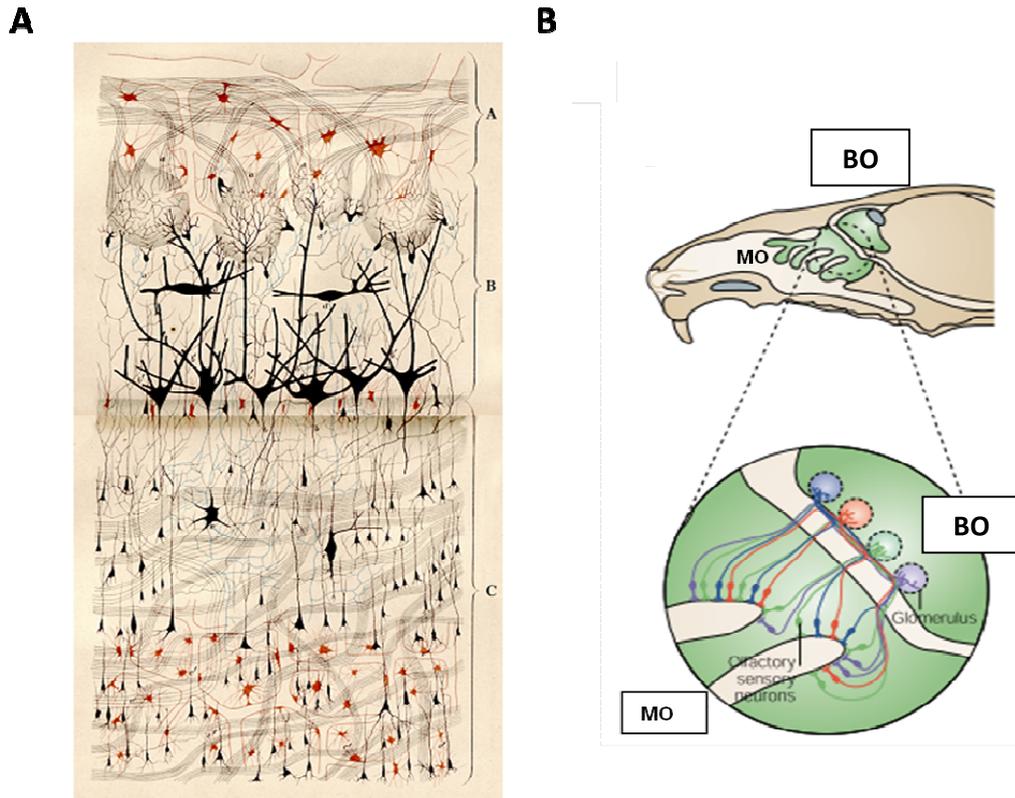
La deuxième partie du 20<sup>ème</sup> siècle a été pavée de nombreuses études chez différentes espèces du règne animal telles que la drosophile (Scott et al., 2001; pour revue (Masse et al., 2009), l'abeille (Deisig et al., 2010), le criquet (Perez-Orive et al., 2002) ou le homard (pour revue Derby, 2000) pour les invertébrés, ou la salamandre (pour revue Kauer, 2002), la tortue (Wachowiak & Cohen, 1999) ou le zebrafish (pour revue Friedrich, 2006) pour les vertébrés (sans oublier bien sûr les nombreuses études

sur les mammifères, qui seront abordées tout au long de ce chapitre). L'ensemble de ces études rend compte de la similitude de l'organisation structurale du système olfactif, du moins, en ce qui concerne les deux premières étapes (le lobe antennaire et son équivalent phylogénétique la muqueuse olfactive; le corps pédonculé et son équivalent le BO). Ce système est donc fortement conservé dans ses grandes lignes anatomo-fonctionnelles à travers le règne animal sur un schéma reproductible de la drosophile jusqu'à l'homme.

La fascination pour la représentation des odeurs dans le système olfactif a atteint son apogée avec la découverte des gènes des récepteurs olfactifs chez le rongeur par Linda Buck et Richard Axel en 1991 (prix Nobel de Médecine et de Physiologie, 2004) : cet ensemble de gènes partage une similarité avec le système immunitaire d'histocompatibilité majeur et représente environ 2% du génome. Par la suite, une série d'articles de première importance (Malnic et al., 1999 ; Mombaerts et al., 1996; Ressler et al., 1994; Vassar, 1994) a décrit les règles de connexions entre la muqueuse olfactive (MO) et le BO et a fourni une base cellulaire et moléculaire à la représentation spatiale des odeurs.

Les dix dernières années de recherche dans le domaine de l'olfaction ont été caractérisées par des études approfondies concernant, d'un côté, la représentation spatiale des odeurs, grâce aux techniques d'imagerie qui, par leur développement impressionnant, permettent de mieux comprendre la répartition et la dynamique de l'activité glomérulaire. D'un autre côté, des avancées considérables dans la compréhension de la représentation temporelle ont été rendues possible grâce aux techniques d'électrophysiologie qui ont permis d'établir des liens entre activité unitaire et oscillations du potentiel de champ local (LFP pour Local Field Potential) et leur évolution en rapport avec la respiration, le flairage (sniffing) et les tâches cognitives liées à l'olfaction.

L'ensemble de ces découvertes est quantitativement impressionnant et en constante expansion. Nous proposons dans ce chapitre de résumer les grandes lignes de recherche et des principales découvertes sur la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le BO des rongeurs. Nous n'aborderons que par touches pertinentes les données importantes obtenues chez les invertébrés et *in vitro* sur tranches de BO dans le cadre de la représentation temporelle des odeurs. En revanche, il ne sera pas question ici du système composé de l'organe voméronasal et du bulbe olfactif accessoire (pour revue Doving & Trotier, 1998; Mucignat-Caretta, 2010; Rodriguez, 2004). Ce système est certes spécifiquement lié à la reconnaissance des congénères mais reste loin de notre propos puisque ne jouant pas de rôle connu dans la représentation spatiotemporelle des odeurs alimentaires qui est l'objet central des études menées au cours de cette thèse.



**Figure I.1. Description anatomique du système olfactif.** A. Planche dessinée représentant le bulbe olfactif principal (BO). Le marquage argentique permet de visualiser pour la première fois les circuits cellulaires du BO chez le rongeur (Golgi, 1875 ; figure modifiée de Shepherd et al. (2007)). B. Schéma d'une coupe sagittale d'une tête de rongeur. Le système olfactif est représenté en vert. Dans la cavité nasale se trouve la muqueuse olfactive (MO) qui contient les neurones olfactifs. Ces neurones traversent la lame criblée et atteignent le BO au niveau de structures sphériques appelées glomérules. Figure modifiée de Mombaerts (2004).

### I. Description anatomofonctionnelle du système olfactif

Dans mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au système olfactif principal des mammifères, particulièrement au BO des rongeurs murins (rat et souris) que nous avons étudié par des techniques intégrées d'imagerie pour la représentation spatiale, et d'électrophysiologie pour les dynamiques temporelles suite à un changement de l'état nutritionnel ou en présence de facteurs orexigènes comme le THC. Le système olfactif peut être subdivisé en une partie périphérique et une partie centrale. La première est représentée par la MO qui est l'organe sensoriel chargé de détecter les odeurs dans l'environnement ambiant. Elle transmet les informations au premier relais du système nerveux central, le BO. Cette structure effectue un premier traitement spatiotemporel de l'information olfactive et la transmet à son tour au cortex olfactif (principalement le cortex piriforme) qui est en relation étroite avec d'autres structures limbiques afin de donner une valence à l'odeur.

Dans cette section, nous détaillerons les bases anatomiques et fonctionnelles de ce système en nous centrant successivement sur la MO et le BO des rongeurs (parties I.1 et I.2). Nous ferons ensuite le point sur les données concernant la représentation spatiale (partie II) puis temporelle (partie III) des odeurs dans le BO.

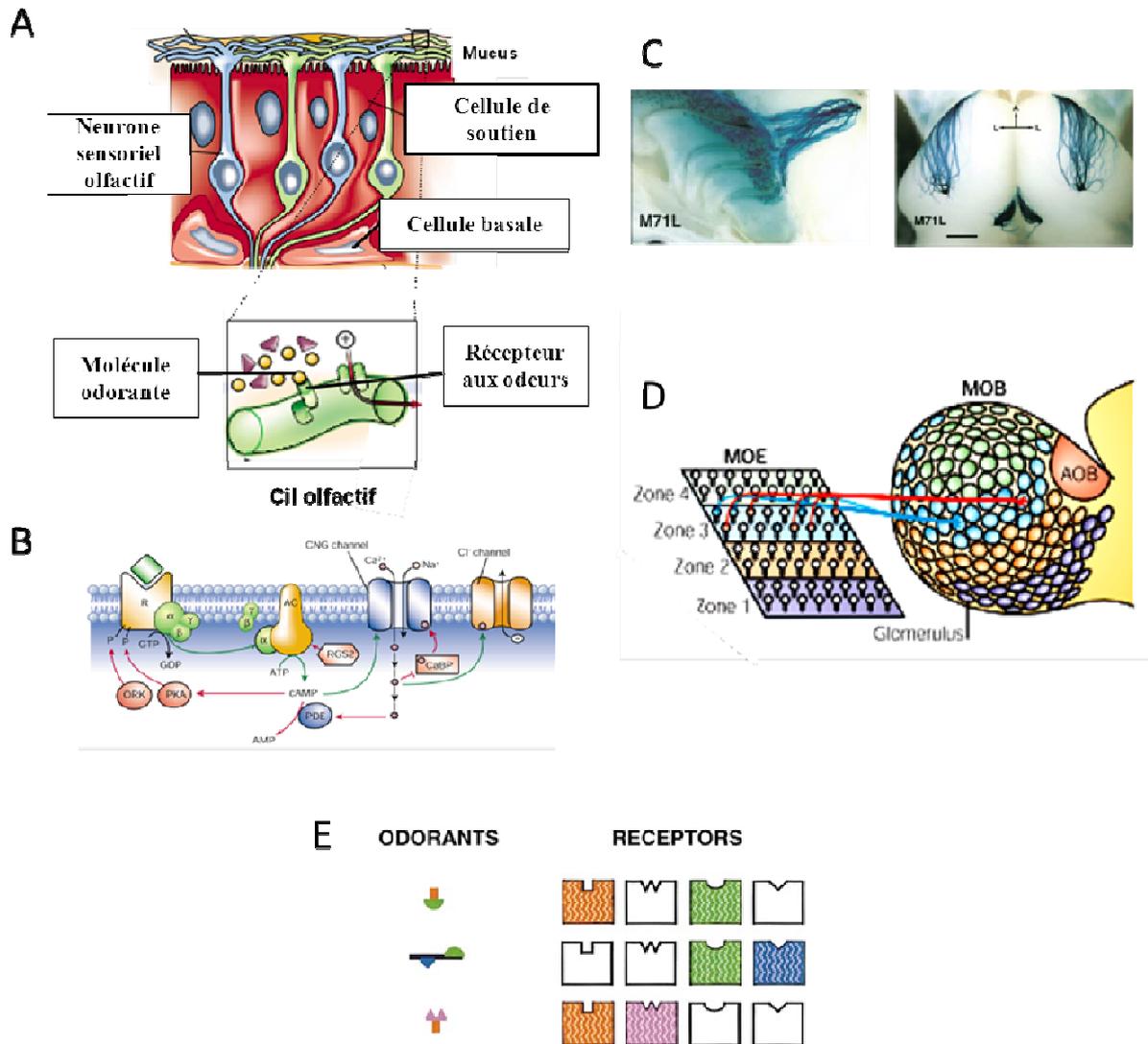
## **I.1. La Muqueuse Olfactive**

### **I.1.1. Anatomie de la MO**

La MO tapisse la partie postérieure des cavités nasales formée de replis cartilagineux appelés cornets. Cette structure est constituée de deux couches séparées par une lame basale, un épithélium pseudostratifié dit épithélium olfactif et une sous muqueuse (figure I.2).

La particularité de la MO, par rapport aux autres organes sensoriels, est qu'elle contient des neurones sensoriels qui sont directement en contact avec le milieu extérieur. De plus, ces neurones se renouvellent continuellement grâce à des cellules souches qui se trouvent à la base de la lame basale. Nous allons brièvement décrire les différents types cellulaires de la MO et leurs fonctions (pour revue Firestein, 2001).

***Les cellules de soutien.*** Elles s'étendent de la lame basale jusqu'au pôle apical de l'épithélium. Elles s'intercalent entre les neurones olfactifs et servent d'échafaudage, ou de barres de soutien, pour les neurones olfactifs. Elles contrôlent étroitement les concentrations ioniques du milieu interstitiel indispensables au bon fonctionnement de la structure.



**Figure I.2. Vue anatomique de la MO et des ses connexions au BO.** A. Anatomie de la MO : les neurones sensoriels olfactifs (OSN) sont entourés de cellules de soutien. A leur pôle apical, ils envoient leurs dendrites vers la cavité nasale où l'air circule. Ces dendrites émettent des cils qui baignent dans du mucus et contiennent des récepteurs aux odeurs (RO, encart). Sur la lame basale, deux types cellulaires servent de progéniteurs prêts à régénérer les OSN. B. Transduction du signal olfactif par les OSN : les odorants qui se fixent sur les RO induisent l'activation de la protéine  $G_{olf}$  qui active une Adénylyl cyclase. L'AMPc ouvre des canaux cationiques qui causent une dépolarisation, et la sortie de chlore qui augmente cette dépolarisation. C. Projections axonales des OSN vers le BO. Les OSN qui expriment le même RO projettent vers le même glomérule. D. Les projections spatiales dans le BO des différents types d'OSN respectent une topologie par zones. E. exemple du codage combinatoire des odeurs par les OSN, différentes molécules odorantes peuvent activer les mêmes RO, mais activent aussi d'autres RO qui les différencient. A. B : Figure modifiée de Firestein (2001). C. Modifiée de Feinstein & Mombaerts (2004). D. Modifiée de Mombaerts (2004). E. Modifiée de Malnic et al. (1999).

**Les cellules basales.** Deux types de cellules basales existent, les cellules horizontales, directement en contact avec la lame basale, et les cellules globulaires, toutes deux responsables de la régénération neuronale tout au long de la vie des mammifères.

**Les Neurones Sensoriels Olfactifs (Olfactory Sensory Neurons, OSN).** Ce sont des neurones bipolaires de petite taille et de forme ellipsoïdale avec un petit axe allant de 4-15 $\mu$ m et un grand axe allant de 7-21  $\mu$ m selon les espèces (Schild & Restrepo, 1998). Ces neurones ont la particularité d'être renouvelés totalement en six à huit semaines. Ils envoient leurs projections dendritiques vers la cavité nasale. Ces dendrites portent des cils qui baignent dans un mucus en contact avec l'air et qui expriment des récepteurs aux odeurs, favorisant ainsi le contact avec les molécules odorantes solubilisées dans le mucus (figure I.2A). Les gènes des Récepteurs aux Odeurs (RO) ont fait l'objet d'une découverte importante par Buck & Axel (1991) qui a été un tournant dans l'étude anatomofonctionnelle du système olfactif. Les RO sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires liés à la protéine G<sub>olf</sub> (Buck & Axel, 1991; Firestein, 2001; Mombaerts et al., 1996; Mombaerts, 1999). Ils sont codés par environ 2% du génome du rat et de la souris pour une panoplie de 800 à 1000 récepteurs. Chaque OSN exprime majoritairement un seul type de RO, ce qui fait de lui un neurone spécialisé dans la détection d'une famille de molécules. En revanche, l'affinité du RO pour des molécules de la même famille (plus précisément pour une partie de ces molécules) est variable. Les OSN envoient leurs axones amyéliniques à travers la lame basale, axones qui sont entourés par les cellules engainantes et qui constituent le nerf olfactif. Ce nerf traverse la lame criblée de l'ethmoïde (une partie perforée de la boîte crânienne) et rejoint le BO, dont il constitue la couche la plus superficielle. Ces neurones sont aussi sensibles aux pressions, aux changements des flux d'air et présentent par conséquent une activité indépendante de toute stimulation odorante (Grosmaître et al., 2007).

**La sous-muqueuse.** Elle se situe sous la lame basale et est constituée des glandes de Bowman responsables de la production du mucus dans lequel baigne la partie apicale des OSN. Cette couche est vascularisée et abrite aussi les cellules engainantes qui entourent, par paquets, les axones amyéliniques des neurones olfactifs jusqu'à leur projection bulbair. Ces cellules engainantes ne servent pas uniquement à emballer les axones et les guider vers le BO mais sont aussi impliquées dans le couplage neuro-vasculaire. Brièvement, des études récentes ont rapporté des interactions entre les axones des OSN et les cellules engainantes. Les axones libèrent des neurotransmetteurs tels que le glutamate et l'ATP qui induisent des vagues calciques au niveau des cellules engainantes. Ces vagues calciques sont fortement impliquées dans la vasoconstriction observée dans la couche des nerfs olfactifs, qui est la couche la plus externe du BO (Lohr et al., 2011; Thyssen et al., 2010).

### **I.1.2. Définition d'une molécule odorante et transduction du message olfactif par les OSN**

La MO est la structure chargée d'effectuer la transduction du signal chimique que constituent les odeurs en signal électrique pouvant se propager le long des axones des OSN et atteindre le cerveau. Avant d'expliquer le fonctionnement de ce système, il nous paraît très important d'apporter une définition aussi claire que possible du mot « odeur » que nous emploierons tout au long de ce manuscrit (Holley A., 1999 : *Eloge de l'odorat*, Odile Jacob Edition. Paris).

Une molécule odorante est caractérisée par sa qualité (l'identité d'une molécule odorante est fixée par sa structure chimique qui lui confère notamment son poids moléculaire et sa volatilité) et sa quantité (sa concentration propre dans l'air ambiant, mais aussi sa concentration relative par rapport aux autres molécules odorantes dans une odeur naturelle). Suivant la quantité de la molécule odorante, sa qualité perçue peut radicalement changer : schématiquement, à faible concentration, elle est souvent perçue comme agréable alors qu'elle est désagréable à forte dose. Pour l'être humain, l'odeur est souvent un concept assez difficile à définir sans référer à son origine. En effet, nous employons couramment des termes relatifs à une odeur de nourriture, de parfum ou d'animaux sans pouvoir dissocier l'odeur précise de ce qui la produit. Par exemple nous dirons de façon totalement floue mais parfaitement imagée « ça sent le produit lessive de la marque X » pour caractériser une odeur. Il en est bien autrement du sens visuel par exemple, dans la mesure où nous pouvons déterminer une couleur ou la forme d'un objet perçu en détails sans référer à une quelconque origine ou référence globale.

Contrairement aux couleurs qui sont caractérisées par des propriétés physiques simples (longueurs d'ondes des photons qui la constituent), les odeurs sont caractérisées par des propriétés chimiques multiples et spécifiques de chacune des molécules qui les composent (poids moléculaire, lipo et hydrosolubilité, volatilité... (pour revue Johnson & Leon, 2007). Il apparaît donc qu'un système de détection visuelle qui fonctionne sur la reconnaissance 1:1 (1 photon dans une longueur d'onde (Rouge, Vert, Bleu) pour 1 photorécepteur (dans un des 3 types de cônes de la rétine) serait inadapté à la détection des odeurs : non seulement il est extrêmement rare dans l'environnement de trouver une seule molécule odorante isolée, mais il est impossible qu'à chaque odeur puisse correspondre un RO puisque ces récepteurs sont exprimés en nombre très limité, au mieux un millier, face à un nombre d'au moins de 10 à 100 fois supérieur de molécules odorantes de notre milieu ambiant. Face à des odeurs naturelles, notamment les odeurs alimentaires, composées d'un fin mélange de plusieurs molécules plus ou moins proches structurellement les unes des autres et à des proportions bien précises, le système de détection chimique des odeurs dans la MO est combinatoire : chaque odeur, composée d'une combinaison d'odorants, active plusieurs RO selon la concentration de chaque odorant qui la constitue et l'affinité des récepteurs pour ces odorants. L'information transmise par les OSN activées est propre à chaque odeur à une concentration donnée (Malnic et al., 1999 ; figure I.2E). Cette propriété de la détection par les OR/OSN se retrouve dans la représentation spatiale des odeurs au niveau des glomérules du BO (partie II.2.).

Concrètement, les molécules odorantes présentes dans l'air entrent dans la cavité nasale lors de l'inspiration et sont solubilisées dans le mucus où baignent les cils des OSN. Elles se lient alors aux RO en fonction de leurs concentrations et de l'affinité de ces récepteurs, induisant ainsi une cascade de signalisation propre qui aboutit à un changement du potentiel membranaire des OSN (figure I.2B et pour revue Firestein, 2001). La liaison molécule odorante-RO active la protéine  $G_{olf}$  qui active à son tour l'Adénylyl cyclase et produit de l'AMPc. Ce second messenger se lie à la partie intracellulaire d'un canal cationique laissant entrer des cations  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ . Ce passage de cations est d'autant plus important que le nombre de molécules odorantes liées aux ROs est élevé. Si le seuil de dépolarisation est atteint, un potentiel d'action se propage tout au long de l'axone de l'OSN et provoque une libération de neurotransmetteur excitateur, du glutamate, dans les glomérules du BO.

Le rôle parfois vital joué par le système olfactif fait qu'il doit être sensible à de très faibles concentrations d'odeurs, surtout si celles-ci sont en rapport avec un danger imminent comme une odeur de brûlé ou de prédateur. Un système particulier d'amplification de l'activation est présent dans les OSN : il consiste à augmenter la dépolarisation en faisant sortir des ions  $Cl^-$  de la cellule. En effet, la dépolarisation induite par l'entrée des cations sodiques et/ou calciques induit l'ouverture d'un canal chlore présent dans les cils des OSN (Reisert et al., 2005) (figure I.2B). Or la concentration intracellulaire de chlore dans les cils est plus importante que celle du mucus extracellulaire, une différence intra/extracellulaire qui est exceptionnelle comparée au cerveau où ce rapport est inverse. L'ouverture de ce canal chlore induit donc une sortie de  $Cl^-$  et une dépolarisation supplémentaire qui permet d'atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action avec peu de molécules odorantes détectées.

### **I.1.3. Connexions principales de la MO**

Les projections efférentes sortant de la MO sont bien connues et ont comme destination unique le BO : les potentiels d'actions générés par les OSN possédant les OR activés (figure I.2C, D) se propagent le long de leur axone jusqu'aux glomérules olfactifs et provoquent la libération synaptique de glutamate posant ainsi les bases du codage spatial que nous détaillerons dans la suite du manuscrit. Les afférences de la MO sont nettement moins connues. Différents récepteurs sont présents dans les différents types cellulaires de cet organe mais l'origine des peptides qui se lient à ses récepteurs reste peu connue. Ainsi, des innervations notamment par le nerf Trijumeau sont rapportées, mais les cibles précises dans la MO restent à étudier. De nombreux récepteurs à des signaux de la circulation systémique sont présents dans la MO, à l'image des récepteurs adrénergiques (Kawai, 1999), à la vasopressine (Levasseur et al., 2004) ou à l'endothéline (Laziz et al., 2011). De façon intéressante pour notre propos, la MO exprime aussi des récepteurs à l'insuline (Lacroix et al., 2008) et à la leptine (Baly et al., 2007) : les résultats de l'équipe NOeMI montrent une possible synthèse locale de la leptine et de l'insuline dans la MO. Cependant, les rôles de ces hormones clés dans la prise alimentaire

restant à éclaircir, nous aborderons spécifiquement ce thème dans le chapitre III sur la régulation de la prise alimentaire.

Enfin la MO possède son propre système vasculaire très dense et indépendant de celui du BO, c'est donc un lieu d'injection et de passage privilégié de médicaments ou d'inhalation de drogues comme la cocaïne, malgré la présence d'un panel impressionnant d'enzymes de dégradation qui limite grandement l'action de ces molécules. Ainsi, des instillations d'insuline sont étudiées, notamment dans le traitement de cas de diabète de type II (Hanson & Frey, 2007 et 2008; Thorne et al., 2004) ou de leptine pour le traitement de résistance métabolique périphérique (Hallschmid et al., 2004; Schulz et al., 2004).

## **I.2. Le bulbe olfactif principal**

Le BO est la structure la plus antérieure du cerveau des rongeurs (figure I.1B). C'est un paléocortex qui reçoit les projections axonales des OSN. Un premier traitement spatiotemporel de l'information y est effectué et transmis au cortex olfactif afin de donner une identité à la stimulation sensorielle qui a induit l'activation des OR en périphérie. Comme les autres cortex, le BO est organisé en plusieurs couches (figure I.3A) composées de plusieurs types cellulaires que nous allons détailler dans ce paragraphe.

### **I.2.1. Anatomie du BO**

Le BO est une structure sphéroïde, organisée en six couches concentriques que nous décrirons ici de la couche la plus externe vers la couche la plus interne (Gordon Shepherd, *The synaptic organization of the brain*, 2004, Ed. 5, Oxford University Press. et figure I.3A).

**La Couche du Nerf Olfactif (Olfactory Nerve Layer, ONL)** est la couche la plus superficielle. Elle est formée par les axones des OSN qui parcourent la surface du BO, empaquetés par des cellules engainantes, avant de pénétrer et de se ramifier dans la couche glomérulaire où elles contactent leurs cibles cellulaires.

**La Couche Glomérulaire (Glomerular Layer, GL)** est formée de structures sphériques d'une centaine de micromètres appelées glomérules. Ces glomérules sont entourés de corps cellulaires et abritent un neuropile contenant de nombreuses synapses entre les OSN et les différents types cellulaires du BO. Cette couche est très dense très vascularisée (Lecoq et al., 2009) et très riche en terme de contacts dendrodentritiques : elle reçoit les afférences de plusieurs dizaines de milliers de terminaisons des afférences des OSN auxquelles font face une centaine de dendrites apicaux de cellules de sortie du BO (mitrales et à panache). L'ensemble est entouré d'environ 200 cellules juxtaglomérulaires.

**La Couche Plexiforme Externe (External Plexiform Layer, EPL)** contient les corps cellulaires des cellules à panache et un réseau d'arbres dendritiques dense constitué des dendrites apicales des

cellules à panache et mitrales, des dendrites secondaires de ces cellules et enfin des dendrites des cellules granulaires.

**La Couche des Cellules Mitrales (Mitral Cell Layer, MCL)** est une couche monocellulaire fine, composée des somas des cellules du même nom qui sont les principaux neurones de sortie du BO. Ces cellules ont un diamètre moyen de 30 à 40  $\mu\text{m}$  chez le rat et sont au nombre d'environ 40 000.

**La Couche Plexiforme Interne (Internal Plexiform Layer, IPL)** est le lieu de passage de nombreuses fibres, axones des neurones de sortie et dendrites des cellules granulaires.

**La Couche des Cellules Granulaires (Granule Cell Layer, GCL)** est la plus dense en corps cellulaires du BO. Elle est formée des cellules granulaires qui sont les principaux interneurons inhibiteurs du BO. Ces cellules n'ont pas d'axone et émettent leurs dendrites vers l'EPL où elles forment de nombreuses épines dendritiques, ou gemmules, qui sont le lieu de formation des synapses réciproques avec les dendrites secondaires des cellules mitrales. Les synapses réciproques sont d'une importance capitale dans le codage temporel des odeurs.

Enfin une zone sous-épendymaire et ventriculaire, la plus interne du BO, constitue le lieu d'arrivée des cellules néoformées de la voie rostrale de migration (Rostral Migratory Stream, RMS) en provenance de la zone sous-ventriculaire (SubVentricular Zone, SVZ).

### **I.2.2. Types cellulaires du BO**

Les différents types cellulaires du BO ont été largement détaillés dans la littérature, par la série d'études initiales de (Price & Powell, 1970a et 1970b) et par plusieurs revues plus récentes parmi lesquelles nous conseillons (Kosaka & Kosaka, 2011; Egger & Urban, 2006; Wachowiak & Shipley, 2006). Nous proposons ici un résumé des propriétés anatomiques de ces différents types cellulaires.

**Les cellules juxtglomérulaires (Juxtglomerular Cells, JC) (figure I.3B)** sont des cellules dont les somas entourent des structures sphériques appelées glomérules qui constituent la GL (figure 1A). Ces cellules sont principalement de trois types :

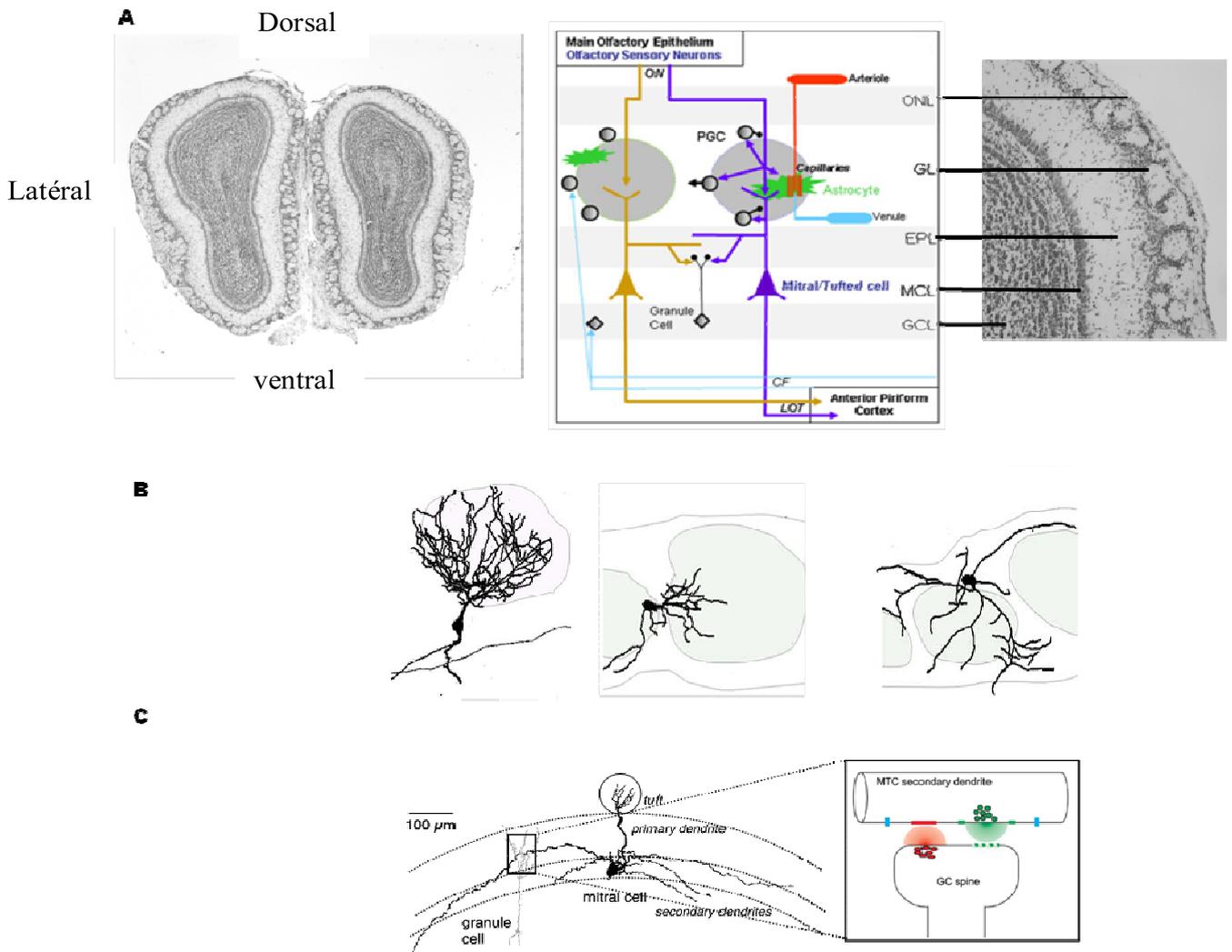
**Les cellules à panache externes (External Tufted Cells, ETC)** sont des cellules excitatrices qui envoient leurs dendrites primaires à l'intérieur des glomérules où elles reçoivent une entrée monosynaptique de l'axone des OSN. A ce niveau, elles forment également des synapses excitatrices avec les projections des autres types cellulaires dans les glomérules. Ces cellules ne possèdent pas de dendrites secondaires et leur axone, dont la cible n'est pas connue, traverse l'EPL vers le noyau olfactif antérieur.

**Les cellules PériGlomérulaires (PeriGlomerular Cells, PGC)** entourent le neuropile qui est le cœur du glomérule et font la liaison entre plusieurs glomérules adjacents. On en distingue plusieurs sous-

types qui diffèrent par leur morphologie, leurs connexions synaptiques et le type de neurotransmetteur et neuromodulateur libéré (dopamine, GABA, VIP, CPP) et de protéines liant le calcium exprimé (Calbindine, calrétinine, S100bêta). La majorité de ces cellules (80%) reçoit une entrée synaptique des cellules à panache externe et seulement 20% sont contactées par les axones des OSN. Inhibitrices (principalement GABAergiques), elles contactent d'une part les dendrites des cellules mitrales et à panache (M/TC) et d'autre part les autres interneurons glomérulaires dont elles régulent l'activité.

***Les cellules à axone court (Short Axon cells, SAC, figure I.3B)*** sont principalement glutamatergiques. Leurs dendrites émettent des prolongements et reçoivent une entrée des cellules à panache externe. Contrairement à ce que suggère leur appellation, leur axone est long, ramifié et traversent plusieurs glomérules : ils activent les cellules périglomérulaires des glomérules adjacents (Aungst et al., 2003).

***Les neurones de sortie :*** Il en existe deux types en nombre comparable. Les cellules à panache (tufted cells, TC) dont les corps cellulaires se trouvent dans la couche plexiforme externe et les cellules mitrales (mitral cells, MC) dont les corps cellulaires se trouvent dans la couche du même nom (figure I.3B). Ces cellules émettent une seule dendrite primaire qui va innervé un seul glomérule, les cellules qui innervent un même glomérule et qui sont activées de la même manière par une stimulation odorante sont appelées cellules sœurs (Dhawale et al., 2010). A ce niveau, elles reçoivent une entrée monosynaptique des axones des OSN et forment des synapses avec les interneurons de la couche glomérulaire. Elles émettent aussi 2 à 9 dendrites secondaires qui sont présents dans l'EPL et qui font synapse avec les dendrites des cellules granulaires. Leur axone sort du BO pour se projeter dans le cortex olfactif. Par la suite conformément à la littérature, nous qualifierons ces cellules de sortie de mitral/tufted cells (M/TC).



**Figure I.3. Organisation anatomique et types cellulaires dans le BO.** A. Anatomie et circuits cellulaires du BO. A gauche : coupe histologique sagittale du BO de rat (largeur\*longueur max : 3\*3mm). Il est constitué de deux structures symétriques dénommées héli-bulbes. A droite : schéma représentatif des couches principales du BO. ONL : Couche du Nerf Olfactif. GL : Couche Glomérulaire. EPL : Couche Plexiforme Externe. MCL : Couche des Cellules Mitrales. GCL. Couche des Cellules Granulaires. B. Cellules Juxtaglomérulaires (JC). De droit à gauche : Cellule à panache externe (ETC), Cellule périglomérulaire (PGC) et cellule à axone court (SAC). Chaque zone grisée correspond à un glomérule. C. Cellules profondes du BO. Les cellules de sortie du BO (mitrales et à panache, M/TC) avec leur dendrite primaire au contact du glomérule et leurs dendrites secondaires formant des synapses avec ceux des cellules granulaires (GC). Encart : Synapse réciproque entre les dendrites secondaires des cellules mitrales et une épine dendritique de cellule granulaire. La M/TC libère du glutamate (vert) qui excite l'épine dendritique de la GC qui répond par une libération de GABA inhibiteur. A. Coupes histologiques fournies par Aurélie Genoux, ingénieure CNRS/IMNC, et figure modifiée de Pain et al., 2011 ; B. C Schémas modifiés de Wachowiak and Shipley (2006).

**Les cellules granulaires (Granular Cells, GC)** représentent les neurones les plus nombreux du BO. Principalement GABAergiques, ces cellules de petite taille (8-10  $\mu\text{m}$  de diamètre), dépourvues d'axone, émettent des dendrites qui forment des synapses réciproques avec les neurones de sortie dans l'EPL.

**Les astrocytes** : Ils sont présents dans toutes les couches du BO et particulièrement dans les glomérules. Leurs corps cellulaires entourent le neuropile glomérulaire (Bailey & Shipley, 1993; Chao et al., 1997). Ces cellules gliales assurent la régulation de la quantité de glutamate dans les synapses (Isaacson, 1999) et l'approvisionnement en énergie dans les glomérules (CopperSmith & Leon, 1984 ; Martin et al., soumis). Ils exercent de plus un contrôle sur l'activité hémodynamique et synaptique dans le glomérule (Chaigneau et al., 2003 et 2007; Petzold et al., 2008). Nous voudrions faire ici un point général sur ces cellules non neuronales et non excitables, qui ont été une de nos cibles moléculaires dans le cadre des explications que nous avons sur les mécanismes responsables de la plasticité olfactive en cas de jeûne. Les astrocytes sont essentiels au fonctionnement des tissus nerveux parce qu'ils régulent l'activité synaptique, le métabolisme cérébral, l'activité vasculaire. Ils sont responsables de la recapture de glutamate par l'intermédiaire des transporteurs de glutamate GLAST et GLT1 (Bonvento et al., 2002). Cette activité de recapture du glutamate est fortement impliquée dans le signal optique glomérulaire obtenu par imagerie optique du signal intrinsèque (Gurden et al., 2006) décrite dans la partie II.1.1.2 de ce chapitre. Les astrocytes expriment des récepteurs glutamatergiques (AMPA, NMDA et mGluR) et aux neuromodulateurs (récepteurs D2, 5HT2-B...) et présentent sur tranche une triple réponse à une stimulation glutamatergique (revue par Haydon & Carmignoto, 2006) : (i) un changement du potentiel membranaire local dû à l'entrée de sodium à travers les transporteurs de glutamate (ii) une entrée de glucose par les transporteurs de glucose côté vasculaire en réponse à cette élévation de sodium intrastrocytaire, et une production de lactate qui est transmis aux neurones (iii) une augmentation du calcium intracellulaire qui peut se propager dans un réseau car les astrocytes communiquent largement entre eux grâce à des jonctions communicantes (gap junctions) constituées de molécules canaux dénommées connexines (Cx) (pour les astrocytes spécifiquement les Cx30 et 43). De nombreuses molécules de première importance comme le glucose, le lactate, le glutamate, l'ATP, et les ions calcium peuvent circuler à travers ces jonctions. Cette transmission interastrocytaire fait que l'activation d'une cellule peut se propager localement à travers tout un réseau (Giaume et al., 2010; Rouach et al., 2008).

Il est à remarquer que les interneurons du BO, les JC et GC, connaissent une neurogenèse, même chez l'adulte : ces neurones sont renouvelés par de nouvelles cellules qui arrivent dans zone sous-épendymaire et ventriculaire du BO en provenance de SVZ/RMS tout au cours de la vie à raison d'un remplacement de plusieurs milliers de cellules par jour (Nissant & Pallotto, 2011). Ces mécanismes de remplacement de neurones adultes chez des vertébrés ont été d'abord démontrés par Goldman & Nottebohm (1983) chez l'oiseau, puis ont été découverts dans le BO (pour revue Whitman & Greer,

2010) et l'hippocampe (pour revue Mongiat & Schinder, 2011) des mammifères. Nous ne développerons pas dans le cadre de cette thèse les hypothèses fonctionnelles de la neurogenèse olfactive, ni l'ensemble des études concernant la maturation et l'implication des interneurons granulaires dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage, mais des revues récentes sont disponibles à ce sujet (Lazarini & Lledo, 2011; Lledo & Lazarini, 2007; Mouret et al., 2009).

### **I.3. Connexions principales du BO**

#### ***Efférences centripètes***

Les axones glutamatergiques des neurones de sortie constituent le Tractus Olfactif Latéral (ou lateral olfactory tract, LOT). Ils se dirigent principalement vers le cortex piriforme et l'amygdale. Des collatérales de ces axones projettent également vers le tubercule olfactif, la Tenia Tecta, et le Noyau Olfactif Antérieur (ou anterior olfactory tract, AON). Des liaisons indirectes via ces structures se font avec le cortex entorhinal, le thalamus, l'amygdale et le tubercule olfactif (via l'AON). Le cortex piriforme qui est connecté à son tour, de manière bilatérale, vers le cortex entorhinal et l'hypothalamus latéral. Il est à noter que le BO, contrairement aux autres structures sensorielles, ne projette pas directement sur le thalamus. Il en résulte qu'une structure comme l'amygdale, qui est impliquée dans les émotions, reçoit directement et massivement des afférences du BO ce qui pourrait expliquer la puissance et la longévité de la mémoire olfactive (Chapuis et al., 2009).

#### ***Afférences centrifuges et neurotransmission dans le BO***

En plus des neurotransmetteurs principaux du BO que sont le glutamate et le GABA, de nombreux récepteurs à différents neurotransmetteurs et modulateurs y sont synthétisés localement pour des interactions entre cellules du BO ou entre cellules du BO et les projections centrifuges qu'elles reçoivent. Nous citerons trois systèmes modulateurs.

*La dopamine.* C'est un neuromodulateur local comme dans la rétine. Elle est synthétisée et libérée au niveau glomérulaire par les PG qui peuvent co-exprimer le GABA (Maher et al., 2011). Des récepteurs dopaminergiques D2 sont présents au niveau des terminaisons présynaptiques des OSN, Ils ont un effet inhibiteur sur les terminaisons axonales par la voie du récepteur D2 (Hsia et al., 1999). Le BO reçoit également des projections d'un autre modulateur cathécholaminergique, la noradrénaline, projections issues du Locus coeruleus (McLean et al., 1989; Shipley et al., 1985; Sullivan et al., 2000). Ces projections sont très étudiées dans le cadre de la mémoire olfactive des rats nouveaux-nés (Rainecki et al., 2010).

*L'acétylcholine.* Des projections cholinergiques arrivent vers le BO au niveau de toutes les couches (Gómez et al., 2005) et sont présentes de manière dense dans la couche glomérulaire. Cette neurotransmission cholinergique serait impliquée dans la discrimination des odeurs (Chaudhury et al., 2009) et leur maintient en mémoire à court terme (Ravel et al., 1994).

*La sérotonine (5-HT)*. Des projections sérotoninergiques partent du noyau du raphé et atteignent le BO, particulièrement la couche glomérulaire (McLean & Shipley, 1987) et pourraient être impliquées dans la représentation spatiale des odeurs (Petzold et al., 2009).

Les différentes couches bulbaires présentent également des récepteurs à l'ensemble des molécules de signalisation anorexigènes. Des récepteurs à l'insuline (Colley et al., 2004) et à la leptine (Prud'homme et al., 2009) ainsi qu'au neuropeptide Y (NPY), neuropeptide impliqué dans la croissance neuronale et fortement dans la prise alimentaire (résultats du laboratoire NOeMI), sont présents dans le BO. Le BO reçoit des projections orixinergiques de l'hypothalamus (Hardy et al., 2005) et exprime des récepteurs aux orexines (Hardy et al., 2005 ; Prud'Homme et al., 2009). Ces molécules seront détaillées dans le chapitre III consacré à la problématique de cette thèse.

#### **I.4. Répartition de l'activité dans le BO**

L'arrivée des odeurs au système olfactif se fait par la respiration (pour ce qui concerne la voie orthonasale), cette respiration se fait à un rythme allant de 1-4 Hz, en fonction de l'espèce, de l'état de vigilance et du contexte. Lorsque les animaux sont soumis à un nouvel environnement olfactif, une activité très facilement observable se met en place, notamment chez les rongeurs, c'est le flairage (sniffing). Il consiste en un passage d'une respiration à l'état de repos à une augmentation active de la durée et de l'amplitude des cycles respiratoires afin très probablement d'échantillonner activement les molécules odorantes du milieu ambiant. Cette série d'inhalations rythmiques et rapides s'effectue à une fréquence de 4-12 Hz (Kepecs et al., 2006) et affecterait très probablement la représentation spatiale et temporelle des odeurs dans la mesure où il change la fréquence respiratoire (voir partie II et III sur le codage spatial et temporel dans le BO).

Après l'arrivée de l'influx nerveux transmis par les OSN aux glomérules, les terminaisons axonales de ces neurones libèrent du glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate active les récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type AMPA et NMDA sur les M/TC ainsi que les différents types de PGC (Aroniadou-Anderjaska et al., 1999). A ce niveau, les PGC libèrent de la dopamine et du GABA et interviennent dans la régulation de l'activité intraglomérulaire en activant des récepteurs dopaminergiques D2 (Hsia et al., 1999; Ennis et al., 2001) et GABA-B présynaptiques sur les OSN (Aroniadou-Anderjaska et al., 2000).

L'inhibition latérale inter-glomérulaire qui serait responsable d'une inhibition de type centre-pourtour (center-surround), actuellement très controversée (McGann et al., 2005; Pérez & Matt Wachowiak, 2008), serait assurée par les SAC qui exciteraient les PGC inhibiteurs de glomérules adjacents (Aungst et al., 2003). Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1) sont exprimés par les M/TC, mais également par les GC et les astrocytes glomérulaires avec le sous-type mGluR5 (Van Den Pol, 1995; Petzold et al., 2008). Ces récepteurs métabotropiques sont considérés comme médiateurs de

l'excitation glutamatergique en tant qu'autorécepteur ou hétérorécepteur selon leur position pré- ou postsynaptique (Dong et al., 2009; De Saint Jan & Westbrook, 2007).

A la sortie du glomérule, l'activation des M/TC induit une dépolarisation qui est transmise le long de leur dendrite primaire (Bischofberger & Jonas, 1997; Debarbieux et al., 2003). Un potentiel d'action naît alors au niveau somato-axonal et se propage le long des axones des M/TC vers les cortex, mais aussi le long de leurs dendrites secondaires qui contactent les épines dendritiques des GC dans les synapses dendrodenritiques réciproques (figure I.3C). A ce niveau, une libération de glutamate par les M/TC active les récepteurs NMDA sur les GC qui répondent par une libération de GABA inhibiteur qui sollicite les récepteurs GABA-A sur les M/TC (Lauriet al., 1992; Nicoll, 1971)

L'activation de ces boucles excitato-inhibitrices ont deux effets majeurs : i) la mise en place d'un mécanisme d'inhibition latérale (Yokoi et al., 1995) qui permet de former des colonnes d'activité de M/TC (connectées aux glomérules les plus spécifiquement activés par les OSN et qui ont la plus forte affinité pour les molécules odorantes) en inhibant les colonnes adjacentes par l'intermédiaire des GC. L'existence de cette inhibition latérale est discutée depuis très récemment (Fantana et al., 2008; Soucy et al., 2009). ii) une fine régulation de sortie de l'activité bulbaire, en étant très probablement à l'origine d'oscillations du potentiel de champ local (LFP pour Local Field Potential) (voir partie III de ce chapitre sur la représentation temporelle des odeurs). Ces oscillations sont modifiées par les odeurs, en fréquence et en amplitude et constituent très probablement une partie importante du codage temporel des odeurs.

En résumé, en se basant sur les premiers résultats de la littérature que nous avons décrits, chaque famille d'OSN isoréceptrice est connectée à un nombre très limité de glomérules olfactifs. Ces glomérules transmettent l'information aux couches profondes du BO par l'intermédiaire des dendrites primaires des M/TC qui interagissent via leurs dendrites secondaires avec les épines des GC dans l'EPL. L'odeur induit donc une représentation spatiale au niveau de la couche glomérulaire en recrutant un panel de modules tout en modifiant la dynamique de l'activité des couches profondes par les interactions M/TC-GC. L'ensemble de ces activités définit le codage spatiotemporel des odeurs. Les M/TC convoient alors le message au cortex olfactif et au système limbique sans relais ou filtre thalamique.

Dans les parties suivantes de ce chapitre, nous établirons un point global sur la compréhension de la représentation spatiale (partie II) et temporelle (partie III) des odeurs dans le BO.

## **II - Le codage spatial dans le BO**

A l'instar des autres systèmes sensoriels, la stimulation olfactive induit un traitement spatiotemporel dans le cerveau qui débute dans le BO. Le codage spatial des odeurs est principalement lié au fait que les OSN qui expriment le même OR projettent dans les mêmes glomérules et que chaque glomérule ne reçoit que les projections d'OSN qui expriment le même RO (Mombaerts, 2004). Ce câblage impose donc dès l'entrée du BO l'activité d'un ensemble de glomérules qui possèdent des propriétés spécifiques qui font l'objet de ce paragraphe.

Les propriétés anatomostructurales décrites par la biologie moléculaire et cellulaire dans les années 1990 sont les suivantes : spécificité de projection d'un OSN sur un glomérule, symétrie de la projection bilatérale (une représentation équivalente par hémisphère), symétrie à l'intérieur d'un hémisphère dans l'axe latéral-médian et détection combinatoire (Mombaerts, 1999; Mombaerts, 2004). Cependant ces techniques ne pouvaient expliquer tous les mécanismes fonctionnels impliqués dans le codage spatial. L'avènement de nouvelles imageries à haute résolution spatiotemporelle (notamment en imagerie optique) a permis d'étudier en détails ces mécanismes au niveau du BO. Le laboratoire IMNC où j'ai effectué ma thèse étant une unité interdisciplinaire de physique et de neurosciences, les propriétés biophysiques des signaux fonctionnels utilisés pour l'imagerie cérébrale y sont tout autant étudiées que les fonctions neurophysiologiques. Fort de ces études à l'interface, il nous paraît utile de présenter dans un premier temps (partie II.1) les différentes techniques d'imagerie appliquées à l'étude du codage spatial des odeurs dans le BO (ces techniques ne sont évidemment pas spécifiques de l'étude du BO et sont utilisées pour les autres structures cérébrales). Pour le lecteur pressé, il est possible de ne lire que la partie concernant l'imagerie optique intrinsèque (partie II.1.1.) que j'ai utilisée pendant ma thèse et de passer directement aux parties de ce chapitre (partie II.2. et II.3.) résumant les données les plus importantes qui ont découlé de l'utilisation de ces techniques pour la compréhension des bases de la représentation spatiale des odeurs.

Les techniques d'imagerie ayant permis l'étude du codage sensoriel peuvent être répartis en deux types : (i) les techniques qui se basent sur les propriétés métaboliques et vasculaires endogènes du tissu cérébral ; (ii) les techniques qui se basent sur des marqueurs exogènes de l'activité neuronale.

### **II.1. Techniques d'étude de la représentation spatiale des odeurs**

#### **II.1.1. Cartographies par utilisation des propriétés métaboliques et vasculaires**

Ces techniques fonctionnelles se basent sur le fait que les régions les plus activées font appel à plus de substrat énergétique que les autres régions. Cette forte demande énergétique s'ajoute à l'apport important qui est nécessaire de base pour assurer le maintien du potentiel de repos (en maintenant les potentiels d'inversion des ions essentiels tels que le sodium et le potassium ; (Attwell & Laughlin, 2001). Le substrat énergétique essentiel du cerveau est le glucose. Il est transformé par étapes

successives en ATP qui est la molécule énergétique des cellules. Cette production est effectuée en aérobie (présence d'oxygène) dans les mitochondries. Un changement important du débit sanguin dans les capillaires et des artéoles des réseaux activés est également observé. Glucose, oxygène et débit sanguin sont des signaux exploités pour identifier les régions activées dans le cerveau et fournir une cartographie de l'activation neuro-gliale.

#### ***II.1.1.1. Utilisation des propriétés métaboliques***

Comme nous l'avons décrit précédemment, lors d'une stimulation olfactive, les OSN sur lesquels se sont liés des odorants produisent des potentiels d'action qui se propagent dans leurs axones. Ceci induit la libération de glutamate dans les fentes synaptiques des glomérules où ils projettent. Il en découle une activation des M/TC ainsi que des JC, dont les astrocytes qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cérébral (pour revue Barres, 2008). Cette activité glomérulaire nécessite une forte consommation d'énergie et d'oxygène (Lecoq et al., 2009). Le codage spatial dans le BO peut donc être étudié grâce à des techniques d'imagerie qui détectent ces signaux. Le BO présente deux avantages majeurs pour la détection de ces signaux d'imagerie : (i) la couche glomérulaire, où a lieu la première et plus importante étape du codage spatial, est superficielle (couche dorsale qui débute en dessous de l'ONL de 100 à 150  $\mu\text{m}$  sous la surface du BO) et facilement accessible par imagerie, notamment optique ; (ii) Cette couche est la plus vascularisée et la plus gourmande en énergie ; (iii) la densité de synapses dans cette couche est très élevée.

La technique de détection métabolique est basée sur une cartographie de l'activité suite à l'assimilation de glucose radiomarqué dans les zones stimulées. Le glucose est véhiculé par le sang, traverse la barrière hémato-encéphalique grâce aux transporteurs du glucose GLUT, pour être incorporé dans les cellules neuronales (par GLUT3) et astrocytaires (par GLUT1). Au niveau de ces cellules, il subit la glycolyse, une suite de réactions biochimiques de dégradation de sa chaîne carbonée. Ce processus débute dans le cytoplasme avec la production de pyruvate, puis d'acétylCoA qui est transporté dans les mitochondries où ont lieu les réactions couplées du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire qui aboutissent à la production d'ATP. Ces réactions permettent de former 36 moles d'ATP à partir d'1 mole de glucose en aérobie (revues sur les mécanismes précis de la neuroénergétique par Ames, 2000 et Lars Edvinsson & Diana Crause, *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2001, Ed. 2, Lippincott Williams & Wilkins).

La première étape de la glycolyse est la phosphorylation du glucose par l'hexokinase et la production de glucose-6-phosphate. La technique de cartographie par assimilation de glucose radiomarqué utilise cette étape de la réaction pour quantifier l'incorporation de glucose par les différentes régions du cerveau. Afin de quantifier le glucose incorporé, cette technique nécessite l'utilisation de glucose radio-marqué  $^{14}\text{C}$ -2-DéoxyGlucose (2DG, Sokoloff et al., 1977). Cette forme de glucose reste emprisonnée dans le cytoplasme après phosphorylation par l'hexokinase. Il est alors possible de

quantifier par autoradiographie la quantité de 2DG incorporé qui est plus importante dans les zones activées par rapport aux zones non activées. Très rapidement après sa mise au point, la technique du 2DG a été utilisée pour le BO chez le rat par Sharp et al. (1977) puis Stewart et al. (1979) et a permis la première mise en évidence du codage spatial des odeurs dans cette structure. Cependant, cette méthode a des limitations importantes car elle n'a pas la résolution spatiale pour visualiser un glomérule individuel, et elle est statique car elle nécessite le sacrifice de l'animal pour réaliser l'autoradiographie : seule une image pour une seule stimulation est donc disponible par animal. Le site web du laboratoire de Michael Leon, <http://gara.bio.uci.edu/>, contient une vue exhaustive des odeurs cartographiées par 2DG et propose une partition du BO en modules qui sont activés par des fonctions chimiques précises portées par les molécules odorantes (figure I.4A; Johnson et al., 2002).

### ***II.1.1.2. Utilisation des propriétés vasculaires***

#### ***Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf)***

Cette technique est basée sur la détection du signal BOLD (pour Blood Oxygenation Level-Dependant). Elle met à profit les propriétés paramagnétiques de la déoxyhémoglobine qui génère une modification du champ magnétique local. L'activité neuronale nécessite un apport d'oxygène et se traduit par un changement de l'oxygénation du sang suivi d'une variation du volume et du débit sanguins. En réaction à cette consommation locale, l'oxygène apporté par le sang aux zones activées dépasse largement les besoins des cellules et change ainsi le rapport déoxy/oxy hémoglobine dans les capillaires et les veinules. Le contraste BOLD suit ces modifications avec un signal qui est souvent biphasique (négatif puis positif) dans les régions activées, ce qui permet leur visualisation (figure I.4.B., Heeger & Ress, 2002).

Cette technique est utilisée, depuis la fin des années 90, pour étudier le codage spatial des odeurs dans le BO du petit animal (Xu et al., 2000; Yang et al., 1998). Elle permet la cartographie de plusieurs odeurs et, contrairement aux techniques optiques que nous détaillerons plus loin, d'imager la totalité du BO avec une augmentation du signal BOLD de l'ordre de 20%. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'il est difficile d'avoir une bonne résolution spatiale et temporelle en même temps (Kida et al., 2002): pour atteindre la résolution glomérulaire les stimulations olfactives appliquées sont très fortes et très longues. Une amélioration de la technique d'acquisition a permis d'effectuer des présentations plus courtes et de détecter l'activation de glomérules ventraux (Martin et al., 2007a). Reste que l'IRMf-BOLD est basée sur des indicateurs indirects de l'activité neuronale et que les mécanismes cellulaires responsables de son enclenchement sont encore très mal connus (Heeger & Ress, 2002).

### ***Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI)***

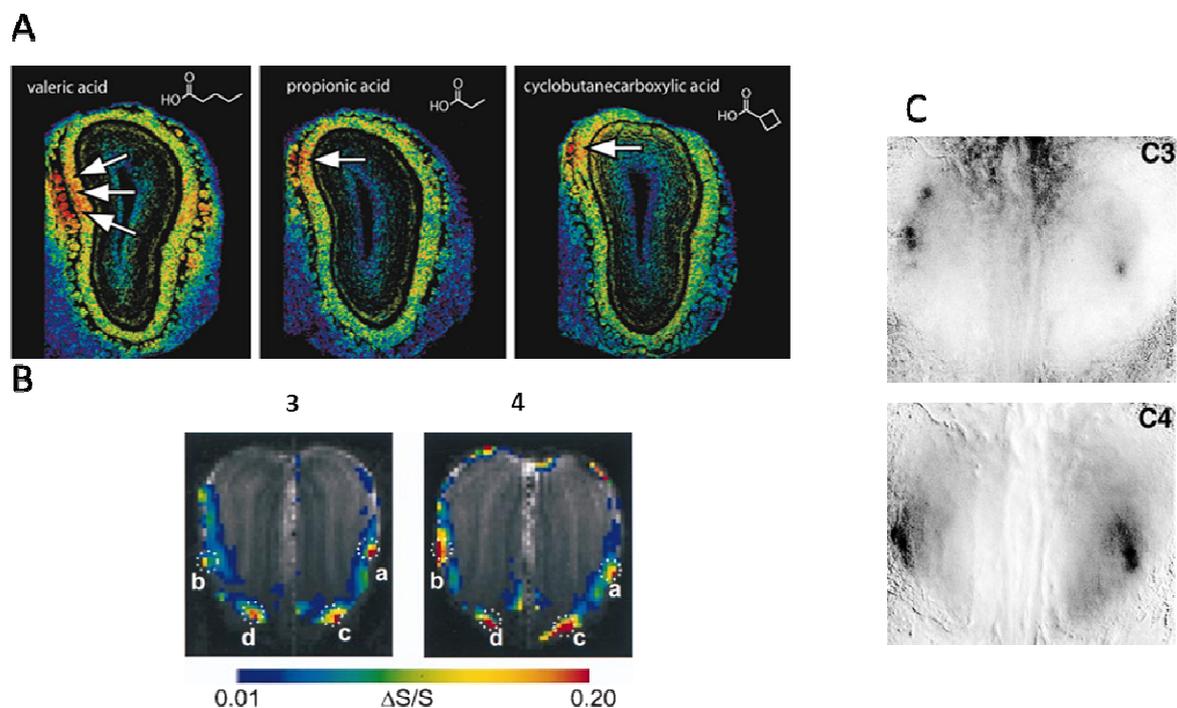
Cette technique utilise en partie une source de contraste liée aux changements d'oxygénation et du volume sanguins (comme le BOLD), mais aussi aux changements des propriétés diffusives des tissus suite à l'activation. L'IOSI est basée sur les changements de réflectance des tissus activés par rapport à leur état de repos. Cette technique a été développée dans les cortex visuel du chat et somatosensoriel du rat (Grinvald et al., 1986) et appliquée une dizaine d'années plus tard à l'étude du codage spatial des odeurs dans le BO (Rubin & Katz, 1999).

Elle présente l'avantage par rapport au 2DG et au BOLD de pouvoir étudier la carte spatiale pour plusieurs odeurs à plusieurs concentrations chez le même animal avec une résolution spatiale et temporelle plus importante ( $<100 \mu\text{m}$  et  $<500 \text{ms}$ ). L'instrumentation et la méthodologie de cette technique sont relativement simples. Elles sont décrites en détails dans le chapitre IV 'Matériel et méthodes'. La carte d'activation est obtenue par comparaison de la réflectance enregistrée pendant la période de stimulation et celle enregistrée pendant une période de ligne de base, calculée juste avant la stimulation. La soustraction du nombre de photons réfléchis et détectés par la caméra entre les deux périodes permet d'observer une baisse de la réflectance pendant la stimulation due à l'augmentation de l'absorption des photons dans les zones activées. Après calcul, ces zones apparaissent plus sombres que les autres régions sur la carte spatiale (figure I.4C).

La résolution spatiale de cette technique a permis une avancée considérable dans la compréhension du codage spatial olfactif parce qu'elle permet l'étude fine des cartes d'activation spatiale (de l'ordre du glomérule) en fonction de la quantité (concentrations) et de la qualité (groupements chimiques fonctionnels) des molécules odorantes (Uchida et al., 2000). Des marquages de la cytochrome oxydase chez le rat ont montré que les zones activées correspondaient à des glomérules (Meister & Bonhoeffer, 2001).

Cependant, l'origine biophysique de ce signal reste débattue. A 630nm, les changements des propriétés de diffusion du tissu nerveux peuvent être dus à la fois aux changements de l'oxygénation de l'hémoglobine et de volume sanguin mais aussi à la biréfringence axonale ou au gonflement cellulaire dû à l'activité (Meister & Bonhoeffer, 2001). Malgré cela, des études pharmacologiques ont permis de comprendre les bases cellulaires du signal intrinsèque. Le blocage de la transmission GABAergique, dopaminergique, glutamatergique, et de la recapture du glutamate ont révélés que seule la libération présynaptique de glutamate et sa recapture par les astrocytes sont des voies indispensables pour l'obtention du signal intrinsèque (Gurden et al., 2006). Ces résultats montrent que les signaux endogènes détectés par l'imagerie optique intrinsèque sont synaptiques et ne dépendent pas de l'activité des potentiels d'action post-synaptiques (Thomsen et al., 2004).

Enfin, il est à préciser que l'inconvénient majeur de toutes les techniques optiques que nous allons décrire est qu'elles ne permettent d'imager que la face dorsale du BO, ce qui ne représente environ que 200 glomérules sur les 1000 présents dans le BO de rat (M Meister & Bonhoeffer, 2001).



**Figure I.4. Cartes d'activation spatiale du BO visualisées avec différentes techniques se basant sur des signaux endogènes liés au métabolisme énergétique.** A. Cartes d'activation obtenues par imagerie 2DG en réponse à trois molécules portant des fonctions acides. Vue anatomofonctionnelle d'un hémibulbe (coupes coronales). B. Cartes d'activation (coupes coronales) obtenues par IRMf chez deux animaux différents (#3 et #4) en réponse à une exposition à l'isoamyl acetate  $10^{-2}$  vapor pressure durant 4,8 minutes. Notons la reproductibilité des cartes chez les deux animaux. C. Cartes d'activation induites par du propanal (en haut) et butanal (en bas) obtenues par IOSI (vue dorsale). A. Figure modifiée de Johnson & Leon., 2007. B. Modifiée de Yang et al., 1998. C. Modifiée de Belluscio & Katz., 2001.

### II.1.2. Cartographie par utilisation de traceurs exogènes dépendants de l'activité

En dépit de la bonne résolution spatiale de l'IOSI, sa résolution temporelle reste largement insuffisante pour étudier la dynamique du codage spatial des odeurs. En effet, des études comportementales suggèrent que les odeurs sont traitées par le cerveau en  $\sim 300$  ms (Abraham et al., 2004; Uchida & Mainen, 2003). La réponse des glomérules à l'odeur doit donc s'effectuer dans un laps de temps très court, autour de 100ms. Le couplage neuro-énergétique sur lequel se base les méthodes décrites précédemment est plus lent que l'activité synaptique qui l'induit. La nécessité de suivre en temps réel la mise en place de la carte spatiale dans le BO a mené à l'utilisation de techniques qui permettent d'avoir une résolution spatiale équivalente à l'IOSI mais avec une meilleure résolution temporelle.

Pour l'étude des cartes spatiales dans le BO, des marqueurs exogènes de l'activité neuronale ont donc été utilisés afin de suivre la mise en place des cartes d'activation au cours du temps chez le rongeur anesthésié, mais aussi chez l'animal vigile restreint de ses mouvements.

#### ***II.1.2.1. Cartographie par utilisation de sondes voltage-sensitives***

Cette technique est basée sur l'incorporation par les membranes cellulaires de sondes fluorescentes voltage-dépendant (Voltage Sensitive Dye Imaging, VSDI). Ces sondes sont sensibles aux variations du voltage membranaire et présentent une augmentation de fluorescence de manière linéaire avec les changements de voltage de la membrane. La fluorescence augmente en quelques millisecondes, ce qui est inférieur au temps nécessaire à l'élaboration d'un potentiel d'action. Ceci donne une excellente résolution temporelle rendant compte de l'activité neuronale locale en temps réel (Pain et al., 2011).

Cette technique a été longtemps écartée car elle présentait de nombreux inconvénients, le plus important étant le faible rapport signal/bruit. Ce défaut était dû aux nombreuses liaisons non spécifiques des molécules chimiques développées, et à l'absorption par l'hémoglobine des photons de fluorescence émis. L'avènement de nouvelles sondes fluorescentes avec des longueurs d'ondes d'excitation en dehors du pic d'absorption de l'hémoglobine a constitué une grande avancée dans le domaine. En effet, des sondes plus spécifiques améliorent le contraste signal sur bruit, ce qui évite de moyenniser des nombreuses acquisitions avec des temps d'exposition relativement longs et potentiellement toxiques pour le tissu. Le développement de caméras de plus en plus performantes a rendu cette technique très appropriée pour suivre le déroulement temporel de l'activation des cartes spatiales. Les cartes spatiales obtenues en VSDI sont comparables à celles obtenues en IOSI mais l'activation y est visualisée sept fois plus rapidement (figure I.5A; Spors & Grinvald, 2002).

Les bases cellulaires des signaux VSDI sont encore mal connues. Les cellules induisant ces signaux sont probablement des neurones compte tenu de la faiblesse et la lenteur de la dépolarisation des astrocytes. Des études pharmacologiques ont montré que ces signaux proviennent des compartiments postsynaptiques, dans la mesure où le blocage des potentiels d'action sodium-dépendants par le TTX, et les antagonistes des récepteurs glutamatergiques tels que l'APV et le NBQX, inhibent ce signal optique (Spors & Grinvald, 2002).

#### ***II.1.2.2 Cartographie par utilisation de sondes calciques exogènes***

L'activité synaptique est fortement liée aux flux calciques. Ces ions ont donc été utilisés pour suivre l'activité cérébrale, grâce à des sondes calciques fluorescentes couplées à l'imagerie optique. Les traceurs calciques utilisés sont incorporés par les cellules et stockés dans le cytoplasme. Les marqueurs calciques peuvent être exogènes, ou endogènes chez des souris transgéniques (II.1.3).

Des marqueurs exogènes présynaptiques (calcium green oregon) ont été développés et utilisés chez la souris (Wachowiak & Cohen, 2001). La sonde est instillée dans la narine avec un perméabilisant de

membranes (0,1% Triton x 100), pénètre dans les OSN puis est transportée de manière antérograde vers les terminaisons axonales glomérulaires. Cette technique permet de cartographier l'activation du BO par imagerie des OSN activés par l'odorant. Bien que les seuils d'activation soient les mêmes pour les techniques d'IOSI et d'imagerie calcique, il faut 1,5s pour atteindre la ½ du maximum d'activation pour les signaux IOSI, là où 100-250 ms sont suffisantes pour l'imagerie calcique (Wachowiak & Cohen, 2003). La haute résolution temporelle de cette technique a permis d'étudier le déroulement temporel des représentations spatiales des odeurs chez des animaux anesthésiés et vigiles (Verhagen et al., 2007; Wachowiak & Cohen, 2003) (figure I.5A et I.7). Ceci a permis de déterminer des corrélations entre l'activité de flairage et le déroulement temporel de l'activation spatiale dans le BO avec la détection de zones activées qui sont plus focales que celles détectées en IOSI (85 vs 122 µm de diamètre). Cette technique, bien que reproductible d'un animal à l'autre (figure I.5B) présente cependant quelques inconvénients. En effet, 4 jours sont nécessaires entre l'instillation de la sonde dans les narines et l'imagerie. Ce temps est dû au transport des sondes vers les extrémités axonales (Fried et al., 2002; Wachowiak & Cohen, 2003). En plus de la perte de signal par photoblanchiment, une partie est absorbée par l'activité hémodynamique (Fried et al., 2002 ; Wachowiak & Cohen., 2003).

### **II.1.3. Cartographie par utilisation de souches d'animaux transgéniques**

Une alternative intéressante à l'injection de sondes fluorescentes exogènes dans le BO a été d'utiliser des souris transgéniques avec des marqueurs d'activité calcique fluorescents produits de façon endogène. Deux souches d'animaux transgéniques permettant la visualisation de l'activité neuronale ont été développées. Une première souche (SpH) permet de voir l'activité de libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique alors qu'une autre (GCaMP2) permet d'observer l'activité postsynaptique. Le rapport signal sur bruit de ces deux marqueurs est comparable à celui de l'imagerie calcique exogène (Bozza et al., 2004).

#### ***II.1.3.1. Cartographie de la libération des vésicules présynaptiques par utilisation de SpH (figure I.5C)***

En 2004, Bozza et al. ont proposé l'usage de la SpH (Synapto-pHluorine) pour marquer les OSN. Cette protéine contient un fluorophore sensible au pH et la protéine associée aux vésicules synaptiques VAMP-2. Le domaine fluorescent est situé du côté de la vésicule où le pH est acide et où la fluorescence est faible. Lors de l'activation, les vésicules synaptiques s'associent à la membrane plasmique de la cellule et la protéine se retrouve dans la fente synaptique extracellulaire à pH plus élevé, ce qui induit l'augmentation de la fluorescence.

Cette protéine a été utilisée comme marqueur d'activité des OSN en couplant son expression à celle d'une protéine présente uniquement dans ces neurones : l'OMP (pour Olfactory Marker Protein). Chez ces souris, une fluorescence basale due à la présence de SpH dans les membranes plasmiques des

terminaisons axonales des OSN est observée dans les glomérules : cette fluorescence a été décrite comme étant variable entre les glomérules de par la variabilité de l'expression de l'OMP dans les OSN. Cette technique permet d'avoir une meilleure amplitude de signal et une meilleure résolution spatiale que celle obtenue par IOSI : les cartes obtenues chez les souris SpH montrent des changements relatifs des signaux d'environ 4% (Soucy et al., 2009) de 10 à 20 fois supérieurs à l'amplitude observée en IOSI (Wachowiak et al., 2005). Les cartes établies sont spécifiques de chaque odeur mais contrairement aux autres techniques d'imagerie optique, la saturation du signal est plus difficile à atteindre (Bozza et al., 2004). Des différences de résultats sont observées avec les marqueurs présynaptiques de colorants calciques, différences dues probablement au type de marqueur, exogène versus endogène génétiquement modifié. Enfin, en plus du photoblanchiment, une partie de ce signal est absorbée par l'activité hémodynamique. Les temps de récupération lents ne permettent pas l'étude fine de la dynamique temporelle des cartes d'activation (Bozza et al., 2004).

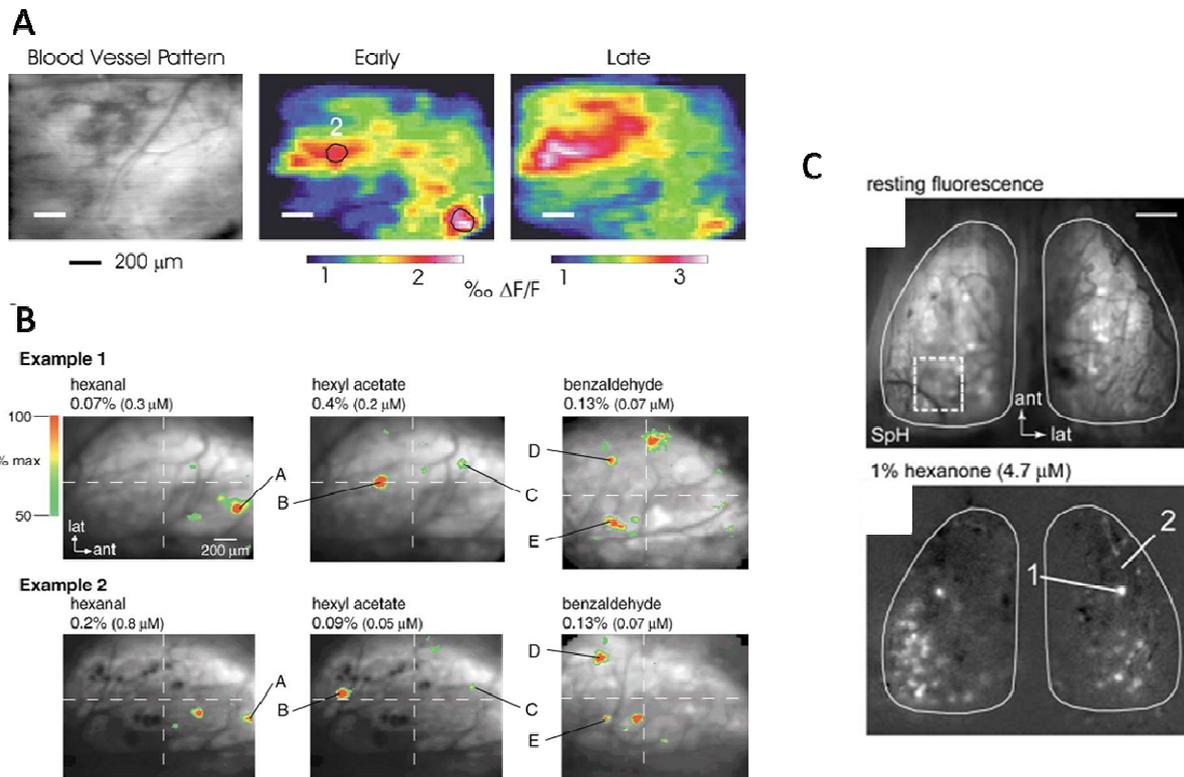
#### ***II.1.3.2. Cartographie par imagerie de l'activation postsynaptique par utilisation de GCaMP2***

Ce type d'imagerie est rendu possible grâce à l'utilisation d'une souche de souris exprimant la GCaMP2, indicateur fluorescent de calcium, dans le compartiment postsynaptique. L'expression du gène est sous le contrôle du promoteur d'un canal potassique postsynaptique (KV3.1). Cette technique permet de voir des cartes d'activations avec des variations de signal allant de 4-6 % (Fletcher et al., 2009). L'expression de la GCaMP2 a été caractérisée dans les cellules postsynaptiques : les M/TC et JC. Elle permet de voir un signal diffus sur lequel se superposent des spots très focaux (67  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne). La résolution spatiale des points focaux est correcte mais la résolution temporelle est inférieure à celles du signal VSD postsynaptique, ou calcique présynaptique, ce qui ne donne pas accès à la dynamique temporelle de la mise en place des cartes spatiales. Le blocage de la signalisation glutamatergique supprime le signal induit par stimulation électrique de l'ONL, confirmant l'origine post synaptique du signal (Fletcher et al., 2009).

#### **II.1.4. Autres techniques en cours de développement pour l'étude du codage spatial dans le BO**

L'imagerie IRM avec renforcement de contraste par le manganèse (ou Manganese-Enhanced MRI) est utilisée depuis quelques années (Pautler et al., 1998). Du point de vue ionique, le manganèse est un analogue du calcium pour les cellules et son accumulation dépend de l'activité neuronale puisqu'il y pénètre par des canaux calciques voltage-dépendants et des récepteurs NMDA (Itoh et al., 2008). Une fois injecté dans la cavité nasale sous forme de chlorure de manganèse, il peut être capté par les OSN et transporté de manière antérograde par les axones et traverser les synapses. Ce type d'imagerie donne des cartes d'activation reproductibles, avec une symétrie bilatérale mais reste assez faible en termes de résolution temporelle : seule une étude récente a pu atteindre la résolution d'un glomérule unique (Chuan et al., 2010). A terme, il devrait théoriquement permettre d'étudier toute la circuiterie

activée de la MO aux cortex olfactifs, dans la mesure où le manganèse est transportable à travers les synapses et a une demi-vie de l'ordre de la semaine.



**Figure I.5. Cartes d'activation spatiale du BO visualisées par des techniques d'imagerie optique utilisant des sondes exogènes de l'activité neuronale.** A. Cartes induites obtenues par imagerie VSD en réponse à l'éthylbutyrate 1% permettant de voir les différences d'activation entre les phases précoce (early entre 150-300ms après stimulation) et tardive (late entre 300-500ms après stimulation). Notez l'extension de la zone activée dans le BO dorsal. B. Cartes glomérulaires induites par trois odeurs différentes à des concentrations faibles, proches du seuil d'activation, montrant une reproductibilité interindividuelle des cartes (exemple 1 et 2 représentent deux souris différentes). C. Cartes olfactives obtenues chez la souris SpH. En haut, fluorescence de base chez les souris SpH, en bas, carte d'activation induite par l'hexanone 1%. A. Figure modifiée de Spors et Grinvald (2002). B. Modifiée de Wachowiak et Cohen (2001). C. Modifiée de Bozza et al. (2004).

## II.2. Caractéristiques des cartes d'activation glomérulaires

Malgré de grandes différences dans les études d'imagerie selon l'espèce de rongeur étudiée, l'anesthésie utilisée, les différentes odeurs présentées (différentes identités, durées de présentation, et concentrations), les dispositifs expérimentaux utilisés (2DG, IOSI, IRM) et surtout l'origine biophysique des signaux fonctionnels, toutes les images obtenues ont montré de façon répétitive et fiable une représentation spatiale des odeurs dans le BO. Ces études ont décrit des cartes d'activation spatiales ayant les mêmes caractéristiques précises que nous allons résumer ici en insistant plus particulièrement sur les résultats d'imagerie optique en IOSI que j'ai utilisée pendant ma thèse.

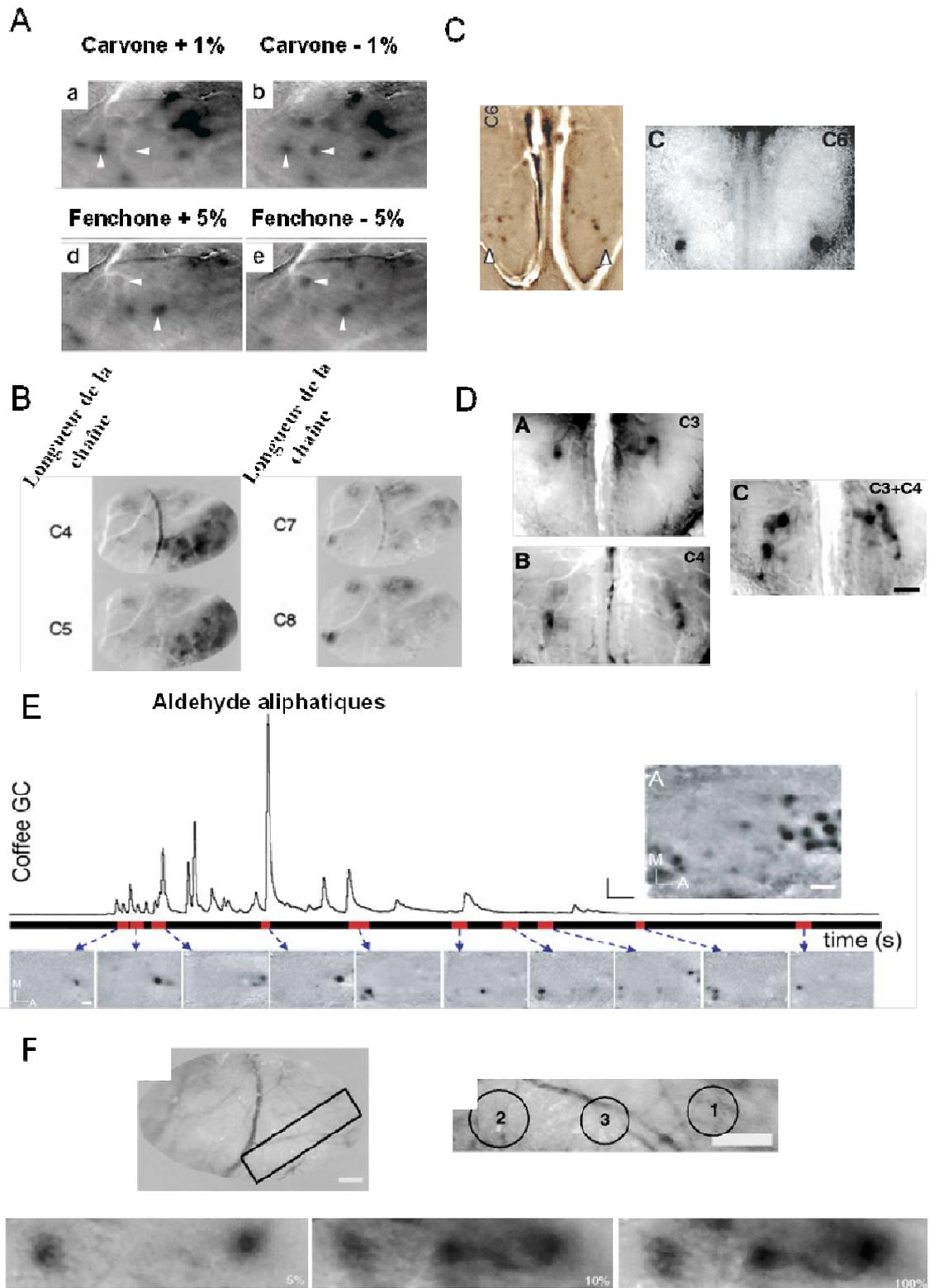
Les cartes d'activation visualisées par IOSI correspondent bien à des glomérules activés. Comme visualisées sur des coupes anatomiques, ces glomérules sont de taille variable de 50 à 150  $\mu\text{m}$  (Meister & Bonhoeffer., 2001 ; Lin et al., 2006). Les cartes sont symétriques dans les deux hémisphères du BO et relativement reproductibles (Belluscio & Katz, 2001; Meister & Bonhoeffer, 2001; Soucy et al., 2009).

Dès les premières études de la représentation spatiale des odeurs dans le BO par imagerie 2DG (Stewart et al., 1979), la théorie selon laquelle chaque odeur a sa propre représentation spatiale a été confirmée. Il existe en fait une certaine chimiotopie dans le BO, c'est à dire une répartition spatiale des réponses dans les glomérules du BO en fonction des groupements chimiques des molécules odorantes. A titre d'exemple, les groupements carboxyliques COOH ou aldehyde CHO activent la partie antéro-médiane alors que les groupements OH activent le côté latéral sur des cartes de la partie dorsale du BO visualisées en imagerie optique (Uchida et al., 2000). La ségrégation spatiale de l'activation des glomérules a été confirmée peu de temps après sur l'ensemble du BO par imagerie 2DG (Johnson et al., 2002). Cependant ces deux études montrent également que cette chimiotopie n'est pas stricte. Si la définition de zones larges contenant un grand ensemble de glomérules semble juste, à une échelle plus restreinte, la chimiotopie n'est plus respectée car deux glomérules adjacents peuvent répondre à des molécules odorantes totalement différentes dans leur structure chimique (Soucy et al., 2009). Le degré de précision de la chimiotopie et son implication dans la représentation spatiale et la discrimination olfactive restent encore à être déterminées.

Des molécules proches dans leurs structures chimiques et leur longueur de chaînes carbonées activent des cartes relativement similaires (Rubin & Katz, 1999 ; Uchida et al., 2000) (figure I.6A, I.6B), cartes dans lesquelles, conformément aux données obtenues sur les OSN, la représentation combinatoire au niveau des glomérules existe: par exemple la carte spatiale spécifique de l'odeur de sauce de soja partage des glomérules avec celle de l'odeur de vinaigre. Certaines odeurs ont même des cartes spatiales quasi similaires comme l'odeur d'amande grillée avec celle du beurre de cacahuète (Lin et al., 2006). Des cartes très proches dans leur composition mais toutefois distinctes sont également obtenues en réponse à des énantiomères (Stewart et al., 1979 ; Rubin & Katz, 2001). Les énantiomères sont des molécules similaires en terme de composition en atomes (longueur de chaîne et de groupement chimique identiques) mais non superposables. Pour mieux se représenter ces molécules dans l'espace on peut imaginer qu'elles ressemblent à des mains : la main gauche est semblable à la droite mais il est impossible de les superposer, dans le même sens chaque molécule est l'image en miroir de son énantiomère. Les énantiomères induisent des cartes d'activation bulbaires proches mais différentes. Des études très intéressantes sur les énantiomères ont été publiées par (Linster et al., 2001; Linster et al., 2002) en imagerie 2DG et IOSI par Rubin et Katz (2001) (figure I.6-A). Du point de vue comportemental, les odeurs structurellement proches et qui évoquent des cartes qui se recouvrent sont difficiles à discriminer comparées à des molécules structurellement éloignées. Toutefois, même dans

le cas d'une paire d'énantiomères comme le limonène que les rats ne distinguent pas du tout spontanément (Linster et al., 2002), l'apprentissage (qui sollicite l'ensemble des mécanismes de représentation spatiotemporelle des odeurs) aboutit à une discrimination efficace de ces odeurs.

En plus, d'être dépendantes des structures chimiques des molécules, la formation des cartes est aussi dépendante des concentrations (de la quantité de l'odorant). Ainsi, pour la même molécule, les cartes d'activation obtenues sont plus étendues si les concentrations sont augmentées (Rubin & Katz, 1999 ; Meister & Bonhoeffer., 2001 ; Grossman et al., 2008) . L'augmentation du temps de stimulation augmente le signal des glomérules faiblement activés et permet l'activation de glomérules supplémentaires (Bozza et al., 2004). Les variations de flux d'air dans la cavité nasale sont également importantes pour fixer l'activité des OSN dans la MO et les cartes glomérulaires dans le BO (Oka et al., 2009).



**Figure I.6. Caractéristiques de la représentation spatiale des odeurs visualisées par imagerie optique du signal intrinsèque.** A. Similarité des cartes en réponse à des énantiomères avec quelques différences dans le pattern d'activation (flèches blanches). B. Similarité des représentations spatiales pour des molécules proches (4-5 et 7-8 carbones). Les différences de plus de 2 carbones induisent de légers changements des cartes spatiales. C. Symétrie des représentations spatiales des odeurs (hexanal) dans les deux hémibulbes. D. La carte d'activation spatiale d'un mélange artificiel est proche des cartes spatiales induites individuellement par les différents composants. E. Carte spatiale induite par l'odeur de café chez le rat. La décomposition par chromatographie en phase gazeuse des différents odorants composants l'odeur de café est suivie au cours du temps. Les points rouges montrent la stimulation par le composé isolé à un temps donné et sa carte est représentée. L'addition des cartes induites par les différents composants du café est sensiblement proche de celle induite par l'odeur brute de café. F. en haut, à gauche : image d'un hémibulbe, avec la région d'intérêt encadrée et agrandie dans le cadran de droite. En bas, les réponses de plus en plus fortes à trois concentrations croissantes d'Isoamyl Acétate (de gauche à droite : 5%, 10% et 100%). A. Figure adaptée de Rubin & Katz (2001). B. Adaptée de Rubin & Katz (1999). C gauche : adaptée de Meister & Bonhoeffer (2001). C. droite adaptée de Belluscio & Katz (2001). D. Adaptée de Belluscio & Katz (2001). E. Adaptée de Lin et al. (2006). F. Adaptée de Rubin & Katz 1999.

Précédemment, nous avons précisé que les odeurs naturelles n'étaient pas des odorants purs mais des mélanges de molécules divers avec différents groupements chimiques et à des concentrations différentes. L'étude des cartes d'activations pour une odeur pure ne suffit donc pas à rendre compte du codage spatial des odeurs naturelles. Une combinaison dans un mélange d'odorants purs a d'abord été étudiée par Belluscio et Katz (2001) : ils sont arrivés à la conclusion que la résultante spatiale d'une combinaison d'odorants était l'addition des deux cartes spatiales des odorants purs isolés (Belluscio & Katz, 2001). Cette étude a utilisé des odorants proches : avec la même fonction aldéhyde et avec une différence d'un seul carbone (propanal et butanal 1% de pression de vapeur). Dans la nature, les concentrations de ces molécules ne sont pas équivalentes. Si les concentrations des odorants constituant un mélange sont différentes, la carte spatiale est une addition des glomérules activés par les odorants isolés, dominée par la carte spatiale du composant le plus concentré dans le mélange (Grossman et al., 2008). Ce mélange reste également loin des odeurs naturelles : les odorants utilisés ont également les mêmes fonctions chimiques et sont peu nombreux (seulement 2) comparé aux odeurs naturelles.

L'étude des cartes spatiales induites par des odeurs naturelles a fait l'objet d'une étude très intéressante qui a établi une cartographie d'odeurs naturelles au niveau dorsal du BO. Dans cette étude menée en 2006, Lin et collaborateurs ont cartographié les cartes d'activation pour des épices, des amandes grillées, du beurre de cacahuète ainsi que pour du café et d'autres odeurs naturelles. Ils ont montré que ces odeurs naturelles avaient, de même que les odeurs pures, des cartographies propres à elles et reproductibles globalement d'un animal à l'autre. Grâce à une chromatographie en phase gazeuse, ils ont pu séparer les molécules odorantes des odeurs naturelles et établir que la carte spatiale des odeurs naturelles était l'addition des cartes spatiales des différentes molécules qui la composent (figure I.6E).

Enfin, il est à noter que toutes les modifications des cartes spatiales que nous avons décrites dans cette section pourraient impliquer une forte composante d'interactions entre glomérules. Il pourrait exister un mécanisme d'inhibition centre-pourtour où le glomérule le plus activé (par les OSN les plus affins pour la molécule odorante présentée) inhibe les autres glomérules. Après une controverse forte entre Vucinić et al. (2006) et Pérez & Wachowiak (2008) qui ont visualisé l'activation des terminaisons axonales des OSN par imagerie calcique, il semble qu'au niveau glomérulaire ces interactions ne soient pas fortement présentes et que la carte spatiale visualisée corresponde bien au panel des OSN activés. Seules des modulations intraglomérulaires puissantes par les multiples interactions OSN-JC-M/TC seraient impliquées pour fixer finalement l'intensité de l'activation.

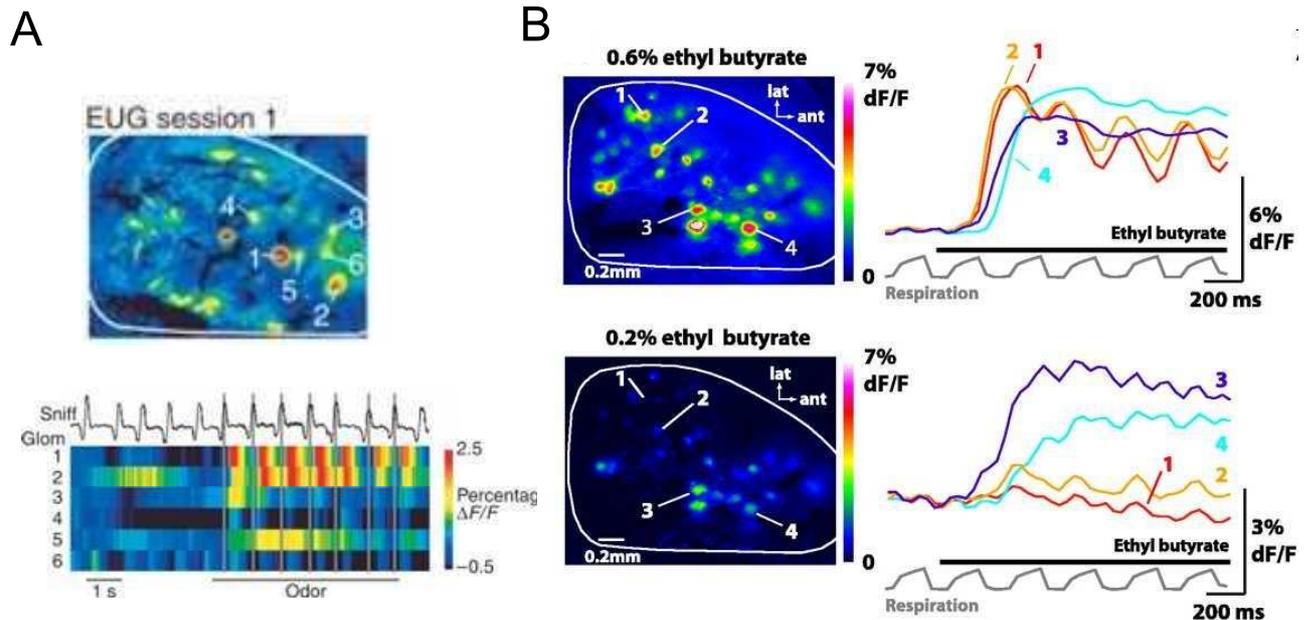
### **II.3. Aspect temporel des cartes d'activation glomérulaires**

Les techniques d'imagerie optique à haute résolution temporelle ont permis d'observer une dynamique temporelle dans l'établissement des cartes d'activation spatiales. En VSDI, une oscillation à 2Hz

correspondant au rythme respiratoire a été observée, suggérant une modulation des cartes d'activation par celle-ci : pendant les 40 premières millisecondes, les cartes d'activation pour une même odeur à différentes concentrations sont les mêmes. Ceci indique que le pattern précoce de la représentation spatiale ne change pas et que les glomérules additionnels pour les plus fortes concentrations s'activent tardivement (Spors & Grinvald, 2002).

L'imagerie calcique exogène a montré qu'il y avait un décalage temporel de l'activation à l'échelle d'un seul glomérule (Spors et al., 2006 ; Wachowiak et al., 2005). Ces observations de la dynamique temporelle du codage spatial ont conduit à une étude des effets du flairage sur les cartes d'activation spatiales (Spors et al., 2006 ; Verhagen et al., 2007).

Une étude très intéressante du groupe de Matt Wachowiak a permis de visualiser pour la première fois avec précision le devenir des cartes spatiales chez des ratte restreintes de leur mouvement et engagées dans une tâche de lick-no lick (Verhagen et al., 2007 ; Carey et al., 2009). Les cartes sont globalement les mêmes dans leur nature : il n'y a pas disparition ou apparition de glomérules avec l'apprentissage mais les dynamiques temporelles de leur apparition sont fortement régulées par le flairage : le passage d'une basse fréquence à une haute fréquence d'inspiration réduit fortement le signal en réponse à une odeur donnée. Si une odeur nouvelle est présentée durant le même cycle respiratoire de flairage, la carte résultante est une différence des glomérules activés entre les deux odeurs, et non pas une addition passive comme auraient pu le laisser penser les études effectuées chez l'animal anesthésié (figure I.7). Le flairage constitue donc un filtre adaptatif qui permet de rendre plus saillant une nouvelle odeur par rapport aux odeurs présentes dans l'environnement de l'animal.



**Figure I.7. Dynamique temporelle des cartes d'activation visualisée par imagerie calcique.** A. En haut : carte d'activation en réponse à l'eugénol (6 glomérules détectés) chez l'animal éveillé restreint de ses mouvements. En bas : décours temporel de l'activation des différents glomérules : chaque glomérule a son temps de latence et l'intensité de son activation varie pendant la durée de la stimulation odorante. Notez les différences d'activation du glomérule au sein de chaque cycle respiratoire. B. A gauche : cartes d'activations induites par l'éthyl butyrate à 0,2 et 0,6 % chez la souris anesthésiée et trachéotomisée. A droite : les décours temporels d'activation des quatre glomérules. Notons les différences d'intensité d'activation présentée par un même glomérule (1 ou 2) notamment pendant la forte stimulation. A. Figure adaptée de Verhagen et al., 2007. B. Adaptée de Spors et al., 2006.

Il apparaît donc depuis cinq ans maintenant, une dimension totalement nouvelle de l'activation glomérulaire : il existe une dynamique temporelle intra-glomérulaire et une dynamique générale de la carte spatiale en fonction de la fréquence respiratoire. Cependant, ces études par imagerie sur une dimension temporelle de la représentation des odeurs n'en sont qu'à leur début et restent nettement moins renseignées que les études sur la représentation temporelle des odeurs par techniques électrophysiologiques, utilisées depuis les années 1940 dans le domaine de l'olfaction. Elles dénotent néanmoins le fait qu'il n'y a pas de séparation nette entre le codage spatial superficiel et le codage temporel dans les couches profondes, et que les deux aspects se trouvent probablement à tous les étages du BO.

### III. Le codage temporel dans le BO

La représentation des odeurs dans le BO n'est pas un phénomène figé dans le temps. La représentation spatiale est, comme nous l'avons évoqué dans la section précédente, soumise à une dynamique temporelle. Cette dynamique temporelle se manifeste puissamment dans les couches profondes du BO, où la représentation spatiale est moins résolue (Cenier et al., 2008; Neville & Haberly, 2003) mais où

les enregistrements du potentiels de champ local (LFP) sont caractérisés par des oscillations. Cette idée de représentation temporelle des odeurs par les oscillations date des années 1940. A cette époque, Edgar Douglas Adrian a observé ce type d'activité dans le système olfactif du hérisson, dans de ce qu'on appellera plus tard le potentiel de champ local (Adrian 1942). Ces oscillations changent de fréquences lorsque des odeurs sont présentées, et l'idée d'une représentation temporelle des odeurs dans le cerveau commence à germer. Cette idée, encore fortement d'actualité, est étudiée sous différents aspects dont nous verrons les grands lignes dans cette section. Le décryptage des réponses oscillatoires n'est pas le seul angle d'étude du codage temporel dans le BO. L'activité unitaire des neurones y est analysée dans un contexte où l'idée simpliste de la correspondance [un neurone = une information] qui serait à la base du codage dans le cerveau est rapidement écartée parce qu'un neurone répond à plusieurs stimuli. Cette idée fait place à une autre, plus complexe, de codage par assemblées neuronales.

De nombreuses revues sont disponibles sur les modalités du codage par assemblées de neurones synchronisés ce sujet (Buzsáki, 2010; Laurent, 1996; Singer, 1993). Je ne décrirai pas ces modalités en détails mais j'utiliserai quelques points importants pour introduire cette section. Nous avons vu dans la partie II de ce chapitre consacré au codage spatial que le traitement des odeurs au niveau du BO s'accompagne d'une activité distribuée sous forme de cartes spatiales. Comme pour tout cortex sensoriel ou par extension, réseaux cérébraux, la question qui se pose est de savoir comment ces activités spatialement très distantes sont intégrées pour aboutir à une représentation cohérente. Le codage par assemblées de neurones a d'abord été proposé par Donald Hebb, à la fin des années 1940 (revue par Morris, 1999). Son hypothèse était que le traitement des informations dans le cerveau repose sur la formation d'assemblées, qui sont des groupes de neurones interconnectés. Selon cette théorie, « La stimulation d'un nombre suffisant de neurones d'une assemblée devrait entraîner la stimulation de toute l'assemblée, grâce aux interconnexions qui existent entre les neurones d'une même assemblée ». Ces assemblées peuvent se créer aussi bien à l'échelle locale d'une structure, comme à celle plus globale d'un réseau de structures (Varela, 1995; Varela et al., 2001) Ainsi, il est nécessaire dans ce modèle que les éléments de l'assemblée soient reconnaissables. Ce marquage serait réalisé temporellement par une synchronisation fine de la décharge des neurones d'une même assemblée. Cette occurrence temporelle présenterait de plus l'avantage de favoriser la transmission de l'information entre structures ainsi que les mécanismes de plasticité (Axmacher et al., 2006; Singer, 1993). La théorie du codage par assemblée de neurones synchronisée est parfois controversée (Shadlen & Movshon, 1999) mais a fait l'objet de nombreuses preuves expérimentales.

Le lien entre les activités synchrones et les oscillations est double (Singer 1993). Assez intuitivement, si une population de neurones décharge de façon synchrone et à un rythme donné, l'activité globale qui en résultera sera une oscillation. Les oscillations pourraient également fonctionner comme une base de temps pour l'occurrence des décharges neuronales, favorisant ainsi la synchronisation et la

formation des assemblées. Une des premières études expérimentales en faveur de cette hypothèse a été réalisée dans le système olfactif de l'insecte par le groupe de Gilles Laurent par l'enregistrement simultané des neurones individuels et des oscillations du potentiel de champ (pour revue Laurent, 1996). Représentation oscillatoire et unitaire sont indissociables et un intérêt croissant est porté à l'étude de la relation entre les décharges des assemblées neuronales et les oscillations pour déterminer leur évolution en fonction des odeurs et de l'intensité des stimulations (Cenier et al., 2008; Courtiol et al., 2011; Neville & Haberly, 2003). La piste du codage temporel des odeurs est ainsi ouverte et nous n'avons pas fini d'être surpris par ce qu'elle nous réserve (pour revue de l'historique du codage temporel : (Buonviso et al., 2006; Gervais et al., 2007; Kay et al., 2009; Rojas-Libano & Kay, 2008)).

Dans cette partie, nous allons décrire le codage temporel en commençant par les oscillations du LFP (partie II.1). Nous allons par la suite faire un point sur les dernières avancées dans le codage unitaire des odeurs (partie II.2) et enfin, évoquer la plasticité de ce codage temporel notamment suite à des apprentissages ou à des modifications du statut nutritionnel (partie II.3).

### **III.1. Les oscillations du LFP dans le BO en activité spontanée et en réponse aux odeurs**

Les oscillations du LFP décrites dans le BO sont caractérisées par leurs fréquences et sont appelées, des plus lentes aux plus rapides, thêta (~1–12 Hz), bêta (~15–35 Hz) et gamma (~40–100 Hz). Les différentes études disponibles dans la littérature ont été réalisées chez des animaux anesthésiés ou vigiles. Dans les modèles anesthésiés, des différences existent entre les profils oscillatoires selon l'état d'anesthésie (Fontanini & Bower, 2005) ou les différents anesthésiques utilisés. Nous détaillerons les différentes études sur les deux modèles et les variations des bandes de fréquences.

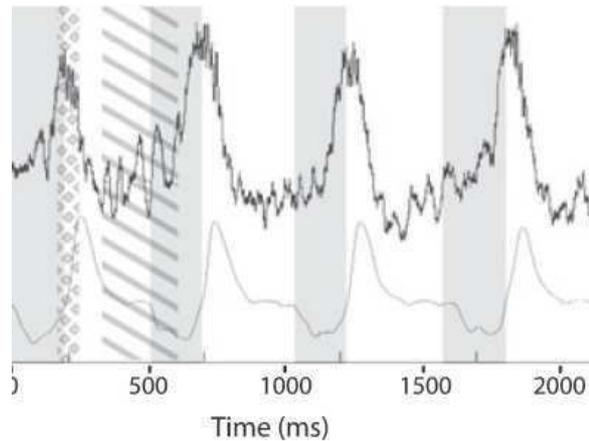
#### **III.1.1. Les oscillations thêta ou la modulation respiratoire**

L'activité respiratoire fait varier l'intensité et la direction des flux d'air dans les cavités nasales où se trouve la MO qui est l'organe sensoriel chargé de la détection des odeurs. Cette activité respiratoire régulée de manière passive, ou active par flairage, informe les animaux de la composition chimique de leur environnement. Certaines cellules du BO sont sensibles aux variations des flux d'air dans la cavité nasale (Courtiol et al., 2011). L'activité respiratoire est à même de porter une information qui se manifesterait dans le BO. Cette information s'exprime probablement, au moins en partie, dans les oscillations du LFP. Comme nous l'évoquons plus haut, l'activité oscillatoire a été liée à la respiration depuis les recherches menées par Adrian (1942). Effectivement les activités dans le BO sont dominées par une oscillation dont la fréquence correspond au rythme respiratoire (Buonviso et al., 2003; Cenier et al., 2008, 2009; Courtiol et al., 2011; Kay & Stopfer, 2006; Roux et al., 2006) et qui se caractérise par une grande amplitude comparées aux autres types d'oscillations plus rapides. Sa fréquence va, en fonction de l'espèce, de 1-4 Hz pendant une respiration normale à 12 Hz pendant l'activité de flairage

rapide lors de l'exploration d'un milieu ou de l'échantillonnage d'une odeur (Verhagen et al., 2007 ; pour revue Kay et al., 2009).

Les origines de ces oscillations thêta dans le BO ne sont pas encore élucidées. Elles pourraient être influencées à la fois par les activités afférentes et centrifuges. Toutefois, la cause première semble être la modulation du flux d'air sur la cavité nasale. L'activité rythmique pourrait être générée par la synchronisation des afférences provenant des OSN, qui sont mécanosensibles et donc activées par le flux d'air (Grosmaître et al, 2007). En effet, une absence ou un flux constant d'air supprime ces oscillations (Courtiol et al, 2011). Dans les glomérules, les cellules à panaches externes semblent aussi avoir un rythme de décharges pouvant sous-tendre ce type d'oscillations (Hayar et al., 2004). L'hypothèse d'une composante centrale de ce rythme oscillatoire est suggérée par des études qui trouvent des augmentations de la cohérence entre le rythme thêta de l'hippocampe et la modulation respiratoire du BO pendant le flairage (Kay, 2005; Macrides et al., 1982). Ces études conservent des zones d'ombre car ils n'ont pas été confirmés (Martin et al., 2007b) mais ont le mérite de poser la question d'un contrôle central de ces oscillations, expliquant éventuellement la conservation des rythmes observée sous trachéotomie. Le rôle fonctionnel du thêta, notamment dans des tâches cognitives n'est pas encore étudiée (Kay et al., 2009).

Les oscillations lentes comprennent deux phases dépendantes de l'activité respiratoire (figure I.8). La première phase, ascendante, correspond à l'inspiration, alors que la descente correspond à la phase d'expiration (Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2008, Roux et al., 2006 ; Rojas-Libano & Kay , 2008; Cenier et al., 2009 ; Kay et al., 2009 ; Courtiol et al., 2011). Les deux autres oscillations (bêta et gamma) se superposent à la modulation respiratoire à des endroits bien précis (figure I.8) : le rythme bêta se produit préférentiellement en fin d'expiration et donc au creux de l'oscillation alors que le gamma, plus rapide arrive à la transition inspiration/expiration, au pic de l'oscillation, et se poursuit quelques fois pendant une partie de l'expiration (Buonviso et al., 2003, Rojas-Libano & Kay, 2008 ; Kay et al., 2009).



**Figure I.8. Les oscillations du LFP dans le BO.** En haut, le signal brut, en bas la respiration. Les parties grisées correspondent à la phase d'inspiration alors que la partie blanche correspond à la phase d'expiration. Les oscillations bêta (10-35 Hz, partie hachurée) arrivent pendant la période d'expiration alors que les oscillations gamma (40-80 Hz, losanges gris) arrivent au moment de la transition inspiration/expiration. Figure adaptée de Cenier et al., 2008.

Dans ce qui suit, nous allons décrire les oscillations bêta et gamma qui se superposent au rythme respiratoire thêta.

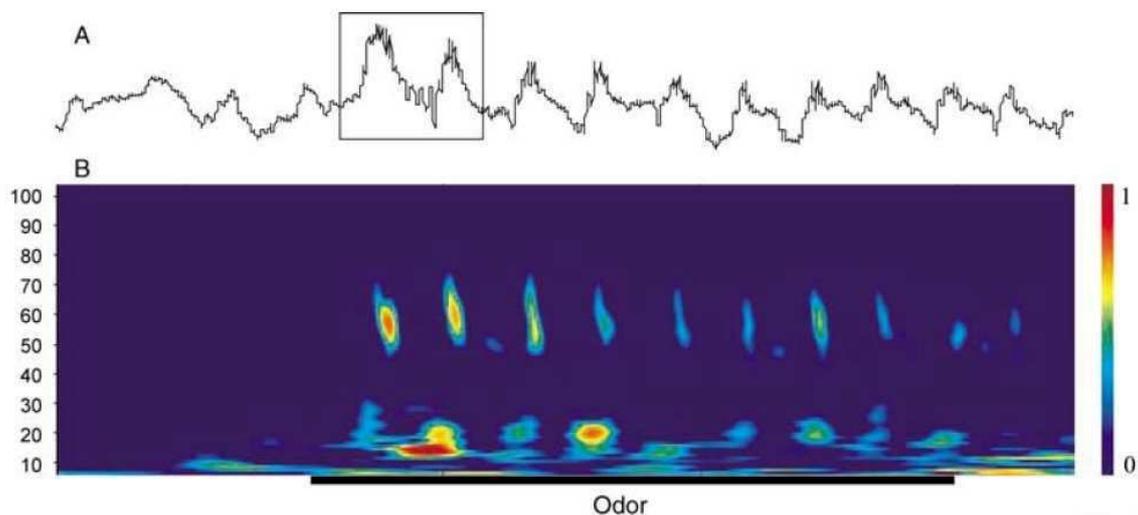
### III.1.2. Les oscillations bêta

Ce sont les plus lentes des oscillations dites rapides (figure I.8, I.9). Leur définition est variable dans littérature mais les fréquences considérées vont de 10 à 40 Hz (Cenier et al., 2008; Kay et al., 2009; Martin et al., 2004; Neville & Haberly, 2003). Chez l'animal anesthésié comme chez l'éveillé, les oscillations bêta ne sont pas observées en activité spontanée mais apparaissent suite à la présentation d'une odeur. En condition d'anesthésie, elles arrivent généralement en fin d'expiration. Chez l'animal éveillé, ces oscillations sont surtout étudiées en fonction d'autres facteurs tels que l'apprentissage.

Neville et Haberly (2003) ont montré, par une analyse de « Current Source Density » que le fonctionnement de la boucle M/TC/GC était impliqué dans la génération du rythme bêta. Sur tranche de BO de rat, les oscillations sous liminaires du potentiel de membrane des M/TC ont une fréquence comprise entre 10 et 40 Hz (Chen & Shepherd, 1997; Desmaisons et al., 1999). Nous pouvons faire l'hypothèse que les GC, en synchronisant les potentiels de membrane d'une population de M/TC fasse émerger une oscillation gamma dans le potentiel d'action (Lagier et al., 2004). Chez l'animal anesthésié, des décharges de potentiels d'actions à des fréquences proches et synchronisées avec le bêta sont décrites dans la couche des M/TC (Cenier et al., 2009) et celle des GC (Buonviso et al., 2003), ce qui renforce la probabilité d'une implication de la boucle M/TC/GC. Toutefois, à notre connaissance, aucun lien de causalité n'a été établi entre les oscillations bêta et la décharge de ces cellules.

Chez l'animal éveillé, les oscillations bêta dans le BO sont impliquées dans des tâches cognitives et d'apprentissage (Gervais et al., 2007; Martin et al., 2004; Martin et al., 2006) et sont sous la dépendance des structures corticales centrales (Neville & Harbeley., 2003 ; Martin et al., 2006).

Neville et Haberly (2003) proposent deux théories non exclusives quant à l'origine des oscillations bêta. Elles seraient dues à (i) une boucle comprenant 3 acteurs interconnectés M/TC et GC du BO et spécifiquement des fibres centrifuges des cellules pyramidales du cortex piriforme (ii) aux volées de potentiels d'action provenant des différentes aires corticales qui exercent un retour centrifuge vers le BO.



**Figure I.9. Les différentes oscillations du LFP dans le BO chez un rat anesthésié à l'uréthane.** A. Signal brut montrant les différentes oscillations par rapport à la modulation respiratoire (fréquence thêta) de grande amplitude. Dans le carré, l'oscillation gamma au sommet de l'oscillation thêta et la fréquence bêta au creux de celle-ci sont clairement visibles. B. Carte temps/fréquence représentant la puissance des oscillations (échelle de couleur) en fonction du temps (abscisses) et de la fréquence (ordonnées). La barre noire représente la stimulation (durée 5 sec). La fréquence gamma a un pic autour de 60 Hz alors que la fréquence bêta est un peu en dessous des 20 Hz. Noter l'alternance entre les deux types de fréquence (figure adaptée de Buonviso et al., 2003).

### III.1.3. Les oscillations gamma

Ce sont les oscillations de loin les plus étudiées dans la littérature (pour revue : Rojas-Libano & Kay, 2008 ; Kay et al., 2009). Elle sont rapides (~40-100Hz) et arrivent en bouffées pendant la transition inspiration/expiration du cycle respiratoire (Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2009, Courtiol et al., 2011, Rojas-Libano & Kay, 2008 ; Kay et al., 2009) (figure I.8, I.9). Elles ont lieu de manière spontanée chez les animaux éveillés (Martin et al, 2004, Martin et al., 2006) ou anesthésiés avec un

mélange kétamine/xylazine (Fontanini & Bower, 2005) alors qu'elles ne se manifestent qu'en réponse à l'odeur chez les animaux anesthésiés à l'uréthane (Neville & Haberly, 2003, Cenier et al., 2008 ; Courtiol et al., 2011), sauf dans l'étude de Aylwin et collaborateurs (2009) qui obtiennent un profil d'animal éveillé (mais il est utile de préciser que l'anesthésie de cette dernière étude est composée d'une induction à la kétamine et d'un maintien à l'uréthane). L'amplitude des bouffées gamma diminue en fonction de la profondeur de l'anesthésie chez les animaux sous kétamine/xylazine (Fontanini & Bower, 2005). Leur fréquence peut également varier selon les espèces, l'état de vigilance et l'anesthésique utilisé. Ainsi, les fréquences décrites dans la littérature vont de 40-90 Hz (Rojas-Libano & Kay, 2008 ; Kay et al., 2009) à 50-100 Hz (voire 130 Hz sous kétamine, Neville & Haberly, 2003).

Deux types de gamma sont décrits dans la littérature (Kay, 2003; Kay et al., 2009; Rojas-Libano & Kay, 2008). Le premier type dit gamma1 est observé lors de la stimulation odorante et lors de l'exploration du milieu. Il s'agit de l'activité initialement décrite et étudiée de façon extensive par Walter J Freeman dans les années 1970 (Freeman, 1978). Le second type dit gamma2 de plus basse fréquence (autour de 50-60 Hz) est observé pendant les périodes d'inactivité et de toilette et n'est pas observé chez le rat anesthésié (Kay et al., 2009).

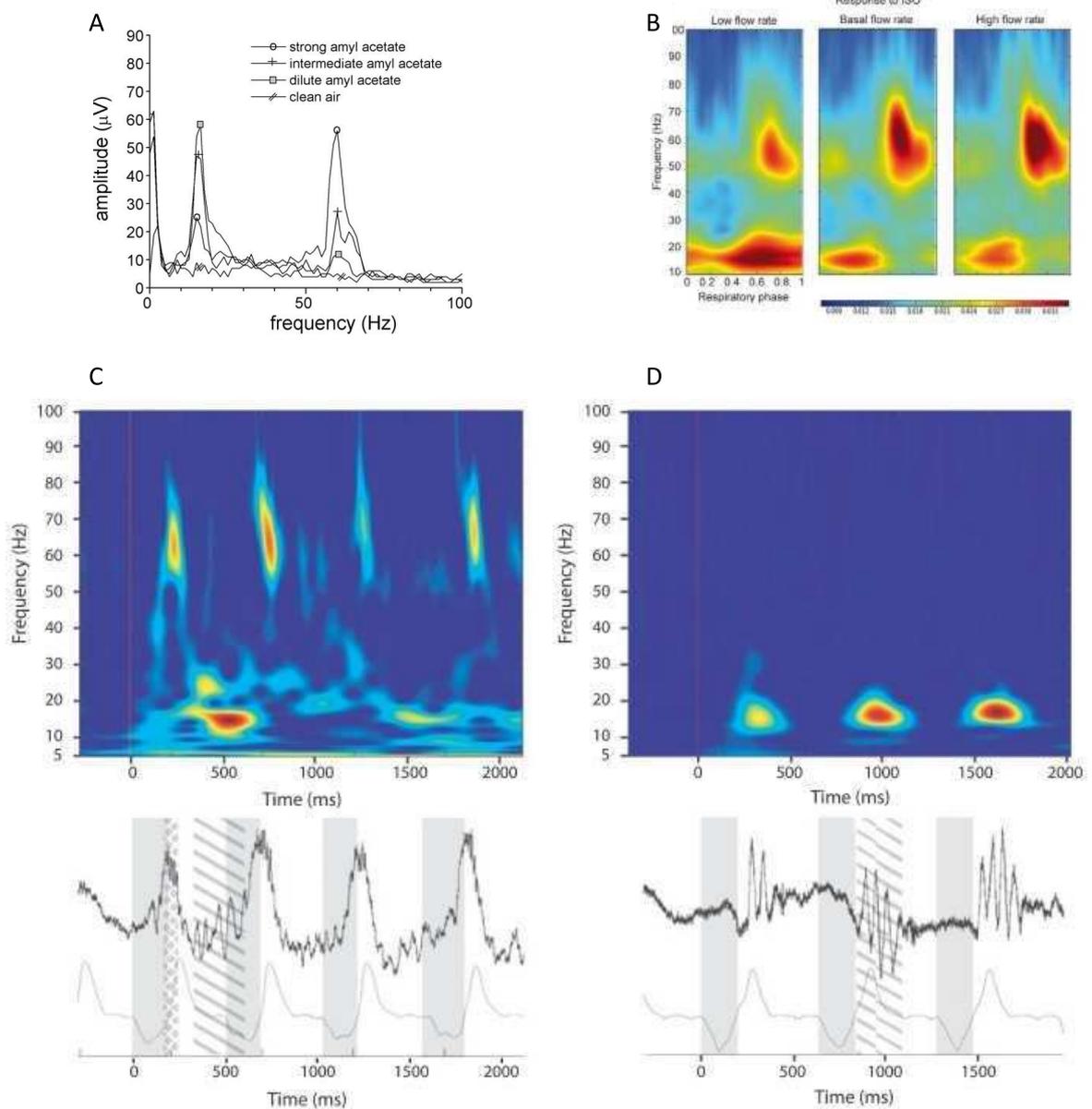
Les origines de ces oscillations sont mieux connues que pour le thêta ou le bêta. Elles sont liées aux interactions excitato-inhibitrices de la boucle M/TC/GC et sont décrites dans un grand nombre d'études (pour revue Rojas-Libano & Kay, 2008). L'activité gamma étant abolie suite à l'obstruction des narines (Gray & Skinner, 1988), elle serait déclenchée par l'activation mécanique des OSN (Grosmaître et al, 2007), puis des M/TC lors de l'inspiration. Les bouffées gamma seraient ainsi générées par une activation faible mais synchrone de M/TC à chaque nouveau cycle respiratoire, déclenchant un retour inhibiteur des GC. Ce sont les alternances excitation/inhibition au niveau des synapses réciproques entre ces deux types de cellules impliqués dans cette boucle qui génèrent le rythme gamma (Rojas-Libano & Kay , 2008).

#### **III.1.4. Les réponses oscillatoires aux odeurs**

Lorsque les animaux reçoivent une stimulation odorante, plusieurs profils oscillatoires peuvent apparaître (figure I.10). Chez les animaux anesthésiés à l'uréthane, des oscillations bêta et gamma peuvent être évoquées pendant une même stimulation odorante (Neville & Haberly, 2003 ; Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2008 ; Cenier et al., 2009 ; Courtiol et al., 2011). Trois profils de réponse sont décrits (Cenier et al., 2008) : (i) un premier profil dit classique se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations des deux bandes bêta et gamma, la bande gamma ayant lieu à la transition inspiration/expiration et la bande bêta ayant lieu à la fin de l'expiration (figure I.10C), (ii) un profil dit « betaless », qui se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations de la bande gamma, sans réponse dans la bande bêta (figure I.10A, Neville et Haberly,

2003) et enfin (iii) un profil dit « gammaless », qui se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations bêta uniquement, avec une oscillation bêta décalée dans le temps (figure I.10D).

Il semble que la nature de l'odeur n'affecte pas les propriétés intrinsèques des oscillations dans les deux bandes, mais détermine l'induction de l'un de ces trois profils en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, des groupements chimiques de la molécule et de la concentration des odorants (Cenier et al., 2008). Neville et Haberly (2003) décrivent aussi trois profils légèrement différents des précédents et, fait intéressant, qui varient de la même façon selon la concentration de l'odeur. Ainsi, l'acétate d'isoamyl induit un profil classique pour une concentration « moyenne », une réponse du type gammaless à plus faible concentration et une réponse de type betaless pour une forte concentration (figure I.10A). L'intensité de la stimulation peut aussi varier avec les flux d'air, ce qui a une influence sur le profil des activités oscillatoires. Dans une expérience sur des rats trachéotomisés, Courtiol et collaborateurs (2011) ont fait varier l'intensité des flux d'air entrant dans la cavité nasale. Lorsque le flux d'air mime une condition naturelle, ils observent un profil de réponse classique à l'acétate d'isoamyl. L'augmentation du flux d'air induit l'augmentation de la puissance du gamma alors que la diminution du flux induit l'augmentation de la puissance du bêta au détriment du gamma. Dans ce cas, l'alternance bêta/gamma est supprimée, et l'oscillation bêta se poursuit au delà de sa phase normale et est simultanée avec le gamma, plus faible (figure I.10B).



**Figure I.10. Différentes réponses oscillatoires pour différents odorants chez le rat anesthésié.** En haut : A. spectre des puissances pour différents types de stimulations : air pur ou concentration faible, intermédiaire et forte d'Acetate d'Isoamyl (Neville & Haberly, 2003). B. cartes temps/fréquence en réponse à l'acetate d'isoamyl avec un flux d'air variable : basal, faible et fort. A et B : dans les deux cas, les fréquences bêta sont favorisées par les faibles stimulations et les fréquences gamma par les fortes stimulations. C et D: En haut, cartes temps/fréquence représentant la puissance de l'oscillation (en code couleur) en fonction de la fréquence (en ordonnées) et du temps (en abscisses) avant et après l'odeur ( $t=0$ ) chez des animaux anesthésiés à l'urétrane. Bas : Signaux bruts et modulation respiratoire correspondants aux cartes temps/fréquence. C. Réponse à l'odeur d'éthyl pentanoate impliquant deux types d'oscillations : gamma en fin d'inspiration (losanges gris) avec un pic de puissance autour de 60 Hz, et bêta (hachuré) avec un pic de puissance autour de 15 Hz. D. Réponse à l'odeur d'hexanal induisant uniquement un pattern de réponse dans la bande bêta autour de 15 Hz. A noter : le bêta est légèrement décalé par rapport au cycle respiratoire comparé au profil mixte. Figure adaptée de Cenier et al., 2008.

Les différences de profils en fonction de l'intensité de la stimulation olfactive pourraient s'expliquer par un modèle proposé par Neville et Haberly (2003). Il nous paraît intéressant de présenter brièvement ce modèle et de le discuter de manière très sommaire car il témoigne des difficultés rencontrées dans l'explication des réponses oscillatoires aux odeurs. Selon ce modèle hypothétique, les fortes stimulations activeraient fortement les M/TC qui enverraient les potentiels d'actions le long de leur axone mais aussi de leurs dendrites secondaires. Ces dendrites sont le siège de courants de type transitoire appelés courants IA. Ils sont dus à des canaux ioniques potassiques voltage-dépendants, qui en hyperpolarisant les dendrites secondaires atténuent l'amplitude des potentiels d'action au fur et à mesure qu'ils s'éloignent du soma des M/TC. Selon ce modèle, de fortes stimulations engendrent des dépolarisations toniques plus importantes qui inactivent les canaux potassiques responsables des courants IA (qui nécessitent une hyperpolarisation pour se réactiver après inactivation). Ceci entraînerait une propagation plus lointaine et plus durable des potentiels d'actions qui activeraient davantage de synapses M/TC/GC. Les GC sont également dotées de canaux de ce type qui sont inactivés par une forte dépolarisation et répondraient plus rapidement aux M/TC. La combinaison de ces deux mécanismes augmenterait l'efficacité de la boucle M/TC/GC, ce qui renforcerait l'oscillation gamma. Plus intéressant encore, selon ce modèle la fréquence bêta qui est observée lors de stimulations faibles s'explique par le fait que la stimulation n'induit pas de volées de potentiels d'action suffisante pour inactiver les IA : les potentiels d'action ne peuvent pas se propager suffisamment loin dans les dendrites secondaires pour induire les oscillations gamma mais arrivent via les axones aux structures corticales, qui sont impliquées dans la génération des oscillations bêta.

Ce modèle très séduisant explique les réponses dans les bandes de fréquence gamma et bêta observée par les études par Neville & Haberly (2003) et Cenier et al. (2008), mais ne peut expliquer la réponse précoce observée par Courtiol et collaborateurs (2011) dans la bande bêta autour de la transition inspiration/expiration. Ceci suggère donc une activation de la boucle M/TC/GC à une basse fréquence et pourrait expliquer l'apparition de la réponse en bêta dans une phase aussi précoce. Cela dit, cette dernière explication reste complètement hypothétique et aucune preuve n'a été fournie quant à la présence de ces fréquences de décharges préférentiellement lors de faibles stimulations. Comme nous l'évoquions plus haut, ce modèle témoigne de la complexité de l'explication de ces réponses oscillatoire et de la longueur du chemin qui reste à parcourir pour expliquer le rôle fonctionnel des oscillations dans le codage temporel des odeurs.

Fait important à noter pour comprendre la complexité et la difficulté de l'étude de la représentation temporelle des odeurs dans le BO, la reproductibilité des profils oscillatoires n'est pas stricte d'un animal à l'autre, comme nous l'avons vu pour les différents profils (Cenier et al., 2008) ou dans le fait que tous les animaux ne répondent pas forcément à toutes les stimulations (Neville & Haberly, 2003).

La stimulation odorante induit aussi des changements du profil oscillatoire chez les animaux éveillés. Les premières études se sont intéressées exclusivement aux oscillations gamma (Freeman & Schneider, 1982; Di Prisco & Freeman, 1985) la plupart du temps celles-ci diminuent pendant l'échantillonnage d'une odeur. Les oscillations bêta ont été enregistrées pour la première fois dans le BO suite à la présentation d'odeurs dotées d'une signification particulière pour les animaux, comme des odeurs de prédateurs, ou des odeurs aversives de xylène ou de toluène (Heale et al., 1994; Zibrowski & Vanderwolf, 1997). Toutefois, cet effet pourrait être dû à la volatilité des odeurs. En effet, le bêta évoqué par des stimulations passives présente une puissance variable en fonction de la pression de vapeur saturante des odeurs (Lowry & Kay, 2007) ce qui va dans le sens des résultats trouvés chez les rats anesthésiés (Cenier et al., 2008). Les oscillations bêta sont fortement amplifiées suite à des apprentissages (Ravel et al., 2003, Martin et al., 2004 ; Martin et al., 2006). Ce type de plasticité des réponses oscillatoires du LFP suite à une odeur fera l'objet du paragraphe II.3.

Le fait que la même odeur en fonction de sa concentration puisse induire différentes réponses oscillatoires (Cenier et al., 2008) montre que les oscillations ne codent pas uniquement l'identité d'une odeur. Ceci dénote la difficulté de comprendre le codage temporel d'une odeur en se basant uniquement sur le code oscillatoire. Pour une meilleure compréhension de la représentation temporelle des stimulations olfactives, il faut aussi considérer les réponses unitaires des neurones, souvent organisées en assemblées synchronisées, et surtout leur lien avec les trois types d'oscillations, et notamment la modulation respiratoire.

### **III.2. Codage temporel des odeurs par assemblées de neurones : activité unitaire et synchronisation**

Comme nous l'avons souligné précédemment, la représentation temporelle des odeurs dans le BO se fait par deux processus étroitement liés : les oscillations du LFP et l'activité neuronale unitaire. Nous avons vu dans la partie consacrée aux oscillations du LFP que celles-ci sont sous-tendues par la boucle M/TC/GC, avec plus ou moins de contrôle centrifuge en fonction des bandes de fréquence. Notre objectif n'est pas de faire ici une énumération exhaustive de toutes les études qui se sont intéressées aux différents profils de réponses des cellules du BO, mais de privilégier la description des relations qui existent entre les oscillations du LFP et ces cellules, dont les plus étudiées sont les M/TC.

Les études qui se sont intéressées aux décharges des M/TC ont rapporté qu'elles répondaient aux odeurs par des trains de potentiels d'action mais que ces réponses étaient variables. En absence d'odeur, les fréquences de décharges des M/TC se situent entre 7 et 25 potentiels d'action par seconde chez les animaux anesthésiés (Chaput & Holley, 1979), ou 3 et 20 Hz chez les animaux éveillés (Bhalla & Bower, 1997). Plus récemment, la comparaison sur les mêmes souris des états anesthésié et éveillé rapporte une fréquence de décharges plus élevée chez les animaux éveillés (~30Hz contre ~9Hz sous ketamine/xylazine) (Rinberg et al., 2006). Sous stimulation, les premières études ont rapporté des

profils de réponses simples : la présentation d'une odeur déclenche l'activation, l'inhibition ou une activité inchangée (Pager et al., 1972). Les caractéristiques temporelles des cellules sont en fait beaucoup plus complexes, et les modalités de codage des M/TC ne sont pas encore résolues.

L'une des premières hypothèses qui viennent à l'esprit lorsqu'on veut étudier un codage unitaire, et qui a été écarté dès les débuts de la recherche dans ce domaine, est qu'il y a des neurones spécifiques à certaines odeurs. Or, un même neurone est capable de répondre à plusieurs odorants et une odeur peut induire différents profils de décharges dans les neurones bulbaires (Chaput, 1986 ; Wilson et al., 2000 ; Buonviso et al., 2003 ; Aylwin et al., 2009 ; Cenier et al., 2009). Il semble actuellement évident que l'étude des variations de taux de décharges de cellules unitaires ne suffit pas pour comprendre le codage des odeurs (mais voir Bathellier et al., 2006 pour des résultats contradictoires), et qu'il est plus pertinent de considérer leur moment de décharges par rapport au cycle respiratoire (Cenier et al., 2009, pour revue Buonviso et al., 2006).

La relation la plus évidente est entre la décharge des M/TC et les oscillations les plus lentes associées au rythme respiratoire. En effet, une caractéristique de l'activité temporelle des M/TC est sa modulation par la respiration même en l'absence d'odeur (Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2008 ; Courtiol et al., 2011 ; Rinberg et al., 2006 ; Shusterman et al., 2011). Chez l'animal anesthésié, l'analyse dans les différentes couches du BO a permis de classer les neurones bulbaires en quatre catégories (figure I.11) en fonction de leur réponse aux odeurs, mais indépendamment de la nature de l'odeur (Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2009 ; Courtiol et al., 2011) :

- **Les cellules non synchronisées** : elles montrent une distribution uniforme de décharges.

- **Les cellules synchronisées simple excitatrices (S+)** : elles sont caractérisées par une augmentation de leur taux de décharge autour du point de transition inspiration/expiration.

- **Les cellules synchronisées simples suppressives (S-)** : elles sont caractérisées par une diminution de leur taux de décharges autour du point de transition inspiration/expiration.

- **Les cellules synchronisées complexes** : elles montrent des alternances d'augmentation et de diminution de leur taux de décharges au cours du cycle respiratoire.

Ces quatre profils sont plus ou moins représentés dans les différents types cellulaires du BO. Les M/TC ont des taux de décharges équivalents pour tous les profils mais plus on descend dans les couches profondes, plus les cellules ont des fréquences de décharge basses. De façon intéressante, plus on s'éloigne des couches superficielles, et donc des OSN, moins l'activité des cellules est influencée par la respiration, et les profils deviennent plus complexes. De plus, les cellules superficielles (de la couche glomérulaire) répondent au début de la phase d'inspiration, les M/TC répondent dans la transition inspiration/expiration et les GC répondent pendant la phase d'expiration

(Buonviso et al, 2003). En plus des corrélations avec le cycle respiratoire, les décharges des M/TC montrent une relation étroite avec les oscillations bêta et gamma qui varie avec la présentation des odeurs (Cenier et al, 2009), mais, par exemple, les potentiels d'actions sont calés en phase avec le gamma pour les flux d'odeur intenses, et le sont davantage au bêta pour des flux d'odeur faibles (Courtiol et al, 2011).

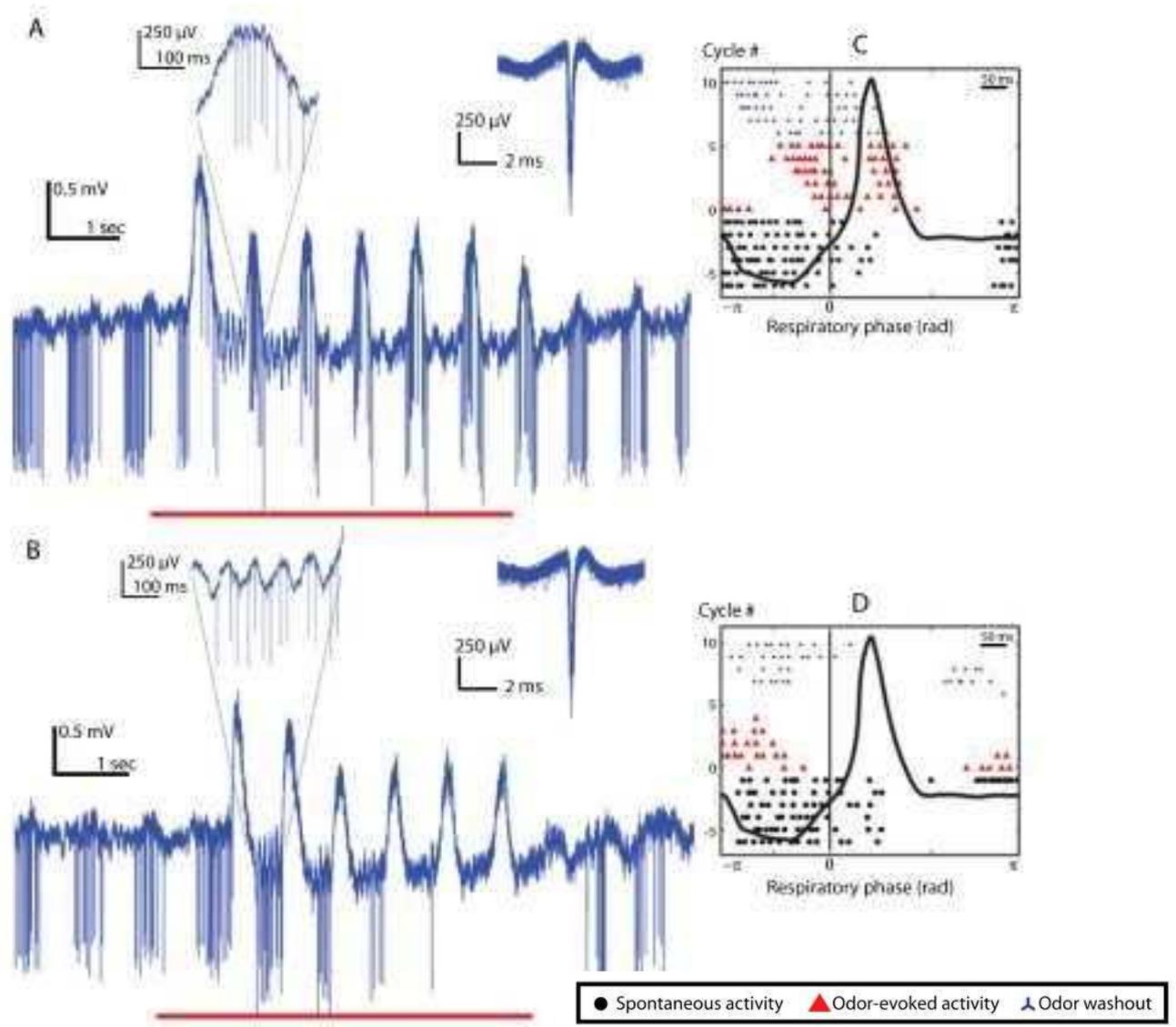
Une des premières études de la corrélation entre les oscillations du LFP, autres que la modulation respiratoire, et l'activité unitaire montre que chez le rat sous anesthésie la présentation d'une odeur est associée à une oscillation rapide (bande gamma : 38Hz) et à une augmentation de la décharge des M/TC (Kashiwadani et al., 2011). De façon intéressante, les décharges des cellules commencent avant même les réponses oscillatoires : une majorité de cellules déchargent pendant la phase descendante de l'oscillation (entre 0 et 150°), avec un pic entre 60 et 90°, et les résultats montrent qu'en se synchronisant par rapport au LFP, les cellules se synchronisent également entre elles. Ces résultats sont à rapprocher des travaux du groupe de Gilles Laurent qui montrent que, chez l'insecte, la synchronisation des neurones d'une population entre eux, et avec l'activité oscillatoire, est spécifique à l'odeur (Laurent, 1996). Cela suggère que pour accéder au codage des odeurs il est important de s'attacher au profil de décharge qu'elles induiraient dans un maximum de neurones appartenant à une même population (Lehmkuhle et al., 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, le glomérule est l'unité fonctionnelle de base du BO. Certains auteurs ont donc comparé les profils de décharge des cellules qui reçoivent la même entrée sensorielle, ou encore appelées cellules sœurs (sister cells), et ont abouti à des résultats contradictoires (Buonviso & Chaput, 1990; Dhawale et al., 2010; Egana et al., 2005). Brièvement ces cellules semblent présenter les mêmes changements de taux de décharges lorsqu'elles sont stimulées par une même odeur. En revanche, leur profil de réponse par rapport au cycle respiratoire diffère, suggérant que les informations portées par les deux caractéristiques sont complémentaires (Dhawale et al, 2010). Les différences de profil de réponses pourrait être dues aux inhibitions latérales qu'elles reçoivent des GC connectées à d'autres M/TC (elles-mêmes reliées à un autre glomérule), soulignant le fait que le signal de sortie des M/TC a déjà été modifié par un traitement local (Egana et al, 2005).

Les réponses des M/TC sont différentes chez les animaux éveillés. En plus d'un taux de décharge plus élevé (Rinberg et al, 2006), les M/TC présentent une variabilité accrue du profil de réponses (Bhalla & Bower, 1997), et semblent répondre davantage au contexte de l'expérience qu'à la nature des odeurs présentées (Kay & Laurent, 1999 ; Rinberg et al, 2006). Les résultats de Kay et Laurent (1999) montrent que seulement 11% des M/TC enregistrées ont une modification de leur taux de décharge spécifiquement en réponse à l'odeur, alors que 94% des cellules sont modulées par le contexte. L'étude de la relation avec la respiration est plus difficile puisque les animaux ont alors une fréquence de respiration variable. Toutefois, il semble que l'unité de temps la plus pertinente pour étudier le

codage des odeurs reste le cycle respiratoire (Shusterman et al, 2011), mais que la majorité de l'information de l'odeur pourrait déjà être traitée en 20 à 40 msec c'est-à-dire dans un intervalle de temps encore plus précis et plus court que le cycle respiratoire (Cury & Uchida, 2010).

En conclusion de cette partie, il semble que pour comprendre le codage temporel il faille s'intéresser à la fois aux décharges des populations synchronisées, aux oscillations du LFP et à la relation entre les deux. Ce codage, comme nous l'avons dit précédemment n'est pas figé. Il est variable en fonction des odeurs et des concentrations (Cenier et al., 2008) ainsi que de la respiration et des flux d'air entrant dans la cavité nasale (Courtiol et al., 2011). De plus, pour une même odeur, les réponses peuvent varier en fonction des conditions de l'animal, des stimulations précédentes et des processus cognitifs liés à cette odeur.



**Figure I.11. Exemples de M/TC S+ et S-.** A. En bas, signal brut obtenu d'une cellule ayant un profil S+. En haut une large vue pendant la période de stimulation (barre noire en dessous). En haut à droite, la forme des spikes. L'odeur (Amyl Acetate) induit un réarrangement des décharges en les synchronisant avec le rythme respiratoire pendant la transition inspiration/expiration. B. représentation d'une cellule ayant un profil S- (même principe que la A). On peut observer une suppression progressive des décharges par l'odeur (Ethyl valerate) qui a lieu pendant l'expiration. C. D. Représentations graphiques des décharges en relation avec le cycle respiratoire, le point 0 représentant la transition inspiration/expiration. C. Cellule à profil S+ : la stimulation odorante concentre les décharges autour du point 0. D. Cellule à profil S- : la stimulation arrête les décharges autour du point 0 et les mets à  $-\pi$  et  $\pi$ . Figure adaptée de Cenier et al., 2009.

### III.3. Plasticité du codage temporel des odeurs

Les représentations temporelles que nous venons de décrire ne sont pas figées et peuvent être modulées en fonction de l'expérience sensorielle de l'animal, c'est-à-dire suite à la répétition d'une même odeur ou à l'association entre une odeur et un renforcement.

Dès les années 1960, Walter Freeman fait l'hypothèse qu'il est possible d'observer une plasticité du BO en étudiant l'activité spatiotemporelle (Freeman, 1978; Freeman & Schneider, 1982). En plaçant une matrice d'électrodes à la surface du BO chez le lapin éveillé, il recueille l'activité du potentiel de champ en 64 points équidistants. La mesure de l'amplitude des bouffées gamma en différents points à un moment donné lui permet de réaliser des cartes spatiales d'isoamplitude qu'il compare en fonction du comportement des animaux. Les motifs ainsi formés sont relativement fixes dans le temps pour un contexte donné. En revanche, ils évoluent suite à la modification de l'environnement de l'animal (transfert dans une nouvelle cage, exploration active ou arrivée d'une odeur). Au cours de ces expériences, Freeman a pu montrer que si l'odeur était associée à un renforcement, la carte était modifiée de façon durable aussi bien en activité spontanée que pendant la présentation de l'odeur. Ainsi, l'activité gamma serait davantage liée au contexte, à l'attente du stimulus et à sa signification qu'à la nature même de l'odeur. De plus, comme le mentionne déjà les auteurs, l'arrivée de l'odeur conduit souvent à une diminution de l'amplitude des bouffées gamma (Freeman & Schneider, 1982; Kay & Freeman, 1998).

L'idée d'étudier la plasticité à travers les oscillations du BO a été reprise plus récemment en utilisant des protocoles de conditionnements opérants, qui ont mis en évidence une activité oscillatoire à la fréquence bêta qui pourrait être associée à la mémorisation des odeurs.

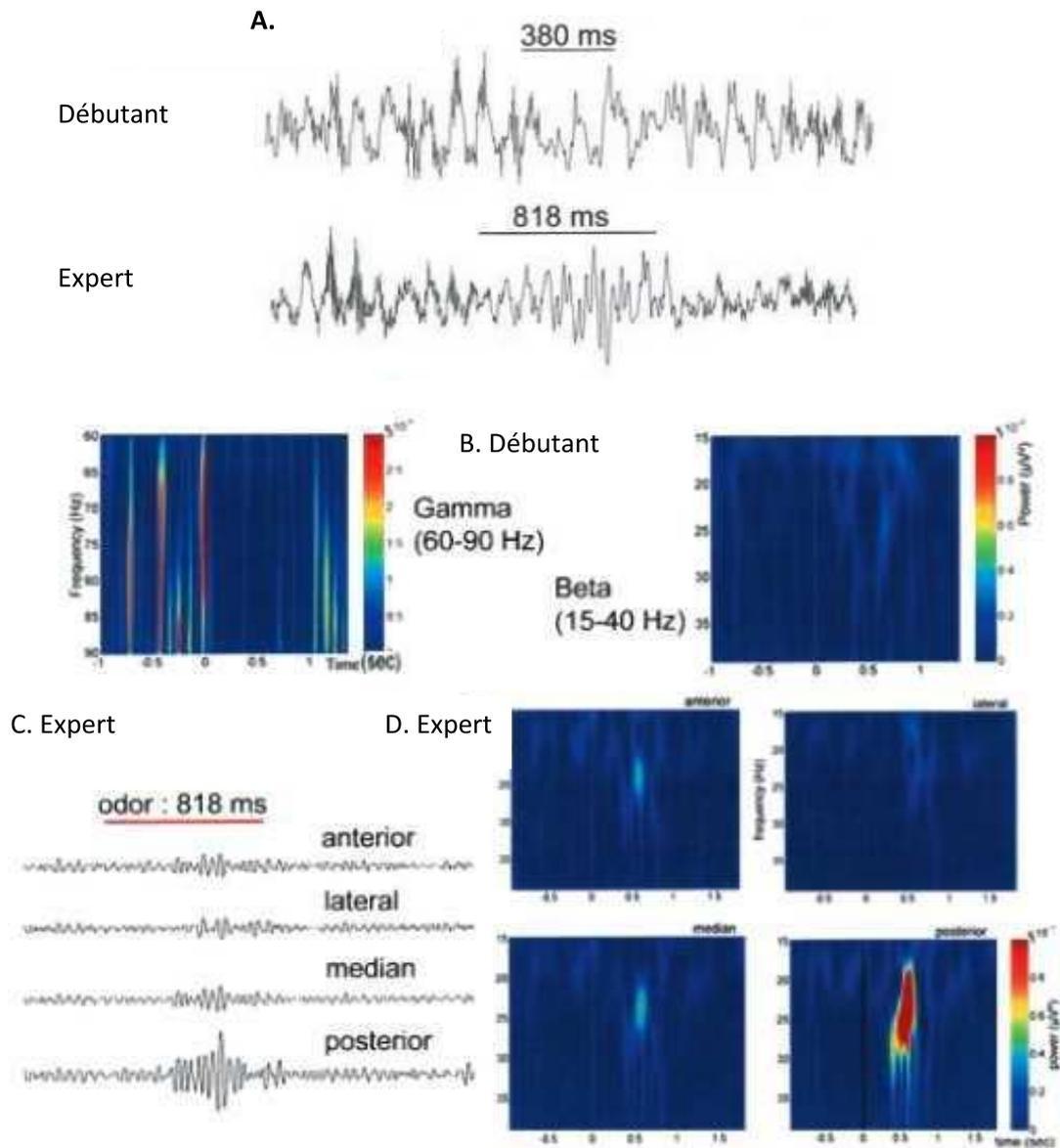
Plusieurs études ont été menées sur des rats entraînés à réaliser des tâches de Go/NoGo au cours desquelles les rats doivent discriminer deux odeurs, l'une associée à une récompense, l'autre à une punition. Lorsque les animaux n'ont pas encore associé les odeurs à leur valence, l'odeur induit essentiellement un écrasement des bouffées gamma laissant la place à une activité bêta (entre 20 et 25 Hz) de faible amplitude. Cette activité dans la bande de fréquence bêta évolue au cours de l'apprentissage pour aboutir à une oscillation de forte amplitude lorsque que l'animal a réalisé l'association (Ravel et al, 2003, Martin et al., 2004) (figure I.12). De plus les auteurs montrent une variation des caractéristiques de cette oscillation en fonction du stimulus et du site d'enregistrement. Le même motif oscillatoire a été observé par Fuentes et collaborateurs, (2008) dans une tâche de choix forcé à deux alternatives, ou les rats étaient entraînés à associer deux odeurs différentes à deux leviers différents, droit et gauche. Au contraire pour ce même test, Beshel et collaborateurs (2007) trouvent une augmentation de la puissance du gamma (environ 70Hz) chez le rat conditionné spécifiquement lorsque les odeurs à discriminer sont chimiquement proches et évoquent des cartes spatiales fortement recouvrantes au niveau du BO. Ces derniers résultats sont difficiles à interpréter en regard des autres

données, toutefois ils suggèrent que les oscillations peuvent aussi être modulées par la difficulté de la tâche à réaliser, ou le niveau d'entraînement, plus importants dans ce protocole.

Une augmentation de l'oscillation bêta a également été montrée suite à l'apprentissage d'une odeur aversive dans un protocole d'aversion olfactive conditionnée : dans ce cas, la puissance du bêta est corrélée à la force de l'aversion (Chapuis et al., 2009).

Comme le suggère un faisceau de données dans différentes aires cérébrales, les activités oscillatoires liées à la plasticité dans le BO traduisent l'activité de réseaux cérébraux. Tout d'abord les oscillations bêta sont observées dans plusieurs structures centrales en plus du BO, dont les cortex piriforme et entorhinal et l'hippocampe pendant l'apprentissage d'une discrimination olfactive (Martin et al, 2004, Martin et al, 2007b), ou l'amygdale, les cortex orbitofrontal et insulaire (Chapuis et al, 2009) dans le cadre d'une aversion olfactive. Plusieurs études montrent que le traitement d'une odeur apprise s'accompagne d'une augmentation de la cohérence entre les aires concernées aux fréquences gamma ou bêta selon la tâche, liée ou non à une augmentation de l'amplitude des oscillations (Kay et Freeman 1998 ; Martin et al, 2007b ; Kay & Beshel, 2010). Enfin, les oscillations bêta sont dépendantes de l'action des retours centrifuges sur le BO. Ainsi, le blocage partiel de ces retours par l'action pharmacologique de la lidocaïne diminue les réponses en bêta observée suite à l'apprentissage (Martin et al., 2006).

La question cruciale qui subsiste est de savoir si les oscillations ont un rôle fonctionnel, c'est-à-dire si elles sont nécessaires à l'apprentissage. Un moyen de répondre à cette question est d'étudier si les changements des propriétés oscillatoires intrinsèques suite à une action pharmacologique, ou une manipulation génétique, peuvent altérer les capacités de discrimination des odeurs. Très peu d'études ont été réalisées dans ce sens et la plus pertinente à ce jour a été effectuée chez l'insecte. Elle utilise le fait que l'injection de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA-A, abolit les oscillations sans altérer le taux de décharge des neurones dans l'analogue du BO chez l'insecte. Or la suppression des oscillations chez les abeilles ayant appris une tâche de discrimination est corrélée à une disparition de leur capacité à discriminer les odeurs proches et non les odeurs éloignées chimiquement (Stopfer et al., 1997). Chez le mammifère Nusser et collaborateurs (2001) ont utilisé des souris génétiquement mutées pour une sous unité du récepteur GABA-A se trouvant spécifiquement sur les GC, et qui présentent une augmentation du rythme gamma. Comportementalement, les animaux mutés perdent leur capacité à discriminer les mixtures d'odeurs, alors que leur capacité à discriminer des odeurs proches est augmentée. Si elles n'apportent pas de réponse définitive, ces expériences suggèrent malgré tout un impact des oscillations sur le comportement des animaux.



**Figure I.12. Réponses oscillatoires à une stimulation odorante (geraniol) chez un animal naïf et un animal expert dans une tâche go/nogo.** A. signaux bruts obtenus chez un rat débutant et un rat expert. La barre noire représente la stimulation odorante B. Cartes temps/fréquence d'un rat naïf en réponse à une stimulation odorante. A gauche, bande de fréquence gamma (60-90 Hz) avec une diminution de la puissance. A droite bêta (15-40 Hz) faible augmentation de la puissance. Axe des abscisses : temps (sec), axe des ordonnées : fréquence (Hz, croissant de bas en haut). Le code couleur représente la puissance ( $\mu V^2$ ). C. Signaux filtrés entre 15 et 40 Hz de différents sites d'enregistrement dans le BO suite à une présentation odorante. La barre rouge représente la durée de stimulation. D. Cartes temps/fréquence dans la bande bêta (15-40Hz) pour les différents sites d'enregistrement. De gauche à droite et de haut en bas : antérieur, latéral, médian et postérieur. A noter : l'augmentation de la puissance de l'oscillation bêta chez le rat expert (Martin et al., 2004).

### *Comment s'exprime la plasticité au niveau de l'activité unitaire qui sous tend les oscillations ?*

Une simple privation chronique, par obstruction d'une narine, de toute stimulation olfactive induit une augmentation des réponses olfactives (Aylwin et al., 2009). Inversement, la présentation d'une même odeur, répétée pendant 6 jours, entraîne chez le rat une habituation, c'est-à-dire une diminution à long terme de la réponse des M/TC (Buonviso & Chaput, 2000). Les M/TC montrent donc une désensibilisation à cet odorant mais aussi aux odorants de la même famille (Wilson et al., 2000), et la gamme des odorants auxquels répondent les cellules est susceptible de se modifier suite à des expositions prolongées d'odeur (Fletcher & Wilson, 2003).

L'activité unitaire est aussi modifiée par les conditionnements opérants chez des animaux éveillés. Ainsi, suite à une expérience d'exposition passive, les réponses unitaires à l'odeur au niveau des M/TC adoptent le profil de réponse qui pourrait être comparés au profil S+ chez les animaux anesthésiés. Inversement, si les rats subissent une expérience une tâche de choix forcé à deux alternatives, le profil adopté par les M/TC sera le profil S-, ce qui montre une augmentation globale d'inhibition suite à l'apprentissage (Fuentes et al., 2008). Pendant un apprentissage Go/NoGo les M/TC présentent également des modifications de leur réponse (Doucette & Restrepo, 2008; Doucette et al., 2011). En effet l'activité des cellules qui répondent aux deux odeurs qui doivent être discriminées diverge lorsque les odeurs ont acquis une valence particulière, avec une augmentation de synchronisation entre des cellules distantes pour l'odeur renforcée positivement (Doucette et al, 2011).

En conclusion de ce chapitre, nous avons exposé les bases du fonctionnement du système olfactif, en nous centrant sur le BO, notre structure d'intérêt. L'expression de récepteurs uniques dans chaque OSN et les projections glomérulaires de ces derniers posent les bases d'une représentation spatiale des odeurs. Ces cartes spatiales présentent une plasticité en fonction de la nature de l'odeur et de sa concentration, et ne sont pas figées dans le temps : l'activation des zones glomérulaires évoluent dans le temps en fonction des rythmes respiratoires. Au niveau des couches plus profondes, la représentation temporelle des stimulations odorantes est basée sur les changements des différents rythmes oscillatoires et impliquent des synchronisations d'assemblées neuronales. Ces deux activités peuvent montrer une plasticité en fonction de plusieurs facteurs comme l'apprentissage que nous avons vu dans ce chapitre mais aussi du statut nutritionnel dépendant de la prise alimentaire. Dans le chapitre II, nous allons décrire les différents mécanismes contrôlant la prise alimentaire et les différents signaux du statut nutritionnel, puis nous aborderons l'état des connaissances actuelles sur les interactions entre le système olfactif et la nutrition.

# **Chapitre II. Régulation de la prise alimentaire par les systèmes périphériques et centraux**

**I. Signaux périphériques impliqués dans la prise alimentaire**

**II. Régulation centrale de la prise alimentaire**

**III. Un nouveau régulateur de la prise alimentaire : le système des endocannabinoïdes**

**IV. Rôle des sens chimiques dans la régulation de la prise alimentaire**

Les mécanismes de régulation de la prise alimentaire, de la gestion des réserves d'énergie et du métabolisme font l'objet d'un intérêt croissant de la société, des politiques et des scientifiques dans un contexte où la suralimentation devient un problème de santé publique majeur. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, 1 milliard d'adultes sont en surpoids et 300 millions d'entre eux sont obèses dans le monde. Près de 2,6 millions de personnes décèdent des conséquences d'un surpoids chaque année dans le monde (statistiques du site web de l'OMS de février 2011). De plus, 80% des personnes ayant développé une obésité sont atteints de maladies relatives à cette obésité comme le diabète, l'hyperlipidémie, l'hypertension ou les problèmes cardiovasculaires (Simpson et al., 2009). Les origines de ces troubles sont nombreuses et impliquent la sédentarité, la prédisposition génétique et au premier plan le dérèglement des comportements et de la prise alimentaires.

Nous allons exposer dans ce chapitre les mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Les organismes vivants (quels que soient leurs tailles, le nombre des cellules les constituant ou le règne auquel ils appartiennent) nécessitent de l'énergie pour assurer leurs fonctions vitales. Contrairement aux végétaux, les animaux n'ont pas la capacité de produire leur source d'énergie par eux-mêmes et la puisent dans leur alimentation (pour revue Louis-Sylvestre, 1991). Cet approvisionnement en énergie doit être continu pour les différentes structures qui assurent les fonctions vitales comme le cerveau, le cœur ou les muscles respiratoires. Il existe une balance énergétique entre les entrées d'énergie apportées par l'alimentation et les dépenses énergétiques dues aux fonctions vitales et à l'activité physique. Une dérégulation de cette balance peut avoir des conséquences pathologiques : une baisse énergétique entraîne une incapacité pour les cellules et organes à assurer leurs fonctions (exemple classique de l'évanouissement en cas de déficit énergétique type hypoglycémie), et les excès énergétiques sont à l'origine de maladies métaboliques avec des risques sur les fonctions cardiovasculaires comme dans l'obésité (Simpson et al., 2009). Or, l'approvisionnement de l'organisme en énergie est discontinu et assuré par des prises ponctuelles qui, selon les espèces et l'état interne de l'individu, varient dans la quantité de nourriture ingérée et dans les moments de la journée où elles ont lieu (Macht, 1999; Le Magnen, 2001) : par exemple, chez certaines espèces qui hibernent comme la marmotte, le comportement alimentaire change en fonction de la saison, en terme de quantité, de qualité et de gestion des stocks (Florant et al., 2010). Une fluctuation majeure de la balance énergétique corporelle est due au temps qui sépare les prises alimentaires où la faim s'installe : pour déclencher la prise alimentaire, il est donc nécessaire pour le cerveau de connaître précisément l'état de remplissage des réservoirs gastro-intestinaux en périphérie et l'état d'utilisation des substrats énergétiques circulants et stockés (réserves à court terme de glycogène hépatique et musculaire, réserves à long terme de triglycérides dans le tissu adipeux). En effet, l'initiation ou l'arrêt de la prise alimentaire dépend d'une balance entre les actions signaux

(centraux et périphériques) orexigènes favorisant la prise alimentaire et signaux anorexigènes la diminuant, ce qui permet de contrôler le temps des repas.

Dans ce chapitre, nous décrirons les mécanismes de régulation de la prise alimentaire en partant des signaux périphériques et en remontant vers leur intégration par le système nerveux central. Nous ferons un point sur le rétrocontrôle périphérique des nutriments, peptides et hormones (dont la leptine que nous avons étudiée au cours de cette thèse) sur le cerveau qui se trouve constamment informé sur l'état des dépenses et des réserves énergétiques (partie I). Nous verrons ensuite les principaux systèmes centraux en détaillant le rôle de l'hypothalamus (partie II). Un nouvel acteur de signalisation et de régulation, le système des endocannabinoides (ECB), que nous avons étudié au cours de cette thèse, fera l'objet de la partie III. Nous concluons ce chapitre en insistant sur l'implication des sens chimiques, notamment de l'olfaction, dans la prise alimentaire (partie IV).

## **I. Signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire**

### **I.1. Les nutriments**

#### **I.1.1. Production des nutriments par digestion des aliments**

La digestion est un ensemble de mécanismes physiologiques des plus anciennement étudiés en biologie (Claude Bernard, Leçons sur les phénomènes de la vie commune aux animaux et aux végétaux, 1878-1879 ; plus récemment, Gerard Tortora, Nicholas Anagnostakos, Sandra Reynolds Grabowski. Principle of anatomy and physiology. Wiley, 2000, 9<sup>ème</sup> édition chapitre 24 p.818 et chapitre 25 p.871). Nous en ferons ici une description sommaire. Les aliments que nous consommons sont généralement composés de matières organiques animales ou végétales contenant des macromolécules énergétiques (glucides, lipides et protéines) qui sont dégradées par des enzymes au cours de la digestion : ces lyses successives libèrent des nutriments (petites molécules comme le glucose ou les acides aminés) qui sont seuls capables de traverser la membrane des cellules. Les aliments contiennent également à plus faibles doses des vitamines et des oligoéléments minéraux nécessaires au fonctionnement cellulaire, aux équilibres électrochimiques des différents milieux (cellulaire, interstitiel et extracellulaire) et à la signalisation cellulaire.

La décomposition des aliments commence dès les premières étapes de la prise alimentaire avec la mastication : le broyage mécanique à l'aide des dents permet de déchiqeter les aliments en petites fractions pour permettre un meilleur accès des enzymes digestifs. Une fois dans le tube digestif (estomac/intestin grêle), les sucres sont digérés et décomposés en glucides simples, les protéines en peptides puis acides aminés (AA) et les graisses en acides gras (AG). Les AA et glucides passent la muqueuse duodénale pour arriver dans la circulation. Les AG subissent une solubilisation micellaire par les acides biliaires qui en font des émulsions pouvant passer dans la circulation. Une fois dans la circulation, la source principale d'énergie, notamment pour le cerveau, est représentée par les

glucides : c'est principalement le glucose qui est une source d'énergie immédiate et qui sert également de molécule de signalisation sur l'état de la balance énergétique (voir partie I.1.2 plus bas). Les AG sont les molécules les plus riches en énergie qui servent également de signal de l'état de la balance énergétique (voir partie I.1.2. plus bas) mais ne constituent pas la principale source énergétique car toutes les cellules ne sont pas capables de les assimiler comme source d'énergie, l'exemple le plus frappant étant celui des neurones. Ils sont transportés sous forme de lipoprotéines, souvent stockés dans le tissu adipeux, et constituent la majeure partie de l'adipocyte. En cas d'excès de glucides, la totalité des sucres n'est pas utilisée, le stockage est favorisé grâce à l'action de l'insuline (voir description de cette hormone dans la partie I.3.1 plus bas) notamment dans le muscle et le foie (sous forme de glycogène, un polymère de glucose) par la glycogénogenèse et le tissu adipeux (sous forme de lipides) par la lipogenèse.

### **I.1.2. Glucose et acides gras circulants comme signaux détectés par le cerveau**

Le glucose est le substrat énergétique principal chez les mammifères, notamment pour le cerveau. Ses taux circulants sont un fort indicateur du statut nutritionnel. Dès les années 1960, un effet du glucose sur les neurones hypothalamiques qui régulent la prise alimentaire (voir partie II.1.1) ont été décrits (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969) basé sur les idées originelles de Mayer (1953) de la théorie glucostatique de la régulation de la prise alimentaire (revue dans Mayer, 1996). C'est en fait une signalisation complexe notamment avec une régulation des courants potassiques que le glucose induit au niveau hypothalamique détaillés dans la revue de Levin, (Levin, 2001). Les AG, quant à eux, sont issus de l'alimentation ou de la dégradation des réserves lipidiques, et traversent la barrière hémocéphalique et constituent un signal du statut nutritionnel puisqu'ils sont capables de modifier les taux de décharges des potentiels d'action des neurones hypothalamiques (Wang et al., 2006). L'infusion intracérébroventriculaire d'AG (Obici et al., 2002) ou le blocage de leur oxydation (Obici et al., 2003) au niveau de l'hypothalamus réduit la prise alimentaire : ceci laisse penser que ce sont les métabolites des AG qui affectent la prise alimentaire probablement par l'intermédiaire de l'acétylCoA (Migrenne et al., 2007). De manière très intéressante, les neurones sensibles au glucose ne le sont pas pour les AG et inversement, ce qui laisserait supposer qu'une partie des neurones hypothalamiques serait dédiée spécifiquement à la détection des AG et d'autres à celle du glucose (Migrenne et al., 2007).

### **I.2. Les peptides du tube digestif**

Ces peptides, et leurs actions sur la prise alimentaire sont décrits, en détails dans deux excellentes revues publiées par Suzuki et al., (2010) et Woods & D'Alessio (2008). Nous tracerons ici les grandes lignes les concernant.

### **I.2.1 La Cholecystokinine CCK**

Ce peptide sécrété par l'intestin suite à la prise alimentaire passe dans le sang et atteint le système nerveux. Ses récepteurs CCK R1 et R2 sont présents largement au niveau de l'hypothalamus. Une de ses actions principales est sur le nerf vague qui exprime la forme 2 du récepteur : elle induit ainsi la suppression de la prise alimentaire.

### **I.2.2 Le Peptide tyrosine tyrosine PYY**

Deux formes circulantes de ce peptide existent, le PYY 1-36 et le PYY 3-36. Ses nombreux récepteurs sont largement exprimés, notamment la forme Y2R, dans l'hypothalamus. Ses taux circulants augmentent suite à un repas et restent élevés quelques heures après, puis baissent au fur et à mesure qu'on s'éloigne du repas. De façon intéressante, ses taux sont plus élevés après une consommation d'un repas riche en AG qu'après un repas riche en sucres (ou protéines) de valeur énergétique équivalente. Ce peptide peut agir en arrêtant la prise alimentaire sur l'hypothalamus (car sa séquence protéique est très proche du Neuropeptide Y, partie II.1.2.1 plus bas) ou par le nerf vague. Une injection directe dans le noyau arqué de l'hypothalamus (voir partie II.1.1.1. plus bas) induit l'arrêt de la prise alimentaire de même que l'injection périphérique. L'effet anorexigène disparaît en cas d'injection périphérique suite à une vagotomie bilatérale.

### **I.2.3 Le Glucagon like peptide**

Il en existe deux formes, GLP1 et 2, la forme la plus influente sur la prise alimentaire étant la GLP1. Majoritairement produits dans le cerveau ou l'intestin, GLP1 est co-sécrétée avec le PYY par les cellules intestinales. Ses récepteurs sont largement présents dans le cerveau et ses taux augmentent après un repas et baissent lorsqu'on s'en éloigne. Ses taux augmenteraient également dans la période d'anticipation du repas.

## **I.3. Les hormones**

### **I.3.1. La ghréline**

Seule hormone orexigène connue, elle est sécrétée par l'estomac, l'intestin grêle et le colon (Pour revue Suzuki et al., 2010 ; Zac-Varghese, 2011). Ses récepteurs GHS-R sont exprimés notamment dans le noyau arqué de l'hypothalamus : l'administration de ghréline augmente l'activité c-fos dans les neurones NPY/AgRP du noyau arqué (Wang et al., 2002) et leur destruction supprime l'effet orexigène de la ghréline (Chen et al., 2004), indiquant que la voie de signalisation NPY/AgRP est la plus importante pour l'action centrale cette hormone. La ghréline diminue après un repas et ses taux augmentent au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, avec un pic dans la période qui anticipe les repas. De plus, Lorsque la ghréline est injectée centralement, elle a une action sur le nerf vague, le Noyau du Tractus Solitaire et les autres noyaux hypothalamiques (pour revue Suzuki et al., 2010).

### **I.3.2. L'insuline**

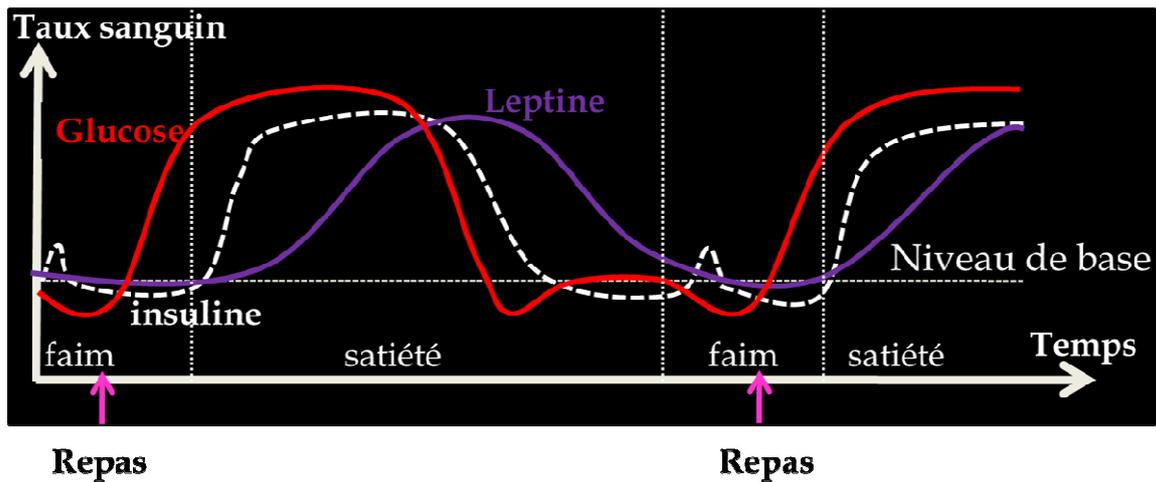
C'est un peptide dont l'implication dans la prise alimentaire est connue depuis les années 1950 ( Le Magnen, 1956, 1999a, 1999b, 2001; Le Magnen & Julien, 1999a, 1999b). Depuis, un nombre impressionnant de résultats et d'implications dans différents systèmes centraux et périphériques ont été publiés (pour revue Gerozissis, 2008). L'insuline est sécrétée par les cellules bêta pancréatiques et participe au contrôle à long terme de la prise alimentaire ; de manière très intéressante, elle est également exprimée au niveau de la MO (Lacroix et al., 2008). Elle traverse la barrière hémocéphalique de manière saturable (Suzuki et al., 2010) suggérant qu'elle le fait par la voie de transporteurs. Ce peptide a deux types de récepteurs aux affinités différentes, IR.A dans le système nerveux et IR.B dans les organes périphériques (Whittaker et al., 2002), ces 2 formes étant exprimées dans le système olfactif (Lacroix et al., 2008). Cette hormone est produite par les cellules bêta pancréatique est stockées dans des vésicules. Elle est libérée suite à l'augmentation des taux de glucose sanguins (Le Magnen & Julien, 1999a; Suzuki et al., 2010). Des réactions complexes mais fonctionnels dès les premiers instants de la vie permettent de dépolariser les cellules bêta en présence d'un fort taux d'ATP lié à un fort taux de glucose via des canaux potassiques sensibles à l'ATP : cette dépolarisation cause la libération de l'insuline dans le sang (Szollosi et al., 2007 pour revue Drews et al., 2010). L'insuline ainsi libérée agit, en périphérie, principalement sur le foie et les muscles en favorisant le stockage du glucose sous forme de glycogène, et sur le tissu adipeux en stimulant la lipogenèse. Ses taux varient de manière très intéressante en fonction des repas. Un pic préprandial juste avant les repas est rapporté par certaines études (Powley & Berthoud, 1985 ; Le Magnen, 2001) et servirait de signal orexigène : l'administration d'insuline chez des rats à jeun augmente leur sensation de faim et leur consommation alimentaire (Le Magnen & Julien, 1999a ; Powley & Berthoud, 1985). A plus long terme après la prise alimentaire, lors du pic post-prandial, elle exercerait un effet anorexigène semblable à l'action de la leptine (Woods et D'Allessio, 2008). Il a été montré que l'insuline abaisse la réponse des neurones olfactifs à un signal odorant (Lacroix et al., 2008 ; Savigner et al., 2009). Les variations de l'insulinémie dépendent de celles de la glycémie et modulent la leptinémie : l'évolution de ces trois paramètres par rapport aux repas est présentée schématiquement à la figure II.1.

### **I.3.3. La leptine**

La leptine est une protéine de 16 kDa codée par le gène ob (Zhang et al., 1994) et synthétisée principalement par l'adipocyte (Ahima & Osei, 2004 ; Banks, 2004). D'autres lieux de synthèse existent dans l'organisme comme l'épithélium gastrique, le muscle squelettique strié et le placenta (Ahima & Osei., 2004) mais aussi, et de façon très intéressante, la MO (Baly et al., 2007). Ce peptide anorexigène peut franchir la barrière hémocéphalique et agir sur les structures centrales (Ahima & Osei, 2004; Banks, 2004; Schwartz et al., 2000) qui expriment deux isoformes majeures du récepteur à la leptine : (i) la forme courte ObRa qui est dépourvue d'une partie de la région intracytoplasmique et

induit partiellement certaines voies de signalisation. Elle semble également impliquée dans le transport de la leptine à travers la barrière hémocéphalique. (ii) la forme longue à plus large spectre d'activation des voies de signalisation, notée ObRb. La liaison ObRb-leptine active principalement la voie de signalisation JAK/STAT. D'autres voies peuvent être aussi activées ou régulées par la leptine, par exemple la voie de l'insuline IRS-1 (Insuline Receptor substrate 1), la voie des MAP kinases, AMP-kinase et IP3-kinase (Ahima & Osei, 2004). Toutes ces voies mènent à terme à des modifications de transcription génique, responsables notamment de la baisse de l'expression du NPY dans l'hypothalamus (Zac-Varghes et al., 2010). Différentes études montrent que certaines actions de la leptine, comme la modulation de l'excitabilité des neurones, sont trop rapides pour être attribuées à des activations de gènes (Ahima et Osei, 2004). En effet, dans l'hypothalamus, la leptine hyperpolarise les neurones de l'aire hypothalamique latérale (Shiraishi et al., 1999) en activant des canaux potassiques  $K_{ATP}$  ATP-dépendants (Spanswick et al., 1997). Cette activation des canaux  $K_{ATP}$  a été révélée aussi dans d'autres types cellulaires en culture, comme la lignée de cellules CRI-G1 sécrétrices d'insuline (Harvey et al., 2000; Harvey et al., 1997). La leptine est aussi capable de dépolariser les neurones du noyau hypothalamique ventromédian (Shiraishi et al., 1999) ainsi que les cellules du noyau paraventriculaire (Powis et al., 1998) et induire ainsi une action anorexigène puissante à court terme.

De manière très intéressante pour notre étude, la leptine peut modifier l'activité des OSN de la MO (Savigner et al., 2009) et l'expression de ses récepteurs est modulée par le statut nutritionnel dans la MO après une mise à jeun de 48 heures (Baly et al., 2007). De plus, cette hormone injectée chez un animal affamé réduit le temps d'exploration d'une odeur, notamment alimentaire, et diminue l'activité des neurones du bulbe (révélée par un marquage c-fos, Prud'homme et al., 2009). La leptine interagit également avec les structures cérébrales liées à la récompense et au renforcement (Fulton et al., 2006). Nous avons donc choisi pour notre part d'étudier ses effets sur la représentation temporelle des odeurs dans le BO (voir résultats, chapitre V partie I.4.2).



**Figure II.1. Représentation schématique illustrant les variations de glucose, d'insuline et de leptine en fonction des repas.** Nous présentons cette figure à titre indicatif car elle ne tient pas compte des variations nictémérales des hormones et ne représente pas des valeurs réelles.

## II. Régulation centrale de la prise alimentaire

Le cerveau joue un rôle très important dans la gestion des réserves énergétiques et la régulation de la balance énergétique corporelle. Il est lui-même un grand centre de consommation énergétique puisqu'il ne représente environ que 2% du poids corporel mais consomme au moins 20% de l'énergie disponible. Le principal nutriment utilisé par le cerveau est le glucose : 100g de glucose sont consommés par le cerveau par jour (Fehm et al., 2006). Notre propos sera ici de comprendre comment cet organe gourmand en énergie (chapitre 1 partie II.1.1.1.) s'occupe de la gestion des stocks énergétiques.

### II.1. Structures cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire

Le cerveau, est l'organe qui est capable d'intégrer les informations du milieu interne et de l'environnement externe à l'organisme et de réguler le comportement alimentaire. Ceci nécessite que les structures responsables de la détection du statut nutritionnel soient en relation avec les structures de prise de décision et les structures motrices qui permettent de mettre en œuvre la consommation d'aliments (pour revue Fehm et al., 2006 ; Suzuki et al., 2010). Comme ces liens demeurent flous, nous ferons ici un point sur les connaissances concernant les principales structures intervenant dans la prise alimentaire comme l'hypothalamus et le reste du système limbique et détaillerons les rôles du système des endocannabinoïdes dans la prise alimentaire.

#### II.1.1. Les noyaux hypothalamiques

De toutes les structures pouvant contrôler la prise alimentaire, l'hypothalamus est la plus explorée historiquement et certainement l'une des plus influentes. La première évidence de l'implication de

l'hypothalamus date de la fin des années 1930. Ainsi la destruction du noyau ventro-médian de l'hypothalamus, les travaux de Hetherington et Ranson (1939) sont évoqués dans de nombreuses revues (Ahima & Osei, 2004 ; Zac-Varghes et al., 2010) induit une obésité. En 1951, Anand et Brobeck montrent que la destruction de certaines régions de l'hypothalamus induit des troubles de la prise alimentaire (Anand & Brobeck, 1951). Depuis, nous savons que l'hypothalamus agit comme une interface entre les structures centrales et les signaux périphériques. Ce contact avec la périphérie est facilité par la présence d'une barrière hémocéphalique relativement permissive (Zac-Varghes et al., 2010) et des noyaux cellulaires exprimant des récepteurs aux signaux périphériques majeurs que nous avons décrit précédemment comme l'insuline, la leptine et la ghréline.

Globalement, le noyau arqué détecte les changements de signaux périphériques et, grâce à un transfert d'information vers le noyau paraventriculaire, joue un rôle de première importance dans le passage de la détection à la réponse motrice de la prise alimentaire. ARC et PVN sont deux structures reliées à des sites hypothalamiques effecteurs tels que l'aire hypothalamique latérale connue comme étant le centre de faim et le noyau ventromédian connu comme étant le centre de satiété. L'ensemble de ces noyaux sont décrits dans le texte qui suit et sont représentés dans le schéma de la figure II.2.

#### ***II.1.1.1 Noyau arqué (ARC)***

C'est le noyau qui fait la liaison entre le système nerveux central et les autres structures corporelles, car il présente des récepteurs aux signaux périphériques et projette sur d'autres parties de l'hypothalamus qui sont importantes dans la régulation de la prise alimentaire. Sa lésion totale induit une hyperphagie (Simpson et al., 2009). Il est constitué de deux populations de neurones qui ont des rôles antagonistes (pour revue Shwartz, 2000 ; Simpson et al., 2009 ; Zac-Varghes et al., 2010) : i) une population qui produit des neuropeptides orexigènes comme le NPY et l'Agouti Related Peptide-Neuropeptide Y (AgRP-NPY) qui sont co-exprimés dans ces neurones avec le GABA et fortement inhibés par la leptine ou l'insuline (Chee & Colmers, 2008) ii) l'autre population contient des neurones qui produisent des neuropeptides anorexigènes dont les dérivés Pro-opiomélanocortine (POMC) du système des mélanocortines comme l'alpha MSH ou le cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART). Ces deux parties de l'ARC projettent sur plusieurs noyaux de l'hypothalamus. Nous n'allons aborder ici que les projections majeures impliquées dans la prise alimentaire.

#### ***II.1.1.2. Noyau paraventriculaire (PVN)***

Il se situe comme son nom l'indique sur les bords du troisième ventricule. Parmi ses nombreuses fonctions physiologiques, il participe au contrôle de la balance énergétique et à la thermogénèse notamment par le contrôle de la fonction thyroïdienne qui module à la fois la dépense énergétique et la prise alimentaire avec la synthèse d'hormone thyroïdienne (TRH), de Corticotropin-releasing hormone (CRH) et d'ocytocine (Simpson et al., 2009). C'est une voie de sortie de l'hypothalamus, il constitue un centre d'interaction avec le tronc cérébral et le système nerveux autonome, plus particulièrement le

NTS. Il possède également des liaisons intra-hypothalamiques car il communique étroitement avec l'ARC (Zac-Varghes et al., 2010).

#### ***II.1.1.3. Noyau dorsomédian (DMN)***

Il reçoit de très nombreuses projections POMC et NPY de l'ARC et sa destruction induit une hyperphagie et l'obésité (Simpson et al., 2009).

#### ***II.1.1.4. Noyau hypothalamique latéral et antérieur (LHA)***

Cette structure est composée de neurones exprimant deux neuropeptides orexigènes, la MCH (Melanin Concentrating Hormone) et les orexines. Il est aussi appelé le centre de l'appétit puisque sa stimulation entraîne une hyperphagie tandis que sa lésion évoque une aphagie. Le LHA reçoit les projections NPY/AgRP et  $\alpha$ -MSH de l'ARC (Simpson et al., 2009). Les neurones du LHA produisant des orexines et du MCH sont sensibles au glucose : la libération des orexines est inhibée par le glucose (Burdakov et al., 2006) qui inhibe l'activité des cellules de l'hypothalamus latéral produisant ainsi une diminution de la prise alimentaire (Fehm et al., 2006).

#### ***II.1.1.5. Noyau ventro-médian (VMN).***

C'est un noyau exprimant le BDNF (qui possède des propriétés anorexigènes) et qui reçoit des projections POMC et NPY/AgRP de l'ARC. Sa lésion cause une hyperphagie, sa stimulation une hypophagie.

### **II.1.2. Les neuropeptides hypothalamiques**

#### ***II.1.2.1 Les neuropeptides de l'ARC***

***Neuro Peptide Y et Agouti Related Peptide (NPY/AgRP).*** Le NPY est un puissant stimulant de la prise alimentaire. Les projections NPY sont distribuées très largement dans l'hypothalamus et innervent le VMN, DMN, PVN et LHA, mais également les neurones POMC de l'ARC (Chee & Colmers, 2008). Ses récepteurs sont notés de Y1 à 5 (Simpson et al., 2009) mais seulement le 1, 2 et 4 sont impliqués dans la prise alimentaire (Chee & Colmers, 2008). Son action orexigène puissante serait due à la stimulation des neurones MCH et orexinergiques, mais aussi à l'hyperpolarisation des neurones POMC adjacents qui sont anorexigènes (Chee & Colmers, 2008).

De manière très intéressante, les animaux, chez qui la suppression de l'expression du NPY a été effectuée par injection de la toxine diphtérique humaine, ne présentent pas le même profil de prise alimentaire suivant leur âge (Zac-Varghes et al., 2011) : l'absence de NPY induit une suppression de la prise alimentaire chez des animaux adultes alors qu'elle n'a pas d'impact sur la prise alimentaire des jeunes animaux (Luquet et al., 2005) suggérant des mécanismes de compensation à l'absence de NPY pendant le développement qui deviendraient impossibles à exprimer à l'âge adulte.

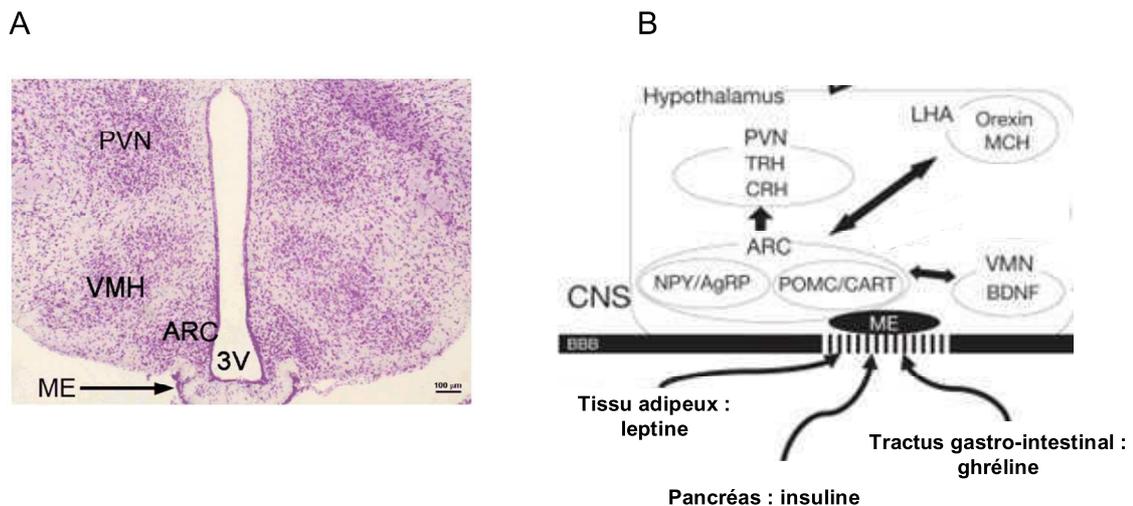
***Pro-OpiomelanoCortine et cocaine- and amphetamine regulated transcript (POMC/CART).*** Les dérivés POMC sont produits par les noyaux hypothalamiques orexigéniques de l'ARC. Ces neurones produisent la mélanocortine qui a pour récepteurs MC-Rs dont le plus important est le MC4-R exprimé dans le PVN. La mélanocortine (notamment l' $\alpha$ -MSH) est libérée et induit la suppression de la prise alimentaire via le récepteur MC4-R.

#### ***II.1.2.2 Neuropeptides du LHA***

***MCH/ Orexines.*** Les orexines et MCH sont exprimés par les neurones du LHA. L'injection centrale de MCH (Chung et al., 2011; Kishi & Elmquist, 2005; Simpson et al., 2009) et d'orexine (Date et al., 1999; Kishi & Elmquist, 2005; Simpson et al., 2009) augmentent la prise alimentaire. La MCH possède des récepteurs MCHR1 et 2, seulement le premier est exprimé chez le rat (Simpson et al., 2009). Les récepteurs MCHR1 sont exprimés dans le cortex, l'amygdale, l'hippocampe et le noyau accumbens (Chung et al., 2011). L'administration d'antagonistes des MCHR1 chez la souris diminuent fortement la prise alimentaire (Chung et al., 2011) et les taux de MCH augmente notamment avec la baisse des taux circulants de leptine.

Il existe deux types d'orexine, A et B (appelées également hypocrétines) qui activent leur récepteur OX1R et OX2R distribués largement dans le système nerveux central notamment dans le cortex et l'amygdale (Kishi & Elmquist, 2005) mais également dans le BO (Hardy et al., 2005; Prud'Homme et al., 2009).

***Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).*** C'est un facteur neurotrophique régulé par les peptides du statut nutritionnel, notamment la leptine et la mélanocortine. Son rôle dans la prise alimentaire est inhibiteur : toute diminution d'expression ou de signalisation est accompagnée d'une augmentation de la prise alimentaire. (Zac-Varghes et al., 2010). Son administration dans le ventricule latéral induit une baisse de la prise alimentaire et du poids corporel (Simpson et al., 2009).



**Figure II.2. Interactions entre les différents noyaux et les différents systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus.** A. coupe histologique de l'hypothalamus. PVN : noyau paraventriculaire, VMH : hypothalamus ventromédian, ARC : noyau arqué, ME : éminence médiane, 3V : 3ème ventricule. B. Représentation schématique des noyaux hypothalamiques exprimant des récepteurs aux signaux périphériques (leptine, insuline, ghréline) et des neuropeptides qu'ils expriment. L'ARC est constitué de deux populations de neurones (NPY/AgRP et POMC/CART), il projette sur le PVN dont les neurones synthétisent la TRH et la CRH, sur le LHA dont les neurones synthétisent de la MCH et des orexines et sur le VMN dont les neurones synthétisent du BDNF. A. Figure adaptée de Majdic (2009). B. Adaptée de Suzuki et al. (2006). Toutes les abréviations des neuropeptides sont explicitées dans le texte précédant cette figure.

### II.1.3. Autres structures du système limbique et le noyau du tractus solitaire

Les structures centrales reliées aux systèmes sensoriels participent également à la régulation de la prise alimentaire : le thalamus (pour la vision et le goût), le BO, les cortex sensoriels, et leurs liaisons avec les structures limbiques sont encore en cours d'étude (Le Magnen, 2001 ; Rolls et al., 2005). Le système limbique en tant que tel, par sa fonction de plaisir et de récompense liée à la nourriture module la prise alimentaire, notamment en agissant sur la motivation (Rasmussen & Huskinson, 2008; Solinas & Goldberg, 2005; pour revue Bermudez-Silva et al., 2010). Le système dopaminergique lié fortement à la palatabilité et aux notions de plaisir participe au contrôle de la prise alimentaire. De manière très intéressante, il est interconnecté au système olfactif et au système des ECB (Bisogno et al., 1999; Gardner & Vorel, 1998) auxquels nous consacrerons une partie détaillée dans ce chapitre (voir la partie III). Les systèmes sensoriels semblent avoir un rôle important dans la prise alimentaire, ne serait-ce que par leur implication dans la valeur qualitative des aliments, leur goût, leur odeur mais aussi la valeur hédonique qu'ils peuvent avoir et qu'on peut définir par le terme de palatabilité (Le Magnen, 2001, voir partie IV de ce chapitre), palatabilité également modulée par le système des ECB.

Enfin, une des premières structures qui contrôlent la prise alimentaire à court terme se trouve dans le tronc cérébral. Le Noyau du Tractus Solitaire (NTS) du tronc cérébral reçoit les signaux du nerf vague qui innerve le tube digestif et détecte l'état de remplissage du tractus digestif. Cette structure reçoit

donc l'information relative au remplissage du tube digestif et participe à l'enclenchement et à l'arrêt de la prise alimentaire. Il reçoit les afférences gustatives, les afférences du nerf vague (Morton et al., 2006). L'activité de ses neurones est influencée par certains peptides du tractus gastro-intestinal (CCK et PYY) mais aussi par la leptine et le NPY (Suzuki et al., 2010). Il contacte les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Zac-Varghes et al., 2010).

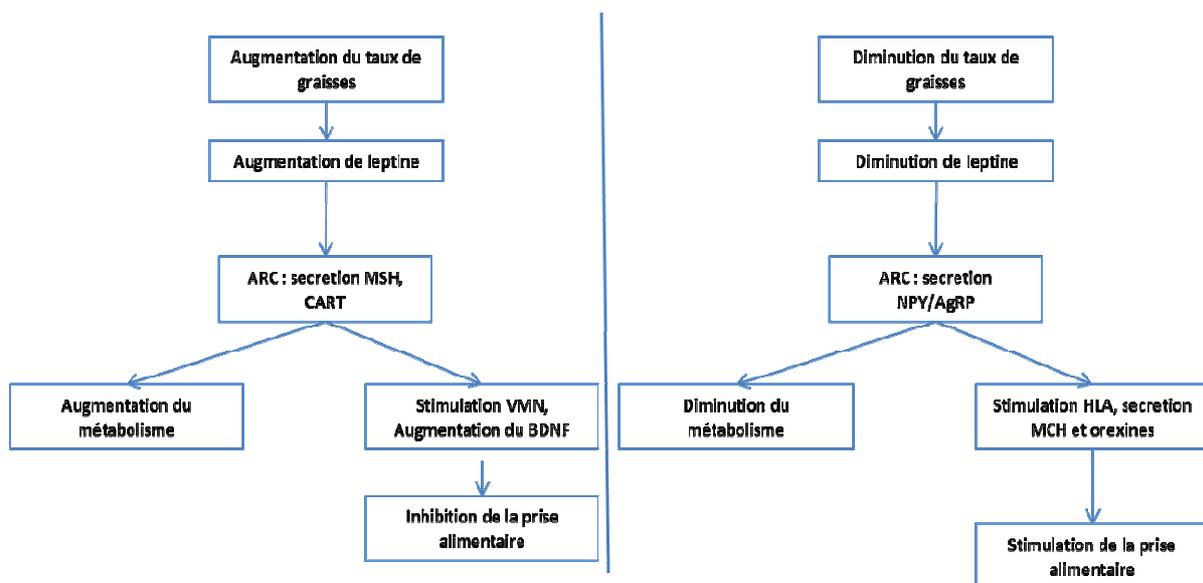
## **II.2. Fonctionnement intégré de la signalisation périphérique et de la signalisation centrale dans la régulation de la prise alimentaire**

Comme nous l'avons dit dans les parties I. et II.1, le nombre de messagers chimiques d'origine périphérique et centrale entrant dans la régulation de la prise alimentaire sont très nombreux, et leurs actions très complexes. Plusieurs vues fonctionnelles de leurs interactions au niveau cérébral peuvent être proposées. Nous avons choisi de présenter ici le décours temporel de ces signaux à court terme autour d'un repas (action de l'ordre de quelques minutes à quelques heures pour les nutriments et les neuropeptides gastriques sur l'hypothalamus) suivie de l'action à plus long terme des hormones anorexigènes (leptine et insuline) (figure II.4).

Nous partons ici d'une situation qui est celle du jeûne vers celle de la satiété en prenant pour exemple, une fois n'est pas coutume, l'être humain sous-alimentation normale comme modèle pour l'ensemble des mammifères (Macht, 1999). Loin des repas dans le temps, la quantité de glucose circulant diminue et la sensation de faim augmente chez l'Humain. La phase précédant la prise alimentaire qui est dénommée la phase préprandiale (céphalique) se caractérise par une augmentation de la salivation (travaux de Pavlov entre 1890-1900) accompagnée d'une sécrétion de suc digestifs (Powley et Berthoud, 1985), de peptides gastro-intestinaux, et de la seule hormone orexigène, la ghréline (Tschöp et al., 2000) qui agit directement sur l'hypothalamus en augmentant la libération d'AgRP et NPY qui stimule le centre de la faim par régulation des quantités de mélanocortine. De plus, un pic préprandial d'insuline lié à l'anticipation sensorielle du repas apparaît (Le Magnen, 2001) et servirait de signal orexigène en induisant une plus forte baisse de glycémie renforçant ce signal de faim. Enfin, avant le repas, le niveau faible de remplissage de l'estomac et la baisse des quantités de substrats énergétiques (notamment le glucose) et des hormones satiétogènes lèvent l'inhibition exercée par ces dernières sur les neurones AgRP/NPY et diminuent la stimulation des neurones POMC/CART dans l'ARC de l'hypothalamus.

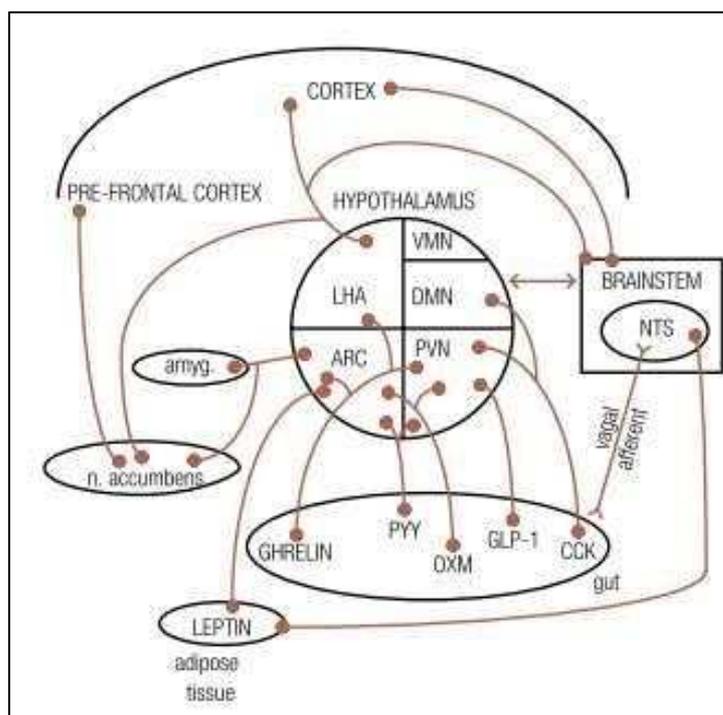
Une fois la prise alimentaire déclenchée et en cours, les premiers signaux de faim disparaissent progressivement. Le remplissage de l'estomac est signalé par une transmission nerveuse vagale au tronc cérébral mais également grâce aux effets de certains peptides gastro-intestinaux comme la CCK et le PYY 3/36. Les premiers signes de satiété apparaissent alors rapidement (pour revue Suzuki et al., 2010).

A plus long terme, l'organisme a besoin de prévoir des réserves énergétiques pour tenir entre les repas et dans les périodes de disette. Il faut donc qu'il puisse être constamment informé de l'état des réserves à moyen terme (réserves de glycogène hépatique) et des réserves à plus long terme (réserves lipidiques du tissu adipeux). L'insuline et la leptine sont les deux hormones principales qui participent à ce contrôle à long terme en inhibant les neurones AgRP/NPY et en stimulant les noyaux POMC/CART ce qui conduit à une forte action anorexigène. De plus, la leptine réduit également l'inhibition GABAergique sur les neurones POMC (Shwartz., 2000 ; Zac-Varghes et al., 2010). Suite à un jeûne, ou à une baisse des substrats énergétiques circulant, les taux d'insuline et de leptine diminuent et l'activation des neurones POMC/CART diminue également. Les neurones NPY/AgRP moins inhibés par les deux hormones libèrent les deux neuropeptides mais également le GABA qui inhibe davantage les POMC/CART, renforçant ainsi la sensation de faim et induisant la prise alimentaire. La ghréline a l'effet inverse sur ces population neuronales (pour revue Morton et al., 2006).



**Figure II.3. Interactions entre signaux périphériques et centraux régulant la prise alimentaire : l'exemple de la balance de l'effet de la leptine sur l'activité des noyaux ARC et HLA de l'hypothalamus.** Toutes les abréviations sont explicitées dans le texte précédent cette figure.

Au cours de l'ingestion du repas, les signaux de satiété commencent progressivement à atteindre le cerveau. Le remplissage du tractus gastro-intestinal provoque la sécrétion de nombreux peptides comme le PYY 3-36 ou la CCK qui agissent principalement sur les afférences vagues qui participent à l'arrêt de la prise alimentaire (Shwartz et al., 2000). Cet arrêt est complété par l'augmentation sanguine de glucose et d'acides gras (Kim et al., 2002; Obici et al., 2002), ce qui active les centres de satiété et inactivent les centres de faim au niveau des noyaux hypothalamiques (figure II.3).



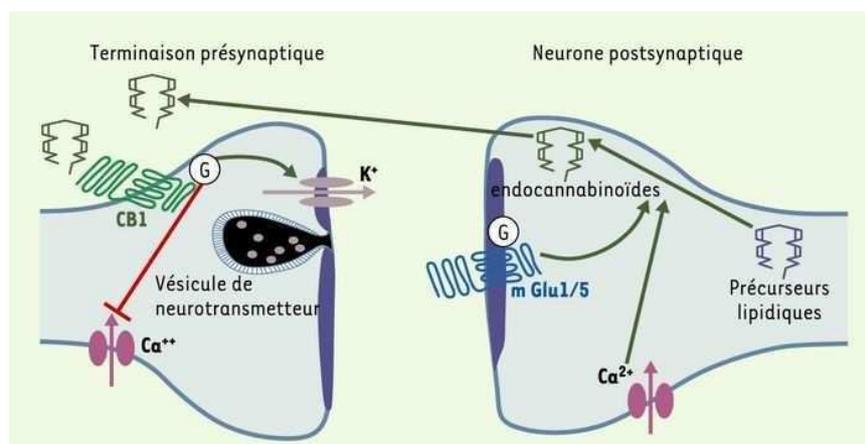
**Figure II.4. Schéma récapitulatif des signaux périphériques et des structures cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.** Différentes interactions entre les signaux périphériques, les noyaux hypothalamiques, les structures corticales et limbiques (modifié d'après Simpson et al., 2009). Gut : intestins, Brainstem : tronc cérébral, OXM : Oxymotomuline. Glucagon Like Peptide 1. Toutes les autres abréviations sont indiquées dans le texte ci-dessus.

### III. Un nouveau régulateur de la prise alimentaire : le système des endocannabinoïdes

Depuis des siècles et pour différentes raisons, les effets de molécules extraites du *Cannabis sativa* sont connus. Si les questions relatives à l'usage, la légalisation voire les bienfaits de cette plante suscitent débats et désaccords dans la société civile, la molécule responsable des effets de cette plante est bien connue. Ces effets seraient dus à l'interaction entre le  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), le principe actif majeur de la plante, avec leurs récepteurs centraux appelés récepteurs cannabinoïdes ou CB (Bermudez-Silva et al., 2010). Les ligands endogènes des CB sont les endocannabinoïdes (ECB). L'implication du système des (endo)cannabinoïdes dans les mécanismes de prise alimentaire n'a été que récemment analysée, et dénote comme nous allons le voir par sa complexité et de son indépendance relative des systèmes hypothalamiques.

Les CB connus sont au nombre de trois : CB1, CB2, et GPR55 découvert récemment (pour revue Li et al., 2011). Ces récepteurs ont, outre le ligand exogène qui est le THC, des ligands naturels appelés ECB qui sont actuellement au nombre de deux : l'anandamide (AEA) et l'arachidonoylglycerol (2-AG) (Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011). Des études récentes ont montré qu'ils pouvaient être produits par les hépatocytes, le muscle strié, le tractus intestinal et le pancréas et les neurones (Di

Marzo, 2009). Les CB présentent une conservation entre les espèces mais sont assez hétérogènes entre eux. Ils sont exprimés de façon très large dans l'organisme, la forme la plus abondante étant les CB1 dans le cerveau, nous allons nous concentrer particulièrement sur ce type de CB et sur son implication dans le contrôle de la prise alimentaire. Les CB1 sont exprimés dans le cervelet, le cortex et l'hippocampe (De Jesus et al., 2006) mais aussi, et de façon très intéressante, dans le BO, le cortex piriforme, l'amygdale, les noyaux thalamiques et hypothalamiques (Li et al., 2011) ainsi que la MO (communication personnelle du laboratoire NOeMi) et le BO (résultats du laboratoire NOeMI non publiés). Leur voie de signalisation (figure II.5) classiquement décrite comprend un couplage avec une protéine  $G_i$  et leur activation entraîne l'inhibition de l'Adenylate Cyclase (AC) et une réduction des courants calciques entrant par des canaux calciques voltage-dépendants (pour revue Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011) qui résulte en une diminution de la libération de GABA ou de glutamate. Cependant, cette voie de signalisation ne semble pas unique, d'autres voies parfois contradictoires sont rapportées, montrant des augmentations de calcium intracellulaire. Les différentes voies de signalisation, les controverses et leurs éventuelles explications sont présentées dans une revue très récente de Li et al. (2011).



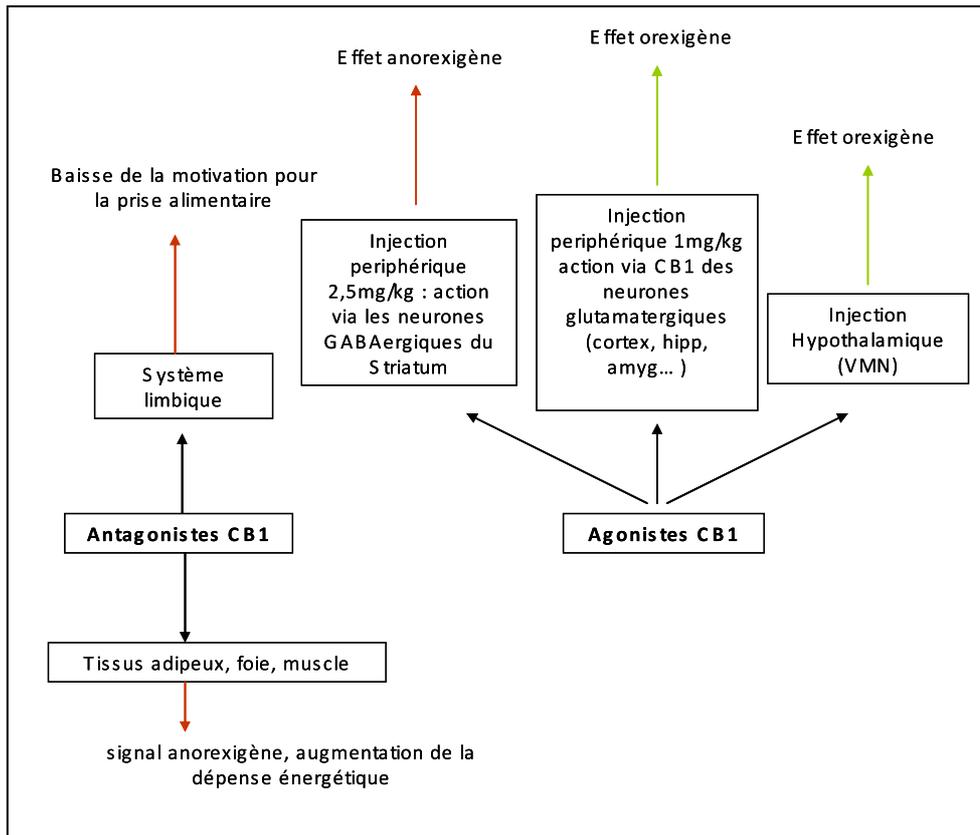
**Figure II.5. Les endocannabinoïdes : des messagers rétrogrades synthétisés sur le versant postsynaptique et agissant sur le compartiment présynaptique sur leurs récepteurs CB1.** L'activation des CB1 par les ECB produit une inhibition de la libération de glutamate ou de GABA présynaptique (notamment par l'hyperpolarisation du bouton présynaptique par action sur les canaux potassiques).

L'implication des CB1 dans la prise alimentaire, notamment chez l'Homme, est bien connue : des agonistes de ce récepteur sont utilisés pour le traitement des effets secondaires anorexigènes des chimiothérapies, des anorexies liées au SIDA ou à la maladie d'Alzheimer (Li et al., 2011). Leur rôle orexigène a ouvert une nouvelle piste dans la compréhension de la régulation centrale de la prise alimentaire et a stimulé la recherche dans ce domaine. De manière très élégante, Bermudez-Silva et al. (2010) traduisent cet enthousiasme et cette effervescence provoquée par l'arrivée des ECB dans la recherche sur la prise alimentaire par le titre de leur revue : « The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? ». En effet, l'implication des ECB dans la prise alimentaire semble être de première importance: Williams et Kirkham rapportent en 2002

(Williams & Kirkham, 2002) une augmentation des 2-AG et AEA entre les repas, mieux encore, le 2-AG connaît une augmentation suite au jeûne et diminue après un repas (Kirkham et al., 2002). Une des informations les plus intéressantes dans ces études est que ces variations en fonction du statut nutritionnel sont observées dans les structures liées à la récompense/renforcement mais moins au niveau des structures hypothalamiques impliquées dans la prise alimentaire. L'effet des structures limbiques semble être lié à la motivation, dans la mesure où le blocage des CB1 dans les structures limbiques réduit l'effort fourni par un animal pour obtenir de la nourriture (Solinas & Goldberg, 2005; Rasmussen & Huskinson, 2008). Cependant, il est à noter que les CB1 sont exprimés dans les neurones POMC et CART et l'activation des CB1 dans le VMN, qui est un centre de satiété, induit une augmentation de la prise alimentaire (Jamshidi & Taylor, 2001) suggérant que les CB1 agiraient en inhibant les neurones POMC, CART et ceux du VMN.

L'effet orexigène du THC mis en évidence par (Williams et al., 1998) chez l'Homme est nuancé par une étude de nos collaborateurs bordelais : Bellocchio et al. (2010) montrent que cet effet est subtil et dépend de la concentration de THC injectée chez la souris. Une faible concentration 1mg/kg de THC induit une hyperphagie alors qu'une plus forte concentration (2,5mg/kg) induit une hypophagie : à faible concentration, le THC active les CB1 des neurones glutamatergiques et induit une hyperphagie tandis qu'à forte concentration, ce sont les CB1 des neurones GABAergiques qui sont activés et qui induisent une hypophagie. Les effets des agonistes et des antagonistes des CB1 sont résumés dans la figure II.6.

Les CB1, comme les récepteurs au NPY, aux orexines, à l'insuline, et à la leptine, ne sont pas limités à une expression dans le système hypothalamique et sont présents dans l'ensemble du système olfactif et limbique. De plus, ils agissent fortement sur les aspects hédoniques liées à cette récompense à valeur vitale que représente la nourriture (Li et al., 2011). Au niveau du BO, les CB1 sont présents dans les couches mitrales et granulaires, lorsqu'ils sont activés, ils inhibent la libération de GABA induite par la stimulation glutamatergique (Delgado & Jaff, 2011).



**Figure II.6. Effets centraux et périphériques des agents pharmacologiques (agonistes versus antagonistes) CB1 sur la régulation de la prise alimentaire.**

### III. Rôle des systèmes sensoriels dans la régulation de la prise alimentaire

Les systèmes sensoriels interviennent dans la régulation de la prise alimentaire à court terme, lorsque l'état de faim n'est pas trop avancé, en modulant le choix des aliments consommés. Si l'état de faim est profondément installé, les besoins physiologiques l'emportent sur les sens (Le Magnen, 1999c). Peu d'études à notre connaissance ont été publiées sur leur implication dans le contrôle de la prise alimentaire. Parmi ceux qui ont contribué à l'avancée des connaissances sur cette question, Jacques Le Magnen et Edmund T Rolls et leurs collaborateurs ont élégamment abordé ces problèmes tout au long de leur carrière. L'issue 1 du volume 33 de la revue *Appetite* parue en 1999 fait le point sur les publications de J. Le Magnen parues pour la majorité en français.

La figure II.7. montre les interactions possibles entre les différentes modalités sensorielles et les structures qui gèrent la prise alimentaire. Dès la fin des années 1950, trois modalités sensorielles sont mise en évidence dans le choix des aliments : les sens chimiques, de loin les plus puissants (Rolls, 2005), puis la texture et la vue (Le Magnen & Julien, 1999b) . Le goût et l'odorat sont extrêmement

importants dans la mesure où ils déterminent la flaveur d'un aliment, définie comme étant l'ensemble des sensations gustatives et olfactives d'un aliment mis en bouche.

### **III.1. Le sens gustatif**

Le codage de l'information gustative débute avec la transduction du signal chimique en signal électrique au niveau des papilles (trois sensibles aux goûts, caliciforme, fongiforme, foliée, et une abrasive, la filiforme) de la langue. Ces papilles contiennent les bourgeons gustatifs (à noter qu'il existe des bourgeons en moindre quantité dans la muqueuse de la bouche et dans l'œsophage). Les bourgeons sont constitués de quelques dizaines de cellules réparties en cellules de soutien (épithéliales), cellules basales (précurseurs des deux autres types de cellules qui sont renouvelées constamment) et en cellules sensorielles gustatives (10% environ d'entre elles) : ils sont en forme d'oignon et sont enfouis dans la couche épidermique de la papille et n'émergent pas à la surface. Les cellules gustatives expriment des récepteurs gustatifs. Concernant la détection des goûts sucrés et umami, les récepteurs impliqués sont notés T1R1, R2 et R3 assemblés en hétérodimères. Les hétérodimères T1R2+T1R3 sont activés par le sucré alors que les T1R1+T1R3 sont activés par le glutamate pour le goût umami. Le goût amer est médié par la famille T2Rs qui comprend 25 membres. Enfin, les goûts acides et sucrés sont détectés par des récepteurs canaux tels que les canaux ioniques acide-sensitifs (ASICs) ou les canaux potassiques liés aux acides nucléiques cycliques activés par l'hyperpolarisation (HCNs). Les cellules exprimant ces récepteurs sont innervées par les fibres du nerf gustatif (pour revue Niki et al., 2010). Le nerf gustatif entre dans le Système Nerveux Central (SNC) par plusieurs voies, notamment le nerf trijumeau et arrive au tronc cérébral. Au niveau du tronc cérébral, les voies sensorielles vont innerver le thalamus et le système limbique (pour revue Rolls et al., 2005). Chacun de ces nerfs véhicule des informations provenant d'une partie précise des épithélia gustatifs. Ces trois nerfs gustatifs envoient l'information dans le système nerveux central au niveau du NTS dans le bulbe rachidien, qui projette à son tour vers le thalamus qui est en relation avec le cortex gustatif primaire dénommé cortex insulaire (pour revue Rolls et al., 2005).

Classés en fonction des neurones primaires et secondaires des cortex gustatifs qui répondent aux différents goûts, nous pouvons distinguer 5 goûts identifiés : les quatre classiques (salé, sucré, acide et amer) et les substances avec un goût défini par « umami » (le glutamate, présent dans les tomates, le lait ou les champignons) (Dulac, 2000 ; Mombaerts, 2004 ; Rolls., 2005). Subjectivement, le goût d'un aliment peut paraître alternativement plaisant lorsque le consommateur (humain) est affamé, puis neutre lorsqu'il a été consommé jusqu'à satiété. Néanmoins, la réponse des neurones du goût du NTS ou du cortex gustatif primaire n'est pas atténuée après satiété chez le primate. Au niveau du cortex gustatif secondaire décrit par Rolls et al. (1990), les neurones qui répondaient au glucose chez le primate affamé ne répondent plus lorsque celui-ci a mangé jusqu'à satiété (Rolls et al., 1990). Ceci s'accompagne aussi d'un rejet de la nourriture de la part du singe. De manière intéressante, cette

extinction de l'activité des neurones au niveau du cortex est observée uniquement pour l'aliment que le singe a consommé jusqu'à satiété, si un autre aliment lui est présenté cette inhibition n'est pas exprimée : l'équipe Rolls suggère que cette diminution de la réponse au niveau du cortex gustatif secondaire n'est pas due à une désensibilisation au niveau sensorielle, dans la mesure où les neurones du NTS et du cortex primaire continuent de répondre, mais plutôt que les signaux de satiété agissent sur le cortex secondaire et modulent la représentation de la nourriture en terme de palatabilité.

Cependant, d'autres études récentes montrent que, du moins en ce qui concerne le goût sucré, des facteurs contrôlant la prise alimentaire comme les ECB ou la leptine peuvent moduler les réponses au glucose au niveau du nerf gustatif pour revue (Jyotaki et al., 2010). Ainsi, les ECB (en mode orexigène) augmentent les réponses dans le nerf gustatif pour le glucose (Yoshida et al., 2010 ; Niki et al., 2010) alors que la leptine le diminue (Niki et al., 2010). De plus la sensibilité au sucre suit le rythme nyctéméral de la leptine (Jyotaki et al., 2010).

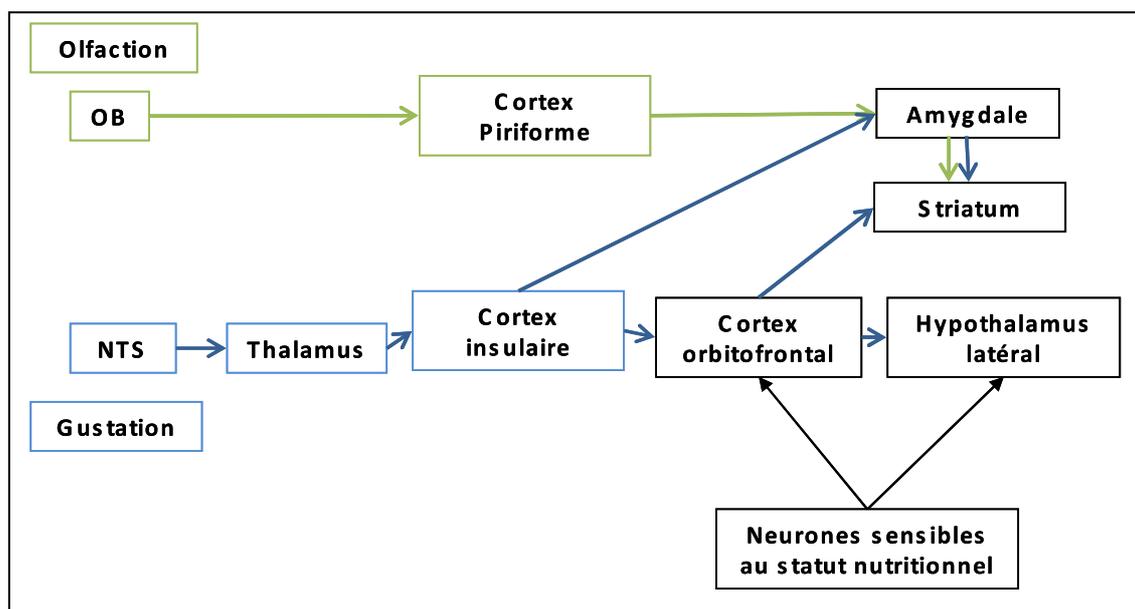
Il semble donc que les facteurs de satiété et de faim agissent des les premiers étages de la gustation et affectent donc la perception même de la saveur en plus de l'effet de plaisir que démontre l'équipe de Rolls. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette modulation du goût avant intégration corticale pourrait être aussi à l'origine de la modification de sa perception au niveau des structures centrales.

### **III.2. Le sens olfactif**

Dans les années 1950, Jacques Le Magnen met en évidence l'implication du système olfactif dans la prise alimentaire (pour revue, Le Magnen, 2001). Ainsi, des aliments énergétiquement identiques mais odorisés différemment induisent des consommations différentes en terme de quantité (Le Magnen, 1999c) : en effet, les animaux auxquels leur aliment habituel a été présenté sous une forme différemment odorisée ont augmenté leur prise alimentaire de 43%. Le Magnen odorise le même aliment avec quatre odeurs différentes et présente chacun pendant 30 minutes : les quantités ingérées cumulées sont alors augmentées de 72%. Cette étude montre l'influence du sens olfactif dans la prise alimentaire (Le Magnen, 1999a,b).

L'olfaction intervient comme nous venons de le voir comme indicateur de la valeur qualitative des aliments (valeur hédonique), induisant des préférences liées au plaisir (Le Magnen, 1999c). Elle peut être utilisée aussi comme indicateur de la valeur énergétique de l'aliment suite à une association (Le Magnen, 1999c). Ces expériences ont utilisé la voie orthonasale où la stimulation vient de l'air inspiré et stimule la MO. Il existe aussi, pendant la mastication des aliments, une stimulation odorante par une voie rétronasale où les odeurs passent de la bouche puis le pharynx pour aboutir à la MO (Ruijschop et al., 2009). Chez l'être humain, cette voie est probablement impliquée dans la satiété sensorielle spécifique (Small et al, 2005). L'étude de la voie rétronasale s'avère difficile car elle est variable d'un

individu à l'autre, en fonction notamment de la vitesse et de la durée de mastication, l'anatomie du nez, le rythme de salivation, qui sont tous propres à chaque individu (Ruijschop et al., 2009). Néanmoins, en prenant en compte ces paramètres et en fixant des paramètres précis d'étude comme la taille de la portion alimentaire ingérée ou la durée de mastication, des effets sur la satiété et l'arrêt de la prise alimentaire sont observés (Zijlstra et al., 2008; Zijlstra et al., 2009). De plus, la satiété sensorielle spécifique existe aussi pour la flaveur d'un aliment (pour revue Le Magnen, 2001 ; Rolls, 2005). Elle se manifeste notamment au niveau du cortex orbitofrontal où la valeur de plaisance de l'odeur est représentée (Rolls, 2005) : par exemple les réponses à l'odeur de banane sont diminuées après une consommation de banane (O'Doherty et al., 2000).



**Figure II.7. Schéma des voies olfactives et gustatives montrant leurs convergences centrales au niveau de l'amygdale et le striatum.** Les autres sens (visuel et tactile) agissent après relais thalamique sur le cortex orbitofrontal et l'amygdale.

Au sein du système sensoriel, le BO serait une structure centrale sous influence du statut nutritionnel et participe au contrôle de la prise alimentaire. Les études qui suggèrent que l'activité du BO est modulée par le statut nutritionnel et joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire sont peu nombreuses mais convaincantes. Une bulbectomie totale induit la disparition du sens olfactif et une hyperphagie chez l'animal (Miro et al., 1982). Les cellules du BO expriment des récepteurs aux orexines et à la leptine (Prud'Homme et al., 2009), des récepteurs aux ECB (Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011) ainsi que des récepteurs à l'insuline (Colley et al., 2004) et au NPY (résultats non publiés du laboratoire NOeMI). Ces molécules ont un effet sur les neurones bulbaire : ainsi l'orexine module l'activité des M/TC dans des tranches de BO de rat (Hardy et al., 2005) et les antagonistes de l'orexine ou la leptine diminuent l'activité c-fos des neurones bulbaire de toutes les

couches du BO (Prud'Homme et al., 2009). De plus, après une consommation de nourriture palatable, les taux de CCK, signal périphérique impliqué dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire, augmentent dans le BO, principalement dans les GC (Martin et al., 2009). Enfin, des données récentes pointent également une implication des ECB dans le contrôle de la sensibilité olfactive chez le Xénope (Breunig et al., 2010; Czesnik et al., 2007).

Ces quelques données sur les interactions BO/prise alimentaire convergent sur le fait que le BO pourrait faire partie du réseau de structures cérébrales (avec notamment le reste du système limbique comprenant l'hypothalamus) impliqué dans les mécanismes centraux de régulation de la prise alimentaire. Dans le chapitre suivant portant sur la problématique de cette thèse, nous ferons le point sur la littérature qui nous a amené à nous poser la question suivante : est-ce que l'activité sensorielle au niveau du BO est régulée, comme pour l'hypothalamus, par le rétrocontrôle du statut nutritionnel ? Autrement dit, existe-il une plasticité de la représentation spatiotemporelle des odeurs chez des rats mis à jeun ?

# Chapitre III. Problématique

Nous avons décrit dans le chapitre précédent les différents systèmes régulant la prise alimentaire en mentionnant l'implication du système olfactif. Si le BO est impliqué dans le réseau des structures modulant la prise alimentaire, non seulement sa lésion ou son inactivation devrait la perturber mais, en retour, il devrait présenter une plasticité spécifique liée à l'état nutritionnel. Nous voulons résumer ici les données fonctionnelles montrant cette régulation bidirectionnelle dans le système olfactif, préciser les questions essentielles qui restent à être résolues pour comprendre cette interaction complexe au niveau du BO, et exposer le sujet de cette thèse.

L'influence du système olfactif dans la régulation de la prise alimentaire a été d'abord évoquée par Le Magnen, qui a montré dès les années 1950 que la consommation d'un aliment était augmentée chez le rat si l'aliment en question était odorisé différemment à chaque présentation (Le Magnen, 1999a). Des études plus récentes ont montré qu'une bulbectomie chez des rats induit une hyperphagie (Miro et al., 1982; Primeaux et al., 2007). Chez l'Humain, les stimuli sensoriels, notamment chimiques, sont largement impliqués dans la régulation centrale de la prise alimentaire, consistant à préparer l'organisme à recevoir des aliments au travers de la phase céphalique en particulier (pour revue Mattes, 1997). Chez certains patients (nourrissons et personnes très âgées) atteints de troubles neurologiques accompagnés par des désordres de la prise alimentaire obligeant à utiliser une nutrition entérique, la stimulation des voies olfactives par de l'huile de poivre noir est un moyen efficace pour reverser l'anorexie en permettant à nouveau une prise par voie orale (Munakata et al., 2008).

La perception des odeurs module donc la prise alimentaire, l'hypothèse d'une modulation inverse du statut nutritionnel sur la perception des odeurs a été également étudiée, S'il est expérimenté de tous que la perception des odeurs est différente lorsque l'on est à jeun ou suite à un bon repas, les travaux anciens de Cabanac chez l'homme montrent que la valeur hédonique d'un aliment change selon l'état nutritionnel, ce qu'on qualifie d'alliesthésie (Cabanac & Duclaux, 1973). Des études plus récentes montrent que la valeur hédonique d'une odeur alimentaire est plus importante dans l'état affamé que l'état rassasié alors que la valeur hédonique d'une odeur non alimentaire semble augmenter avec la satiété (Jiang et al., 2008). Des résultats plus récents confirment que les signaux du statut nutritionnel modulent le comportement et la perception olfactifs. Ainsi, les travaux récents de l'équipe NOeMI montrent que l'exploration d'une odeur aliementaire est augmentée en cas de jeûne de 48 heures chez les rats (Prud'Homme et al., 2009). De plus, en 2006, Getchell et collaborateurs ont montré que les souris obèses déficientes en leptine de la souche Ob/Ob ont de meilleures performances olfactives pour trouver leur nourriture que les souris sauvages, suggérant que la leptine aurait pour rôle de diminuer le seuil de la perception olfactive. Ils montrent dans ce sens qu'une injection de leptine réduit les performances olfactives de ces souris (Getchell et al., 2006). Dans une autre étude d'aversion olfactive conditionnée, les rats apprennent à éviter une odeur d'acétate d'isoamyl mélangée à leur eau

de boisson parce qu'elle a été préalablement associée à un malaise gastrique induit par injection de chlorure de lithium. Les rats à jeun pendant 22 heures détectent et évitent l'odeur aversive à de plus faibles concentrations que les rats nourris suggérant que le seuil de détection d'une odeur non alimentaire mais associée à une aversion est abaissée par le jeûne (Aimé et al., 2007).

Il apparaît donc que les molécules de signalisation du statut nutritionnel peuvent agir sur le système olfactif en augmentant la sensibilité olfactive pendant le jeûne et en la diminuant pendant les périodes de satiété. Des tests comportementaux utilisant ces signaux moléculaires clés ont été réalisés dans ce sens et ont montré que les performances olfactives étaient diminuées par une injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de leptine alors qu'elle était augmentée avec une i.c.v. d'orexine (Julliard et al., 2007). En plus de ces effets sur le seuil de détection olfactive, l'activité d'exploration olfactive des rats rassasiés augmente suite à une injection d'orexine, mimant ainsi l'état affamé alors qu'une injection d'antagonistes de l'orexine ou de leptine, mimant pharmacologiquement l'état rassasié chez des animaux affamés, diminue l'exploration olfactive (Prud'Homme et al., 2009). L'implication des signaux orexigènes ou anorexigènes dans les modifications de l'activité du système olfactif fournit une preuve supplémentaire et solide du rétrocontrôle qu'exerce le statut nutritionnel sur le système olfactif.

Chez l'être humain, les différences de seuil de détection et la valeur hédonique des odeurs alimentaires et non alimentaires restent mal connues et varient en fonction des études (Albrecht et al., 2009) même si certaines données montrent des différences d'influence de la leptine en fonction du sexe sur les seuils de détection et l'identification des odeurs (Karlsson et al., 2002). Plusieurs facteurs entrent en jeu chez l'Humain, notamment des éléments subjectifs, rendant difficiles la compréhension des perceptions, l'identification et l'attribution des valeurs hédoniques. Une chose reste sûre : la perception des odeurs et la valeur que nous leur attribuons reste dépendante de l'état de faim ou de satiété (revue de Yeomans, 2006).

Ces résultats sur les changements comportementaux traduisent des changements dans les structures périphériques et centrales qui gèrent le traitement sensoriel et le comportement lié au système olfactif. La première structure qui peut être modulée par le statut nutritionnel est le détecteur des odorants, la MO. Elle possède des récepteurs aux peptides signaux du statut nutritionnel, notamment des récepteurs à la leptine et à l'insuline exprimés dans les cils olfactifs des OSN, cellules portant les récepteurs olfactifs et responsables des premières étapes de transduction du signal. L'expression des récepteurs à la leptine (Baly et al., 2007) et à l'insuline (Lacroix et al., 2008) augmente après 48 h de jeûne. Des études ex-vivo ont montré une influence de ces deux peptides clés sur l'activité des OSN et sur l'activité électrique de la MO. En effet, des études sur les rythmes de décharge des OSN en patch clamp sur des tranches de MO ont montré que la leptine et l'insuline augmentent les rythmes de décharges spontanées des OSN et inversement diminuent leur capacité à répondre aux odeurs (Savigner et al., 2009). La réponse globale de la MO à un odorant mesurée par électro-olfactogramme

est diminuée après instillation d'insuline (Lacroix et al., 2008). Est-ce que les autres structures du système olfactif (notamment le BO) présente également un changement d'activité en fonction du statut nutritionnel ou se content-elles d'être le reflet de l'entrée sensorielle de la MO modifiée par le statut nutritionnel ?

Des marquages immunohistochimiques montrent la présence de récepteurs à la leptine et aux orexines dans le BO (Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Prud'Homme et al., 2009). De plus, des résultats non publiés du laboratoire NOeMI rapportent la présence locale d'ARNm des récepteurs à l'insuline. L'étude des gènes d'activité précoce comme le c-fos révèle une forte activation des couches mitrales et granulaires du BO chez des animaux à jeun 48h comparés aux nourris en présence d'odeur alimentaire ou familière (Prud'Homme et al., 2009) : de manière très intéressante, cet effet peut être reversé par l'injection locale de leptine ou d'antagonistes des orexines. Des études *ex vivo* ont montré que l'activité des cellules mitrales du BO est modifiée par l'application d'orexine dans le bain de perfusion (Hardy et al., 2005). Des études du laboratoire NOEMI en collaboration avec une équipe du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon montrent aussi une modulation de l'activité des M/TC par l'insuline (résultats non publiés, voir la thèse d'Agnès Savigner, 2009). Ces études suggèrent que l'intervention du BO dans la régulation des performances olfactives ne se limite pas à relayer un signal modifié au niveau de l'entrée sensorielle de la MO mais que le traitement bulbaire peut être également affecté par le statut nutritionnel, au travers de la modulation par des signaux hormonaux circulants ou par des neuromodulateurs.

Des études *in vivo* ont été menées sur la plasticité du BO en fonction de l'état nutritionnel depuis près de quarante ans maintenant. Jeanne Pager (1972) a commencé l'investigation au niveau du BO en étudiant dans des conditions physiologiques de jeûne ou de satiété l'activité des M/TC en fonction du statut nutritionnel (Pager et al., 1972). Ainsi, elle montre que chez des animaux éveillés les M/TC répondent plus fortement à une odeur d'aliment dans un état de jeûne pendant 22 heures que dans un état de satiété. Si cette odeur n'est pas alimentaire, ces différences entre les réponses d'animaux à jeun ou nourris sont abolies. Elle montre également que sans les retours centrifuges (sous section des fibres), cette différence de sensibilité aux odeurs alimentaires versus non alimentaires est abolie. Ces résultats sur des enregistrements unitaires ont été repris plus tard sur animaux anesthésiés (Apelbaum & Chaput, 2003). Cette étude montre que les M/TC répondent plus fortement chez un animal affamé ce qui montre de façon convergente avec Pager et collaborateurs que le BO d'un animal affamé est plus réactif que celui d'un animal rassasié. Cependant, différemment des résultats de Pager, les réponses des mitrales enregistrées par Apelbaum et Chaput chez le rat à jeun montrent qu'elles sont augmentées quelle que soit la nature de l'odeur. Cette différence est probablement due à la nature du protocole expérimental utilisé : Apelbaum et Chaput (2003) ont travaillé sur des rats anesthésiés, tandis que Pager et collaborateurs avaient travaillé sur des rats éveillés. Ces auteurs émettent l'hypothèse que l'anesthésie change l'état des retours centrifuges en les inhibant, ce qui comme la

section des fibres centrifuges, montre que le rétrocontrôle cortical serait responsable de la sélectivité aux odeurs d'aliments.

Ces études montrent une différence dans la représentation temporelle des odeurs, induite par le statut nutritionnel, ou certains de ces signaux, à l'échelle unitaire. Une étude ancienne montre une modulation de l'activité du cortex piriforme du chat en fonction du statut nutritionnel (Femman, 1960). Concernant le BO, L'unique étude, à notre connaissance, qui s'intéresse à la l'activité oscillatoire en réponse aux odeurs en fonctions du statut nutritionnel est celle réalisée par Chabaud et collaborateurs (2000). Elle a été réalisée chez des animaux vigiles et montre qu'au moins deux structures augmentent leur réponse oscillatoire à une stimulation odorante en fonction du statut nutritionnel. De manière intéressante, les réponses oscillatoires aux odeurs dans le cortex entorhinal changent quelle que soit la nature de des odeurs chez les rats à jeun alors que les réponses du BO sont sélectivement augmentées pour une odeur alimentaire. En effet, aucune différence n'est observée dans le BO lorsqu'une odeur non alimentaire neutre est présentée. De plus, ces travaux montrent un effet d'habituation chez les animaux nourris lorsqu'ils sont stimulés plusieurs fois avec la même odeur. Cette habituation n'a pas lieu chez les animaux à jeun : lorsqu'ils sont stimulés avec l'odeur aliementaire, ils ne diminuent pas leur réponse. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Pager et al. (1972) et montrent une sélectivité des réponses bulbaires aux odeurs alimentaires. La différence des réponses aux odeurs alimentaires et non alimentaires observée entre les préparations anesthésiées et vigiles sont, comme le suggéraient Pager puis Apelbaum et Chaput, probablement dues à l'état de l'activité des retours centrifuges vers le BO. Dans ce sens, le blocage d'une partie des retours centrifuges avec de la scopolamine abolit chez les rats affamés les différences entre les réponses à l'odeur d'aliment et les odeurs neutres (Chabaud et al., 2000).

L'ensemble de ces études montre qu'il existe un rétrocontrôle du statut nutritionnel sur l'activité du BO. Néanmoins, il reste des questions essentielles qui n'ont pas encore été résolues sur les mécanismes spatiotemporels de la modulation de l'activité du BO par le statut nutritionnel. Nous pouvons les résumer en trois points. 1. Les explications des études en tranches restent hypothétiques et très incomplètes du fait de la coupure de la préparation biologique de son réseau, de la suppression des rétrocontrôles centrifuges et de la difficulté de mimer avec certitude un état à jeun ou nourri sur une tranche. 2. Les différences de seuil d'activation rapportée par les études en comportement n'ont pas été étudiés avec des techniques fonctionnelles et l'étude des oscillations en réponse à des odeurs alimentaires versus non alimentaires n'a pas non plus exploré les différences de seuil d'activation. 3. Aucune étude à notre connaissance n'a analysé les effets du jeûne sur la représentation spatiale des odeurs alimentaires et non alimentaires.

Dans ce contexte, nous avons étudié grâce à la technique d'imagerie optique intrinsèque et des enregistrements du potentiel de champ local (LFP), les représentations spatiale et temporelle dans le

BO pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire en fonction du statut nutritionnel. Nous avons testé chez des rats anesthésiés l'odeur d'amande, à laquelle les animaux associent une nourriture palatable, et l'odeur d'hexanal comme odeur neutre et nouvelle pour les animaux. Nous avons utilisé de faibles concentrations de ces deux odeurs sur des animaux à jeun et nourris afin de détecter des différences de seuil, induites par le jeûne, sur la représentation spatiale et temporelle des odeurs dans le BO. Ayant établi ces différences, nous avons également entrepris l'étude de candidats moléculaires et cellulaires qui les expliqueraient. Ainsi, nous avons évalué les effets du jeûne de 17 heures sur la transcription des gènes des récepteurs à l'insuline et à la leptine dans le BO et nous avons également testé l'effet d'une situation de satiété mimée chez des animaux à jeun, en leur injectant de la leptine par voie intrapéritonéale, sur la représentation temporelle de l'odeur alimentaire. Nous avons également effectué une étude préliminaire sur l'effet du jeûne sur certaines protéines astrocytaires du BO, dans la mesure où des études antérieures de l'équipe montraient des récepteurs astrocytaires à la leptine.

Enfin, en collaboration avec l'équipe de Giovanni Marsicano au Neurocentre Magendie de Bordeaux, nous avons porté notre intérêt sur le système des ECB qui modulent la prise alimentaire. Comme nous l'avons souligné précédemment, les agonistes des CB1 peuvent à faible concentration stimuler la prise alimentaire alors qu'à de fortes concentrations, ils l'inhibent. Nous nous sommes concentrés sur le premier mécanisme qui augmente la prise alimentaire chez les souris et avons émis l'hypothèse que cette augmentation pouvait être due, au moins en partie au système olfactif. Nous avons donc étudié le rôle des ECB sur l'activation bulbaire en analysant la modulation de l'activité bulbaire par l'agoniste des récepteurs CB1, le THC.

# **Chapitre IV**

## **Matériel et méthodes**

### **I. Animaux**

### **II. Protocole de restriction alimentaire**

### **III. Reconnaissance de l'odeur alimentaire**

### **IV. Etude des effets du jeûne sur la représentation spatiale des odeurs dans le BO par imagerie optique du signal intrinsèque chez le rat**

### **V. Etude des effets du jeûne, de la leptine et du THC sur le codage temporel dans le BO**

### **VI. Etude des effets du jeûne sur l'expression de protéines astrocytaires (GFAP, Connexine 30, GLAST, GLT1)**

Le sujet principal de cette thèse a été l'étude de l'effet du statut nutritionnel sur la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le BO de rat que nous avons complété par des études sur des protéines clef dans le système olfactif, notamment des protéines astrocytaires. Dans le laboratoire interdisciplinaire IMNC (CNRS, UMR8165, Orsay), nous avons étudié l'activation du BO par imagerie et électrophysiologie en réponse à des stimulations odorantes chez le rat anesthésié. Dans le laboratoire NOeMI (INRA, Jouy en Josas), nous nous sommes intéressés à l'expression de certaines protéines clés, potentiellement impliquées dans les modifications de l'activité dans le BO induite par le jeûne. Ces deux séries d'expériences ont été menées chez le rat anesthésié.

Un second projet a été mené en collaboration avec l'équipe de Giovanni Marsicano « Endocannabinoïdes et Neuroadaptation » du Neurocentre Magendie (INSERM U862/Université Bordeaux1, Bordeaux). Cette équipe s'intéresse au rôle fonctionnel des récepteurs CB1 et notamment leur importance dans la prise alimentaire. Dans ce cadre, nous avons étudié l'effet de l'agoniste des récepteurs CB1, le THC, sur l'activité électrophysiologique des neurones bulbaires. Cette étude a été menée chez la souris anesthésiées.

Dans ce chapitre, nous décrivons les protocoles de mise à jeun et de reconnaissance de l'odeur alimentaire (partie I). Nous détaillons par la suite le protocole d'imagerie optique utilisé pour l'étude de la représentation spatiale des odeurs (partie II) et le protocole d'électrophysiologie qui a servi à l'étude du codage temporel (partie III). Nous finissons par décrire les différents protocoles de biologie cellulaire et moléculaire utilisés pour l'étude des effets du jeûne sur des cibles moléculaires astrocytaires potentiellement affectées par le jeûne (partie IV).

## **I. Animaux**

Dans cette thèse, nous avons utilisé des rats mâles de souche Long Evans (Janvier, Saint Berthevin, France) pesant 250-350g âgés entre 2 et 3 mois, ainsi que des souris C57BL6 (Janvier, Saint Berthevin, France) pesant entre 20-30g. Nous avons également utilisé des souris mutées pour le gène CB1 dans les neurones glutamatergiques (Bellocchio et al., 2010), souris transgéniques que nous avons importées de Bordeaux.

Dans nos études de la représentation spatiotemporelle des odeurs, les rats et les souris ont été accueillis dans une animalerie située à l'Institut de Biologie Animale (IBAIC, Bâtiment 440 à 447, Campus d'Orsay) appropriée à chaque espèce. L'agrément de l'animalerie porte le numéro « IBAIC B91471104 » (Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Essonne). Pour les études cellulaires et moléculaires, les rats étaient accueillis dans l'animalerie du centre INRA de Jouy en Josas portant le numéro d'agrément (A78120). Les rongeurs ont été maintenus en cycle 12h lumière/12h obscurité à 22°C avec une hygrométrie de 45 à 55% et un accès libre à la nourriture et à la

boisson. Un délai d'une semaine après leur arrivée à l'animalerie a été systématiquement respecté avant toute expérimentation

## **II. Protocole de restriction alimentaire**

Dans les deux études majeures de cette thèse, nous avons utilisé des protocoles de mise à jeun spécifiques. Dans l'étude des effets du jeûne chez le rat, nous avons commencé par soumettre des Wistar à un jeûne de 48h (protocole classiquement utilisé au laboratoire NOEMI). Nous avons rencontré deux difficultés : i) le modèle animal ne semblait pas approprié pour l'imagerie intrinsèque ce qui nous a poussé à opter pour la souche Long Evans (Janvier, France) utilisée dans des études précédentes du laboratoire IMNC (Gurden et al., 2006) ii) les 48 heures de restriction se sont avérées stressantes pour les animaux ce qui nous a poussé à réduire cette durée à 17h. Les animaux à jeun ont été privés de nourriture 2h avant le commencement de leur phase nocturne d'activité. Les expérimentations *in vivo* avaient lieu 5h après le commencement de leur phase diurne de repos.

Concernant l'étude des effets du THC, toutes les souris expérimentées ont été privées de nourriture 24h avant l'expérience d'électrophysiologie conformément au protocole mis au point par nos collaborateurs du NeuroCentre Magendie de Bordeaux.

## **III. Reconnaissance de l'odeur alimentaire**

L'odeur de l'aliment habituel des rats ne donnant pas de signaux en imagerie, nous avons testé d'autres aliments comme le beurre de cacahuètes (peanut butter Skippy, pâte d'arachide Dekatine) connu pour induire des signaux en imagerie optique dans le BO (Rubin & Katz, 1999).

Nous avons par la suite utilisé une arôme commercial artificiel d'amande (Vahiné commercial) pour odoriser une pâte que nous avons fabriquée et à laquelle nous avons habituée les rats. Cette pâte est constituée de 100 g de farine, 100 ml d'eau, 1 ml d'arôme d'amande, et elle est passée pendant 30 secondes au four à microondes.

Les animaux ont été habitués à consommer le beurre de cacahuètes ou le gâteau odorisé à l'amande pendant trois semaines (à des quantités équivalentes à 1g/jour en une seule prise). Après avoir constaté que les animaux montraient un enthousiasme et une excitation particulière à la présentation de l'aliment odorisé, nous avons voulu vérifier la capacité de l'odorant à induire la même réaction que la pâte elle-même. Nous avons alors testé la réaction des animaux en présence de l'odorant mis dans un épandeur fermé et troué contenant du papier filtre imbibé de l'odorant d'amande et observé leurs réactions.

## **IV Etude des effets du jeûne sur la représentation spatiale des odeurs dans le BO par imagerie optique du signal intrinsèque chez le rat**

L'état des connaissances sur le principe biophysique de l'imagerie optique du signal intrinsèque a été décrit dans l'introduction (paragraphe II.1.1.2. Imagerie Optique Intrinsèque). Nous détaillons ici les outils nécessaires pour obtenir les cartes olfactives acquises par cette technique. Il est à noter que l'équipe MIO d'IMNC a rédigé un article qui explique cette procédure: cette publication est sous presse dans le « Journal of Visualized Experiments » (JOVE) (Chery R, L'Heureux B, Bendahmane M, Renaud R, Martin C, Pain F, Gurden H : Imaging odor-evoked activities in the mouse olfactory bulb using optical reflectance and autofluorescence signals). Une copie est présentée à la fin de ce manuscrit de thèse dans la section « Publications ».

### **IV.1. Dispositif expérimental**

Le dispositif d'imagerie est présenté dans la figure IV.1. Il est composé des quatre éléments principaux suivants.

#### **IV.1.1. Microscope**

Afin de pouvoir enregistrer des images fonctionnelles du BO *in vivo*, nous avons utilisé un stéréomicroscope à épi-fluorescence (MZ 16 FA, Leika Microsystems, Allemagne). Il est équipé d'un diaphragme permettant de trouver un compromis entre une profondeur de champ suffisante pour imager la surface glomérulaire et une illumination suffisante pour observer les faibles changements dans les signaux optiques intrinsèques (de l'ordre de 0,1 à 1%).

#### **IV.1.2. Source de lumière**

Une lampe Tungstène-Halogène à alimentation stabilisée (LOT-Oriel, Massy, France) permettant d'avoir une illumination stable et homogène a été utilisée. Elle a été associée à une roue à filtres motorisés (Thorlabs) et un halo lumineux fibré fixé sur l'objectif. Deux longueurs d'ondes ont été utilisées pour cartographier l'activité bulbaire en imagerie optique. i) un éclairage vert obtenu grâce à un filtre vert à  $560 \pm 20$  nm pour la mise au point dans la couche glomérulaire : à cette longueur d'onde les vaisseaux sanguins sont très absorbants ce qui permet d'observer la vascularisation du BO sur laquelle nous nous basons pour faire la mise au point. ii) un éclairage rouge à 630 nm (Gurden et al., 2006) pour l'enregistrement des signaux intrinsèques : à cette longueur d'onde (obtenue par un filtre à  $630 \pm 10$  nm), le signal traduit les changements de volumes sanguins et la saturation en oxygène de l'hémoglobine (Meister & Bonhoeffer, 2001 ; Pain et al., 2011).

#### **IV.1.3. Camera**

Pour enregistrer les signaux intrinsèques, nous avons utilisé une caméra Orca-ER (Hamamatsu photonics) équipée d'un capteur 'Charge-Coupled Device' (CCD) ou 'dispositif de transfert de charge' qui est constitué d'une matrice de pixels photosensibles de dimensions 1344 x 1024 pixels carrés de

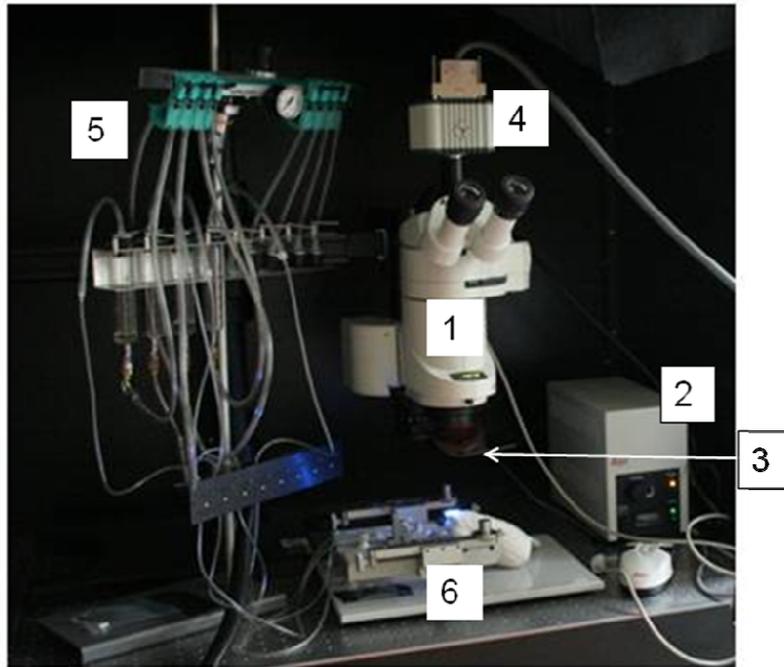
6,45  $\mu\text{m}$  de côté. Le capteur est sensible à un spectre de longueurs d'onde entre 400 et 700 nm ce qui correspond aux longueurs d'ondes que nous utilisons. L'acquisition a été effectuée à une fréquence de 5 Hz sans regroupement de pixels à l'acquisition. Au traitement, nous avons regroupé les pixels 2 par 2 (binning 2\*2) afin d'améliorer le contraste des images. La dynamique de la caméra a été exploitée au maximum pour les enregistrements d'IOSI en réglant l'éclairage de sorte à amener les pixels du capteur à la limite de saturation (figure IV.2) : le capteur est ainsi en mesure de détecter des variations de l'ordre de 1/1000 dans les propriétés d'absorption.

#### **IV.1.4. Olfactomètre**

Les stimulations olfactives ont été réalisées à l'aide d'un olfactomètre. Il est constitué d'un système de perfusion sous pression utilisé pour enrichir le milieu des préparations de tissus vivants dans le cadre de préparations *in vitro* (Pressurized Superfusion, AutoMate Scientific, Berkeley, CA, USA). Le dispositif comporte 8 flacons reliés à des vannes dont l'ouverture/fermeture est contrôlée par ordinateur. L'olfactomètre est relié à un compresseur pour délivrer de l'air pur par un flacon vide ou une stimulation odorante par un des sept flacons pouvant contenir un papier filtre imbibé d'odorant à une concentration donnée.

#### **IV.1.5. Enregistrement des données**

Le dispositif expérimental est piloté par un logiciel développé en C++ par Françoise Lefebvre, ingénieure de recherche au laboratoire IMNC. Le logiciel contrôle l'ouverture des vannes de l'olfactomètre ainsi que la roue à filtres associée au microscope. Il permet une parfaite synchronisation entre le début de la stimulation et l'acquisition des images. Il sert également de logiciel d'acquisition et de traitement des images. Le suivi de l'activation à chaque séquence d'acquisition est aussi assuré en affichant la carte d'activation à la fin de chaque stimulation.



**Figure IV.1. Dispositif expérimental pour l'imagerie optique du signal intrinsèque.** 1. Stéréomicroscope. 2. Source de lumière. 3. Halot d'éclairage. 4. Camera CCD. 5. Olfactomètre. 6. Appareil stéréotaxique.

## IV.2. Protocole expérimental d'imagerie optique

### IV.2.1. Anesthésie des rats

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé une technique d'imagerie optique et une d'enregistrement électrophysiologique chez des animaux anesthésiés. Nous avons adopté un protocole d'anesthésie qui permet de mesurer les différents signaux fonctionnels de manière optimale pour chaque type d'expérience. Dans ce but, nous avons administré de la kétamine (antagoniste des récepteurs NMDA glutamatergiques) associée soit à la xylazine soit à la médétomidine (antagonistes des récepteurs alpha-2-adrénergiques)

Pour l'imagerie optique *in vivo*, nous avons utilisé un protocole d'anesthésie déjà validé dans le laboratoire IMNC qui consiste à administrer de la Kétamine à 60 mg/kg de poids et de la Médétomidine à 0.4 mg/kg. Ce mélange est composé de 4 ml de Kétamine (Imalgène 500, Merial, France), 1,6 ml de Médétomidine (Domitor, Pfizer, France) ajusté à 20 ml avec du sérum physiologique NaCl 0,9%. L'induction de l'anesthésie est faite par isoflurane, puis les animaux reçoivent une injection intra péritonéale (i.p.) de 0.3 ml du mélange / 50 g de poids. Après vérification de l'absence de reflexes chez les animaux en réponse à un pincement de la patte postérieure, ils sont placés sur un appareil stéréotaxique et maintenus par une couverture chauffante à une température interne de 37°C. L'état anesthésié est maintenu par injection i.p. équivalente au tiers de la dose initiale environ toutes les heures après vérification de l'état anesthésique par pincement de la patte postérieure de l'animal.

#### **IV.2.2. Chirurgie pour accéder au BO**

Le but de la microchirurgie est d'enlever l'os et la dure-mère afin d'exposer le BO pour l'imagerie. Pour cela, une fenêtre optique est préparée au-dessus du BO droit de chaque rat. Après une incision de la peau, l'os est affiné délicatement à l'aide d'une fraiseuse, en observant des périodes d'humidification toutes les 10 minutes afin de le refroidir pour faciliter la chirurgie et garder le tissu sous-jacent intact. Une fois l'os affiné et ramolli, il est retiré à l'aide d'une pince. A ce stade, se pose un problème essentiel : en plus de l'effet délétère que peut avoir le contact direct du BO avec l'air, la levée de la contrainte physique exercée par l'os (puis la dure mère) peut causer des mouvements importants attribués à la respiration et aux pulsations cardiaques qui rendent l'imagerie difficile à réaliser. Pour protéger le BO et limiter ses mouvements, une chambre optique sous la forme d'un puits est construite par du ciment dentaire (Polycarboxylate Cement kit – Henri Schein, NY, USA) autour du tissu avant d'enlever la dure mère. Le BO est alors exposé à l'air, et la chambre est remplie avec une solution d'agar 1% tiède (Select Agar, Sigma Aldrich, St Louis, USA). Une fine lamelle est posée au-dessus de cette préparation afin d'avoir une surface plane qui limite l'hétérogénéité des angles d'incidence et de réflectance des photons.

#### **IV.2.3. Stimulations olfactives**

##### *Les odeurs*

Nous avons testé en imagerie les réponses du BO à une odeur alimentaire (comme défini au paragraphe I.2.) dans un lot de rats et, dans un groupe différent, une autre odeur à valence neutre, dite odeur nouvelle, ou odeur non alimentaire, car jamais rencontrée par le rat au préalable. L'odeur alimentaire est l'arôme alimentaire d'amande amère (Vahiné commercial, France). Pour ce qui est de l'odeur nouvelle, sachant que des odeurs comme l'isoamylacétate peuvent induire un effet aversif sur les rats, nous avons utilisé un aldéhyde, l'hexanal (Fulka, France) après avoir testé sa valeur « neutre » sur un lot indépendant de rats. Ce test consistait à exposer les rats, dans leurs cages à 3 cônes de pipettes dont le bout est rempli d'un odorant, l'eugénol, l'acétate d'isoamyl ou l'hexanal, le quatrième étant un contrôle rempli d'huile minérale. Nous avons constaté que les rats s'éloignaient de l'odeur d'acétate d'isoamyl et qu'ils exploraient même après plusieurs présentations l'eugénol, alors que l'hexanal ou l'huile minérale suscitaient la curiosité aux premières présentations puis les animaux ne s'y intéressaient plus.

Notre hypothèse de départ était que le jeûne pouvait affecter les seuils d'activation du BO. Pour nous trouver dans la fourchette des concentrations seuil, nous avons utilisé des concentrations très faibles d'odeurs, bien inférieures à celles habituellement utilisées au laboratoire IMNC. Les odeurs liquides ont été diluées dans de l'huile minérale (Fulka, France) aux concentrations suivantes : hexanal 0,1% et 0,5% ; arôme d'amande 2% et 5%. 50µl de ces solutions étaient déposés sur du papier filtre et mis dans un des flacons de l'olfactomètre pour la stimulation.

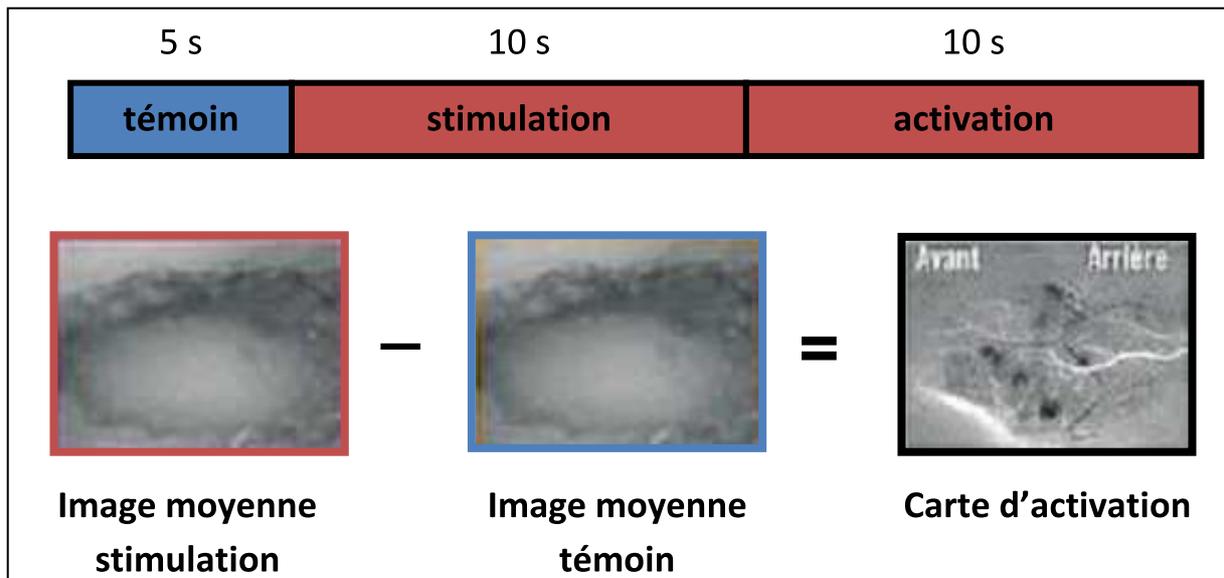
### ***La stimulation odorante***

Elle se fait à l'aide de l'olfactomètre décrit précédemment. Les flacons de l'olfactomètre sont reliés par une tubulure (Tygon, VWR, Strasbourg, France) à un masque à odeurs, placé juste en face du museau de l'animal. Chaque séquence d'acquisition comporte trois phases (figure IV.2). Tout d'abord, de l'air pur est délivré pour enregistrer la réflectance du BO en période témoin c'est à dire pour mesurer le niveau de base. L'odeur est ensuite délivrée pendant 10 secondes pour mesurer la réponse du BO à une stimulation sensorielle. Enfin, de l'air pur est délivré pendant 10 secondes pour enregistrer le retour progressif à la ligne de base. 4 séquences d'acquisition ont été effectuées pour la même odeur à la même concentration, elles sont séparées d'environ 5 minutes durant lesquelles une séquence dite 'blanc' sans odeurs appliquée est acquise.

## **IV.3. Traitement des résultats d'imagerie optique**

### **IV.3.1. Obtention des cartes d'activation**

Les cartes d'activation brutes sont obtenues en soustrayant l'image moyenne des images obtenues dans la période témoin à l'image moyenne des images obtenues dans la période stimulation (figure IV.2). Le résultat est ensuite divisé par l'image moyenne des images témoins (signal calculé en % de variation de réflectance) et les pixels regroupés 2 par 2 (binning 2\*2). Le rapport signal sur bruit est amélioré en moyennant les cartes d'activation obtenues sur les 4 essais pour chaque concentration d'odeur. Nous n'avons pas eu recours ici au filtrage des signaux par des filtres passe-bande tels que décrits par Meister & Bonhoeffer (2001) qui distinguaient deux composantes du signal intrinsèque : une composante diffuse (signal à basse fréquence) qui serait due à l'activité vasculaire globale et une composante plus focale (signal à haute fréquence) qui serait due à de la diffusion de la lumière liée à l'activité cellulaire (gonflement cellulaire, mouvements de membranes voir la section I.1.1.2). Le signal que nous présentons dans ce manuscrit et dans nos articles est global, et incorpore tout le signal des zones d'activité bulbaire induites par les odeurs.



**Figure IV.2. Schéma présentant le protocole de stimulation et l'obtention des cartes olfactives en imagerie optique.** La carte moyenne de la stimulation (bordure rouge) est soustraite de celle obtenue pendant la période témoin (bordure bleue). Les zones qui absorbent plus de lumière pendant la période stimulation/activation apparaissent en noir. Elles représentent des zones correspondantes à des glomérules activés (Meister & Bonhoeffer, 2001 ; Pain et al., 2011).

### IV.3.2. Décours temporels des signaux optiques

Les variations d'absorption au cours du temps dans une région d'intérêt (ROI) donnée sont exprimées en pourcentage de ligne de base qui est notre référence. Une ROI correspondant à la zone activée est visuellement sélectionnée sur une carte d'activation et la valeur moyenne des pixels de cette zone est calculée pour chaque image (toutes les 200 ms). Elle est ensuite divisée par la valeur moyenne des pixels de cette même ROI durant les 5 secondes de témoin. Afin de diminuer le bruit physiologique dû aux mouvements respiratoires et aux effets mécaniques d'origine cardiovasculaire, nous avons effectué le même calcul pour une ROI témoin qui comprend le BO entier qui est également soumis à ce type d'artefacts. Nous avons alors soustrait les valeurs de la ROI activée de celles de la ROI témoin ce qui a eu pour effet de lisser les courbes notamment en se dégageant des oscillations respiratoires d'amplitude élevée par rapport au signal optique lié à l'activation.

## V. Etude des effets du jeûne, de la leptine et du THC sur le codage temporel dans le BO

### V.1. Dispositif expérimental

Le dispositif d'électrophysiologie extracellulaire est semblable à ceux utilisés classiquement dans d'autres laboratoires et les enregistrements sont réalisés dans une cage de Faraday. L'animal est placé dans un appareil stéréotaxique adapté au rat et à la souris (Narishige, USA). Les enregistrements sont

effectués grâce à une électrode de 125  $\mu\text{m}$  de diamètre recouverte d'un isolant (Phymep, Paris, France). Les signaux détectés par l'électrode sont acquis entre 0.1 et 1000 Hz à la fréquence d'échantillonnage de 2000 Hz et amplifiés 500 fois (P511 AC amplifieur, Astro-med, France). Une interface (Digitizer 1401 MK II, Cambridge Electronic Design) convertit les données de l'amplificateur en données binaire et les transmet à un ordinateur. Les enregistrements sont visualisés et stockés à l'aide du logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design). Les données ainsi stockées sont intégrées dans une base de données MySQL grâce au logiciel OpenElectrophy (<http://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy>) développé par Samuel Garcia au Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CNRS-UMR-5292, INSERM U1028), logiciel que nous avons utilisé pour le traitement des données acquises (Garcia et Forcaud-Trocmé, 2009).

Pour ce qui est du dispositif de stimulation odorante, nous utilisons le même olfactomètre que celui précédemment décrit pour l'imagerie. Il est doté d'un boîtier de commande programmable permettant de régler l'ouverture des vannes à des temps précis. L'olfactomètre est programmé pour effectuer les protocoles décrits dans la partie stimulation V.2.3 plus bas dans ce chapitre.

## **V.2. Protocole expérimental d'électrophysiologie**

### **V.2.1. Anesthésie des rats et des souris**

Pour les rats, nous avons utilisé le même mélange d'anesthésique que celui utilisé en imagerie (kétamine et de médétomidine respectivement à 60 mg et 0.4 mg/kg). Cependant, le mélange d'anesthésiques utilisé pour les rats n'est pas adaptable à la souris parce que la médétomidine induit de forts taux de mortalité dans les expériences précédentes au laboratoire réalisées durant la thèse de Barbara L'Heureux (2006-2009). Nous avons alors choisi d'utiliser la xylazine, un autre antagoniste des récepteurs alpha-2-adrénergique, moins spécifique mais qui assure une meilleure survie des souris. Le protocole d'anesthésie souris validé au laboratoire dans le cadre de la thèse en cours de Romain Chery consiste à administrer un mélange de kétamine (Imalgène 500, Merial, France) à 100 mg/kg et de Xylazine (Rompun, Bayer, France) à 10 mg/kg. Ces doses sont obtenues en mélangeant 2 ml de kétamine, 0,5 ml de Xylazine complété à 10 ml avec du sérum physiologique NaCl 0,9%. Le volume est complété à 10 ml avec du sérum physiologique NaCl à 0,9%. Les souris sont d'abord anesthésiées à l'isoflurane avant de subir une injection i.p. du mélange de 0,1 ml/10 g de poids. Après vérification de l'absence de réflexes, les souris sont placées dans un appareil stéréotaxique et maintenues à 37°C grâce à une couverture chauffante. Il est à remarquer que, contrairement aux rats, les souris ne tiennent bien anesthésiées que pendant 2 heures et supportent mal les réinjections. Cette donnée n'est jamais mentionnée par les articles de la littérature, mais tous les laboratoires travaillant sur ce type de protocole long, avec enregistrement de signaux fonctionnels, sont confrontés à ce type de problème au quotidien.

### **V.2.2. Chirurgie**

Une fois les animaux anesthésiés, la peau au-dessus du crâne est incisée et écartée. A l'aide d'une fraiseuse, un trou est creusé en respectant les coordonnées stéréotaxiques classiquement utilisées au laboratoire et dans la littérature : 8,5 mm en avant du Bregma, 1,5 mm en latéral pour les rats, et 4,2 mm en avant du Bregma, 0,8 mm en latéral pour les souris. Chez le rat, un trou est creusé en arrière du crâne, du côté controlatéral. Une vis est fixée dans ce trou et rattachée à un fil lui-même relié à la référence du système d'amplification. Dans le cas des souris, la référence est fixée sur une des pinces qui écartent la peau du crâne.

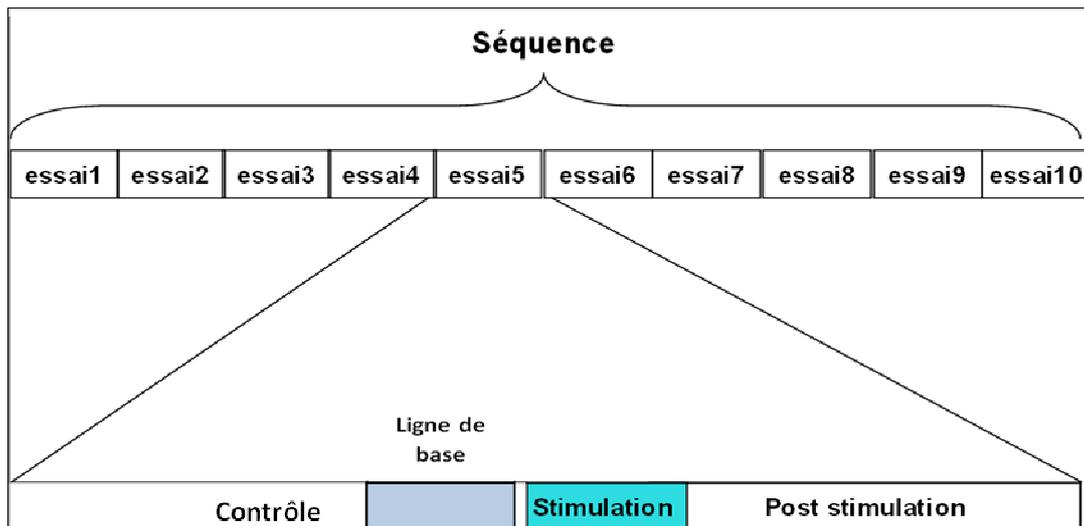
### **V.2.3. Stimulations olfactives**

#### ***V.2.3.1. Stimulation pour l'étude de l'effet du jeûne sur le codage temporel***

Afin de détecter d'éventuelles différences de seuil d'activation entre les deux lots de rats (à jeun et nourris), nous les avons stimulés avec plusieurs concentrations d'odeur alimentaire et d'odeur non alimentaire. Comme pour le protocole d'imagerie optique, les différentes concentrations sont obtenues par dilution des solutions pures dans de l'huile minérale (Fulka, France). L'odeur alimentaire a été utilisée à trois dilutions différentes : 1%, 2% et 5%, tandis que l'odeur non alimentaire a été utilisée à 0,1%, 0,5% et 1%.

Les séquences d'acquisition sont constituées de dix d'essais, chaque essai comme le montre la figure IV.3 est divisée en 3 périodes. La première période sert de contrôle, elle dure 30 secondes pendant lesquelles nous enregistrons les oscillations du potentiel de champ local LFP alors que l'air pur est délivré. Elle est suivie d'une période de 5 secondes de stimulation pendant laquelle l'odeur à une concentration choisie est délivrée. Puis à la fin de l'essai, l'air pur est délivré de nouveau pendant la période post-stimulation pour enregistrer le retour à la ligne de base et permettre un rinçage des molécules odorantes qui resteraient dans l'air circulant autour du museau. Toutes les études sur le LFP ont été faites par des protocoles se basant sur le même principe de séquences.

Chaque essai est reproduit 10 fois afin d'acquérir pour chaque odeur et chaque animal 10 mesures de la réponse à l'odeur, ce qui constitue une séquence d'acquisition. Pour chaque séquence, un seul papier filtre contenant 50 µl de l'un des odorants à une concentration donnée est utilisé. Les séquences d'acquisition se font de la plus faible à la plus forte concentration afin d'éviter une pollution des tubes et/ou la saturation du système olfactif. Notons que les essais sont reproductibles au sein d'une même séquence d'acquisition et des séquences d'acquisition randomisées n'induisent pas de différence significative dans les réponses si un temps de repos suffisant est laissé à l'animal (environ 10 minutes après chaque séquence)



**Figure IV.3. Schéma du protocole de stimulation olfactive dans les expériences électrophysiologiques.** Chaque séquence de stimulation comporte 10 essais, et chaque essai est constitué de trois périodes : une période contrôle de 30 secondes, une période de stimulation odorante de 5 secondes et enfin une période post-stimulation de 25 secondes.

#### ***V.2.3.2. Stimulation pour l'étude de l'effet de la leptine sur le codage temporel***

Pour l'étude des effets de la leptine sur les réponses oscillatoires, nous avons effectué une stimulation contrôle avec l'arôme d'amande alimentaire 2% sur des rats à jeun. Le choix du statut nutritionnel découle du fait que la leptine mime un état nourri, donc une injection de leptine devrait pouvoir modifier la réponse des animaux à jeun et la mettre au même niveau que celle des animaux nourris.

La leptine ayant une action très rapide sur les canaux ioniques et l'activité électrique cellulaire (Spanswick et al., 1997), nous avons suivi son effet immédiatement après injection. La leptine étant injectée dans un volume comparable à celui de l'anesthésique qui fait son effet au bout de dix minutes environ, nous avons fait l'hypothèse que ce temps est suffisant pour que la leptine agisse sur le cerveau à partir de ce temps là. Nous avons donc mesuré les réponses aux odeurs dix minutes après injection. Nous avons effectué des séquences d'acquisition composées de trois essais pour pouvoir suivre l'effet de l'injection sur les réponses oscillatoires toutes les dix minutes sans saturer le système. Nous avons donc appliqué trois séquences d'acquisition respectivement à dix, vingt et trente minutes après l'injection de leptine.

Nous avons testé les effets de la leptine (Sigma Aldrich, St Louis, USA) injectée en i.p. sur les réponses oscillatoires aux odeurs chez les animaux à jeun (la leptine mime pharmacologiquement l'état nourri). La leptine a été diluée dans du sérum physiologique et injectée à 1mg/kg dans une solution d'un volume équivalent à 0,3 ml/ 50g de poids. Les animaux témoins ont été injectés avec les mêmes volumes de sérum physiologique.

### ***V.2.3.3. Stimulation pour l'étude de l'effet du THC sur le codage temporel chez la souris***

Nous avons étudié les effets du THC chez la souris conformément au modèle de nos collaborateurs bordelais. Ils nous a été indiqué que la prise alimentaire augmente 30 minutes après injection i.p. de THC et se poursuit pendant 4 heures. Dans notre cas, nous avons tenu également compte des limites de notre méthode d'enregistrement chez l'animal anesthésié qui ne nous permet pas de garder des souris pendant une si longue durée. Nous avons élaboré un protocole qui permet de suivre l'évolution des réponses oscillatoires au cours du temps à court et moyen terme après une injection de THC.

Le protocole comprend quatre séquences, comprenant dix essais chacun constitué des trois périodes décrites précédemment (figure IV.3). Une première séquence est effectuée afin de mesurer la réponse oscillatoire à la stimulation odorante avant toute injection. La stimulation odorante se fait en déposant dans un flacon de l'olfactomètre un papier filtre contenant 50 µl d'une solution d'hexanal diluée à 5% afin de s'assurer d'une réponse à l'odeur.

Cinq minutes après la première séquence d'acquisition, une dose de THC ou de solution contrôle est administrée par injection i.p. dans un volume semblable à celui de l'anesthésique (0,1 ml/10 g de poids). Comme pour la leptine, nous nous sommes basés sur la latence de l'effet de l'anesthésique injecté en i.p. dans les mêmes conditions. Nous avons donc testé la réponse oscillatoire à une séquence de stimulations odorantes cinq minutes après l'injection. Afin de suivre l'évolution des réponses avec un maximum de résolution temporelle, nous avons laissé les animaux se reposer pendant cinq minutes puis nous les avons stimulés à nouveau avec une autre séquence vingt minutes après l'injection. Afin d'observer d'éventuels changements tardifs qui ne seraient pas de l'ordre de quelques minutes, nous avons laissé les animaux se reposer plus de temps (dix minutes). Ceci a pour avantage de minimiser la saturation du système suite à de fortes stimulations successives, saturation inévitable et observée chez les animaux contrôles (voir la partie V.3). Nous avons donc restimulé quarante minutes et une heure après injection. Nous avons choisi de ne pas présenter la dernière séquence d'acquisition compte tenu de la baisse notable de la qualité du signal après une heure et demie d'anesthésie.

Nous avons injecté les souris en i.p. avec une solution de THC (Sigma Aldrich-Fulka, (-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol 1mg/ml in ethanol, France). La solution mère est diluée dans de l'eau distillée de manière à avoir une concentration d'éthanol à 2%. Un volume de 0,1 ml/10 g de poids est correspondant à une dose de THC de 1mg/kg de poids. Les animaux témoins ont été injectés avec le même volume (0,1ml/10g) d'une solution d'éthanol à 2% dilué dans de l'eau distillée (Bellocchio et al., 2009).

### **V.3. Traitement des résultats d'électrophysiologie**

Les signaux bruts (figure IV.4A) enregistrés sont visualisés et traités sous OpenElectrophy. Ils sont dans un premier temps triés visuellement, tout signal comportant un artefact est éliminé. Nous avons concentré notre analyse sur les réponses oscillatoires obtenues en présence d'odeur.

Le potentiel de champ local tel que nous l'enregistrons dans le BO est un signal complexe composé d'oscillations à différentes fréquences et qui apparaissent de façon transitoire. Pour analyser ce type de signal, il est nécessaire de pouvoir dissocier de façon précise les composantes fréquentielles et temporelles. L'analyse par transformée temps-fréquence avec les ondelettes de Morlet (Tallon-Baudry & Bertrand, 1999) est particulièrement adaptée et a été validée pour le LFP dans le BO (Ravel et al., 2003).

Afin de déterminer les bandes de fréquence d'intérêt, nous avons utilisé des représentations temps-fréquence du signal (figure IV.4C) qui permettent de visualiser les caractéristiques des oscillations sans a priori,

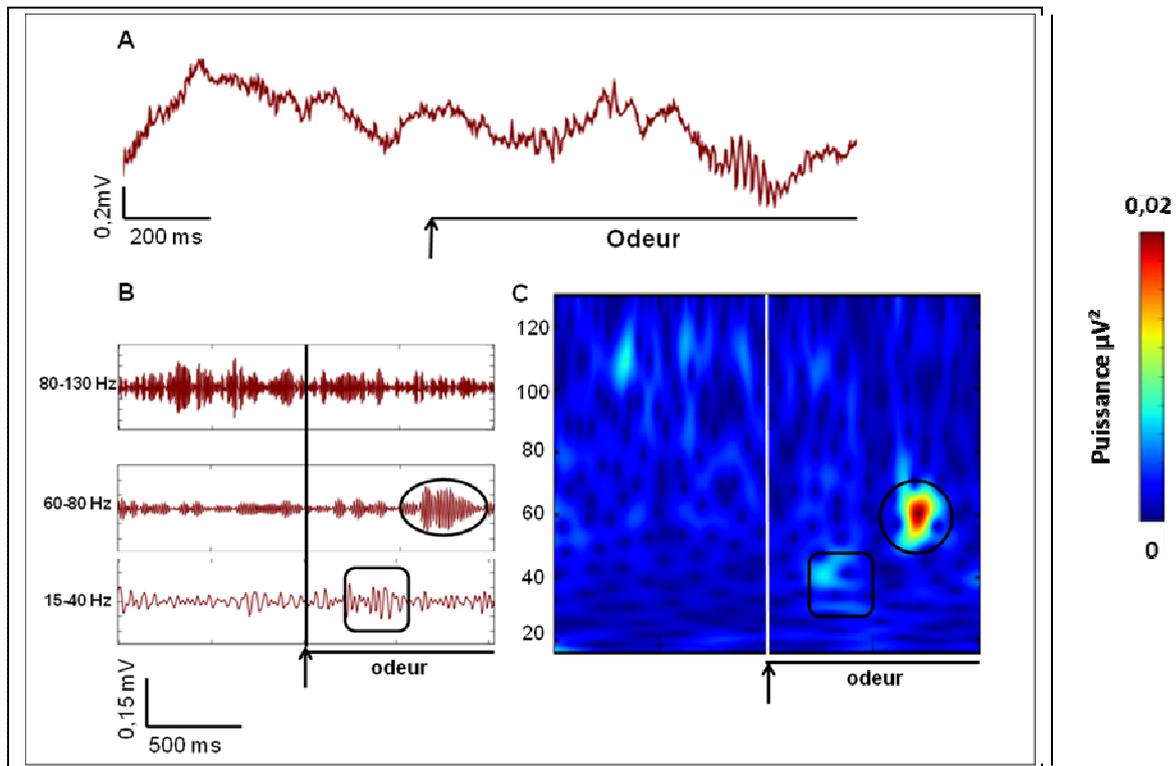
#### **V.3.1. Les cartes temps-fréquence**

En utilisant OpenElectrophy et Python, nous avons représenté les cartes temps-fréquence pour chaque essai et les cartes temps-fréquence moyenne par séquence (avec une fréquence  $f_{rf} = 1,5$  et des résolutions temporelles de 3 ms (300Hz) et à une résolution de fréquence de l'ordre de 1 Hz. Ces cartes permettent de visualiser au cours du temps la puissance des oscillations sur tout le spectre de fréquence d'intérêt (figure IV.4C).

#### **V.3.2. Calcul des puissances des oscillations**

Afin de pouvoir comparer les réponses aux odeurs et leur variation dans nos différents protocoles, nous calculons grâce à un script écrit sous Python la puissance moyenne des oscillations (moyenne  $\pm$  2 SEM) dans des pavés temps-fréquences parfaitement définis. Après visualisation des données, nous avons choisi pour l'analyse les bandes de fréquences suivantes : 15-40Hz (bêta) et 60-130Hz (gamma). De plus, comme le montre la figure IV.4, le spectre gamma doit être décomposé en deux parties car deux phénomènes semblent s'y produire : la puissance des oscillations semble augmenter pendant la stimulation odorante entre 60-80 Hz (bas gamma) alors qu'elle semble diminuer dans la bande 80-130 Hz (haut gamma). Nous avons donc comparé les trois bandes différentes avant et pendant odeur chez chaque animal. Nous calculons la puissance de chacune de ces bandes, à savoir 15-40 Hz, 60-80 Hz et 80-130Hz pendant les 5 secondes de la stimulation odorante. Nous comparons ces résultats à la puissance des oscillations pendant 5 secondes avant la stimulation, allant de la seconde -6 à la seconde -1 (notée baseline dans la figure IV.3).

Les tests statistiques sont effectués par une ANOVA pour mesures répétées et sont appliqués à toutes les électrodes. Les valeurs des puissances sont normalisées par rapport à la puissance moyenne du spectre total (5-130 Hz) afin d'éviter les variations entre rats et de normaliser les résultats.



**Figure IV.4. Analyse des données et traitement graphique du signal LFP.** A. Signal brut. B Signal filtré dans trois bandes principales. 15-40 Hz pour la bande beta qui augmente en réponse à l'odeur (carré) et deux bandes gamma selon la réponse à l'odeur : une bande entre 60-80 Hz qui augmente de puissance suite à la stimulation odorante (cercle) et une bande entre 80-130 Hz qui diminue en réponse à la stimulation odorante visible sur toute la période d'application de l'odeur (barre noire : odeur). C. Carte temps-fréquence. Le temps est représenté en abscisse. Les fréquences et le code couleur représentent la puissance des oscillations en ordonnée: dans le signal filtré en réponse à l'odeur, l'augmentation de la puissance de l'oscillation observée dans le bas gamma (60-80 Hz) est représentée par le cercle alors que l'augmentation de la fréquence beta que nous observons est représentée par le carré (15-40Hz).

## VI. Etude des effets du jeûne sur l'expression de protéines astrocytaires (GFAP, Connexine 30, GLAST, GLT1)

Pour comprendre les mécanismes pouvant sous-tendre les variations observées dans la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le BO, nous nous sommes intéressés aux protéines astrocytaires au laboratoire NOEMI. En effet, les résultats publiés par l'équipe MIO d'IMNC ont montré l'importance de l'activité de recapture du glutamate par les astrocytes dans i) l'enclenchement des signaux optiques

intrinsèques à la surface du BO (Gurden et al., 2006) : le blocage pharmacologique de la recapture glutamatergique par du TBOA inhibe le signal optique ; ii) l'activité oscillatoire dans les couches profondes est modifiée chez des souris déficientes en transporteur astrocytaire GLAST (Martin et al., 2011 soumis). Sur la base de ces résultats, nous avons commencé l'étude de l'évolution de protéines astrocytaires d'intérêt telles que la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), marqueur classique du cytosquelette des astrocytes, et la connexine 30 constituant les jonctions communicantes des astrocytes glomérulaires. Afin d'étudier ces protéines, nous avons eu recours à deux principales méthodes d'immunohistochimie et de western blot. Pour étudier la distribution et la quantification de ces protéines astrocytaires, nous avons utilisé la liste d'anticorps primaires présentés dans le tableau IV.1.

| Anticorps           | Référence            | Espèce | Concentration pour western blot | Concentration pour immunohistochimie |
|---------------------|----------------------|--------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Anti-GFAP           | Santa Cruz (Sc-6170) | Chèvre | 1/1000                          | 1/1000 - 1/500 - 1/100               |
| Anti-connexine30    | Invitrogen (712200)  | Lapin  | 1/100                           | 1/100                                |
| Anti-chèvre-biotine | Kit Vector           | Âne    | 1/500                           | 1/1000                               |
| Anti-lapin-biotine  | Kit Vector           | Chèvre |                                 | 1/1000                               |
| Anti-cobaye         | Kit Vector           | Chèvre |                                 | 1/400                                |
| Anti-souris-HRP     |                      | mouton | 1/2000                          |                                      |
| Anti-chèvre-HRP     |                      | lapin  | 1/15000                         |                                      |

**Tableau IV.1. Liste des anticorps pour les différentes protéines cibles.**

## **VI.1. Protocole d'immunohistochimie**

### **VI.1.1. Perfusion**

Des rats Long Evans à jeun et nourris *ad libitum* ont été anesthésiés suivant le protocole rat décrit précédemment. Ils ont été ensuite disséqués de manière à exposer leur cœur. Une sonde intracardiaque a été mise en place et les rats sont perfusés avec 100 ml de sérum physiologique (NaCl 0,9%) hépariné contenant 0,1% sodium nitrite, puis par 200 ml de paraformaldéhyde à 4%, puis les têtes ont été disséquées, les cerveaux et le bloc MO-BO extraits et mis dans une solution de PFA à 4% pendant 4h puis dans une solution de sucre 30% pendant 24-48 heures.

### **VI.1.2. Coupes et montages**

Les blocs MO-BO ont été ensuite coupés au cryostat, des sections coronales de 14 µm ont été effectuées dans le sens antéropostérieur du cerveau de manière à avoir la MO et le BO sur la même coupe. Les coupes ainsi réalisées ont été montées sur des lames de microscopie Superfrost plus (Thermo Scientific) et congelées à moins 80°C pour utilisation ultérieure.

### **VI.1.3. Marquages immunohistochimiques**

Les coupes sorties du congélateur ont été laissées à sécher pendant 2h. Elles ont été ensuite rincées dans une solution tampon de Phosphate Buffered Saline (PBS) 3x10 minutes. Pour les protocoles avec une révélation à la DiAminoBenzidine (DAB), les coupes ont été incubées dans de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1% en PBS pendant 30 minutes. Pour les protocoles avec une révélation en fluorescence, les coupes ont été incubées dans une solution de PBS/Glycine 0,1M pendant 30 minutes. Après un rinçage en PBS, une incubation de 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS/triton X-100 (perméabilisant de membranes) 0,25%/ BSA2% contenant 5% de sérum de l'animal chez qui a été produit l'anticorps secondaire a permis de saturer les sites de marquage non spécifiques. L'anticorps primaire dilué à une concentration optimale (voir tableau IV.1) dans une solution PBS/BSA (Bovin Serum Albumin) 0,2 %/ Triton X-100 0,25% a été laissé en incubation pendant 48 à 72h à 4°C. Une lame contrôle est réalisée en remplaçant l'anticorps primaire par une dilution équivalente du sérum non immun de la même espèce.

Les lames ont ensuite rincées au PBS/lait écrémé à 0,1% 4x10 minutes. Elles ont été incubées pendant 2h avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS/BSA 0,1%/ triton X-100 à 0,25%. Les anticorps secondaires sont dirigés contre les protéines de l'animal chez qui a été produit l'anticorps primaire (voir tableau IV.1.).

Les protocoles de révélation en DAB et en fluorescence nécessitent deux traitements différents :

i) Pour les protocoles de révélation en DAB, les lames sont rincées dans du PBS/lait 0,1% 3x15 minutes puis incubées pendant 1h dans le complexe AB (Vectastain, Vector) (1 goutte de la solution A (Avidine), 1 goutte de la solution B (Biotine) et dilués dans 5 ml de PBS sous agitation 1h à l'avance). Les lames sorties du complexe AB sont rincées 3x15 minutes dans du PBS. La DAB (10 µl de la solution mère dans 5ml de PBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%) est alors ajoutée. Dès l'observation de la réaction d'oxydation, les lames sont rincées 3x15 minutes dans du PBS puis deshydratées successivement dans des bains d'éthanol à 2 x 30%, 2x 70%, 2x100% puis dans du toluène 100% (2 fois). Elles sont montées à la fin avec une solution de montage Vectashield.

ii) Pour les protocoles de révélation en fluorescence, les lames sont rincées 3 x 15 minutes dans du PBS, puis 1x 15 minute dans une solution de bicarbonate 0,05 M. Une solution de FITC/TRITC diluée à 1/1000 dans du bicarbonate est alors ajoutée. Après 1h d'incubation, les lames sont rincées pendant 15 minutes dans une solution de bicarbonate puis 2x 15 minutes dans du PBS. Les lames sont ensuite montées avec un complexe vectashield contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et stockées à l'obscurité à 4°C pour observation ultérieure.

Le DAPI est une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN des cellules et permet de marquer leurs noyaux. Ce marquage nous a donc permis de visualiser toutes les cellules des différentes couches bulbaires notamment celles des cellules juxtaglomérulaires.

#### **VI.1.4. Traitement des résultats**

Les lames sont observées au microscope optique. Nous déterminons des zones d'intérêt au niveau glomérulaire déterminées grâce au contour des noyaux marqués au DAPI. Cette zone d'intérêt est alors copiée grâce à Image J et nous calculons le rapport surface marquée sur surface globale pour chaque lame (3 lames/ rat).

#### **IV.1.5. Le Western Blot**

##### ***Récupération et dosage des protéines à partir de bulbe olfactifs***

Nous avons utilisé la technique de western blot afin de détecter et quantifier les protéines spécifiques à partir d'extrait ou d'homogénat tissulaire de BO d'animaux à jeun ou nourris (n=5 pour chaque lot). Les protéines totales ont été extraites dans un tampon de solubilisation hypotonique (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% NP-40, cocktail anti-protéases Complete de Roche, 1 mM PMSF). 300µl pour chaque bulbe olfactif ont été ajoutés. Le tissu a été broyé mécaniquement à l'aide de pistons électriques. Les échantillons ont été placés sur une roue à 4°C pendant 30min puis centrifugés à 4°C pendant 30min à 13500 RPM.

Les homogénats protéiques ont été dosés dans les surnageants pour connaître la concentration de chaque échantillon selon la méthode de dosage du BCA à partir de dilutions 1/20<sup>ème</sup>, puis aliquotés à une concentration donnée dans un tampon de charge dénaturant Laemmli 1x final et bouillis 10 min à 100°C avant d'être congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

##### ***Electrophorèse et transfert des protéines***

La migration s'est faite en deux phases, une première sur un gel de concentration à pH 6,8 (stacking gel) qui permet de concentrer les échantillons et une seconde sur gel de séparation à pH 8,8 (running gel) plus concentré en acrylamide 10% qui permet la séparation des protéines. Le système utilisé est Mini-Protean II (Biorad). Après migration 1h30 à 20 mA par gel, le gel a été démoulé et placé au

contact d'une membrane anionique (Hybond-C extra, Amersham Biosciences). Sous l'effet d'un champ électrique un transfert a été réalisé entre ces deux supports durant environ 3H à 180mA dans un bac à glace à 4°C.

Après coloration au Rouge Ponceau à 1% (5min) qui permet de s'assurer que les protéines ont bien été transférées, une saturation des sites de fixation aspécifique de la membrane est réalisée dans une solution de PBS tween contenant 5% de lait pendant une heure à température ambiante. Puis, la membrane est incubée avec un anticorps primaire (voir tableau IV.1) à 4°C pendant une nuit sous un film plastique scellé et sous agitation. Après 4 rinçages de 15 min au PBS- lait écrémé 0,5%, l'anticorps secondaire, couplé à une enzyme, la HRP, est ajouté pour 1h à température ambiante (voir tableau IV. 1). Après 4 rinçages de 15 min dans du PBS, la membrane est alors incubée avec un volume de réactif du kit ECL (Amersham). La membrane est alors placée sous un film plastique et mise en contact avec un film photo en chambre noir pendant un temps variable selon l'importance du signal attendu. Enfin, après lavage et séchage, le blot peut être observé.

## **VI.2. Protocole de biologie moléculaire**

### **VI.2.1. Prélèvement des échantillons**

Des rats à jeun et nourris ad libitum ont été anesthésiés, suivant le protocole décrit en IV.1.1 puis décapités. Le sang a été recueilli pour les dosages plasmatiques (voir section dosages). Les deux hémiculbes sont prélevés ainsi que la MO, et le foie qui sert de tissu de contrôle négatif car il n'exprime pas les protéines astrocytaires que nous avons étudiées. Le bloc de BO est prélevé et congelé dans l'azote liquide en attendant de préparer les ARNs.

### **VI.2.2. Dosages sanguins**

Les dosages sanguins sont réalisés à l'aide de kits de dosage par réaction colorimétrique comme pour le glucose (GAHK-20, Glucose assay kit, Sigma), des triglycérides (TG150 triglycerides enzymatique kit PAP150, Biomerieux) ou par tests Elisa (RIA leptin et insulín, Linco) dans les conditions préconisées par le fournisseur.

### **VI.2.3. Préparation des ARNs**

Les ARN ont été extraits à partir de MO de rat grâce à la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987), basée sur une extraction phénolique en conditions dénaturantes.

Après vérification de la quantité (spectrophotométrie sur Nanodrop) et de la qualité (électrophorèse sur gel agarose) des échantillons obtenus, 4 microgrammes d'ARN totaux ont été rétrotranscrits à l'aide du kit "Superscript TM First-Strand Synthesis System for RTPCR" (Invitrogen) conduisant à la synthèse d'ADNc catalysée par 50 unités de "Superscript II" (Invitrogen), en présence d'hexamères de

séquence aléatoire .

Les cDNA synthétisés ont été ensuite quantifiés par dosage Nanodrop avant d'être dilués pour l'analyse en PCR quantitative en temps réel.

#### **VI.2.4. PCR quantitatives en temps réel (PCRq)**

Cette technique, qui sert à quantifier les transcrits de gènes d'intérêt- est basée sur une amplification exponentielle et sélective de séquences d'ADNc obtenues après rétrotranscription des échantillons d'ARNs, et ce, en temps réel, grâce à une mesure de la cinétique d'incorporation d'un marqueur fluorescent (SybrGreen) dans les produits d'amplification d'ADN au cours de chaque cycle. En résumé, le niveau d'incorporation de ce marqueur fluorescent est corrélé à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés pour notre part à la quantification des ARNm des récepteurs de l'insuline et de la leptine sur des échantillons de BO de rats à jeun et de rats nourris.

#### **VI.2.5. Choix des couples d'amorces et validation de leur spécificité**

Les gènes codant pour les récepteurs d'intérêt présentent de fortes homologues de séquence entre eux, car ils résultent d'épissage différentiels du même gène résultant en une forme courte et longue pour chacun des récepteurs insuline (IR-A et IR-B) et leptine (ObRa et ObRb).

Nos amorces ont été choisies pour être spécifiques de chacun des transcrits (vérifié sur Blast) et de manière à avoir des chevauchements entre deux exons, ce qui permet aussi d'exclure des amplifications d'ADN contaminants (tableau IV.2) grâce au logiciel Primer Express. La validation de leur spécificité en PCRq a été faite grâce à un test de dissociation thermique réalisé à la fin de chaque réaction. La spécificité des amorces est démontrée par l'obtention d'un seul pic de dissociation, alors que la présence d'ADN contaminants se traduit par l'apparition de courbes de dissociations surnuméraires.

| Gène     | Numéro d'accèsion           | Amorces  | Taille |
|----------|-----------------------------|--|--------|
| Ob-Ra    | <a href="#">AF304191.1</a>  | F5'TTTCCTCAAAGAGAGCGGACAC3'<br>R5'AGGTTGGTAGATTGGATTCATCTGT3'  | 70     |
| Ob-Rb    | <a href="#">AF287268.1</a>  | F5'AAAGCCTGAAACATTTGAGCATC3'<br>R5'CCAGAAGAAGAGGACCAAATATCAC3' | 70     |
| IR-A     | <a href="#">NM_017071.2</a> | F5'CAGGCCATCCCGAAAGC3'<br>R5'GGTGTAGTGGCTGTCACATTGC3'          | 60     |
| IR-B     | <a href="#">NM_017071.2</a> | F5'TTACCTGCACAACGTGGTTTTT3'<br>R5'CTCAGCACCATTGCCTGAAG3'       | 58     |
| B-actine | <a href="#">NM_031144.2</a> | F5'GACCCAGATCATGTTTGAGACCTT3'<br>R5'CACAGCCTGGATGGCTACGT3'     | 61     |

**Tableau IV.2. Séquences des amorces utilisées pour la PCRq.**

Le gène de référence codant pour la  $\alpha$ -actine a été validé lors d'une étude précédente dans le cadre de la thèse de Karine Badonnel dirigée par Christine Baly au laboratoire NOeMI où il a été montré que le niveau d'expression de l'ARNm codant pour cette protéine ne variait pas en fonction du statut nutritionnel pour des jeûnes de 24 à 72 heures. Les couples d'amorces utilisés dans cette étude ont également fait l'objets de validations préalables (Baly et al., 2007 ; Lacroix et al., 2008).

#### **VI.2.6. Mesure d'expression en série**

Les réactions d'amplification sont réalisées en plaques 96 puits à l'aide du thermocycleur AbiPrism 7900 HT (Applied Biosystems) selon les conditions préconisées par le fabriquant.

Chaque puit contient 120 ng d'ADNc matrice, 300 nM de chaque amorce (forward et reverse), 10  $\mu$ l de mélange réactionnel de PCR contenant l'enzyme, les nucléotides de tous les coenzymes nécessaires à la réaction de PCR dans un volume final de 20  $\mu$ l. Chaque mesure d'expression d'un transcrite est faite en triplicat pour chaque échantillon et normalisée par l'expression du gène de référence.

### **VI.2.7. Analyse des données**

Dans les premiers cycles de PCR, la fluorescence reste faible, en dessous des seuils détectables. Le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence devient détectable correspond au seuil de détection du signal Ct pour (Cycle threshold). Plus il y a d'ADNc correspondant à la cible, plus delà valeur de Ct est faible. Les résultats sont exprimés en  $\Delta Ct = Ct \text{ du gène cyble} - Ct \text{ du gène référence}$ .

# **Chapitre V – Résultats**

**I. Etude des effets du jeûne sur le codage spatiotemporel dans le BO**

**II. Etude de l'impact du jeûne sur les protéines astrocytaires du BO : une étude préliminaire**

**III. Etude du rôle des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1 sur le codage temporel des odeurs**

Dans cette section, nous décrivons les résultats de nos études menées suivant les protocoles expérimentaux détaillés dans le chapitre IV « matériel et méthodes ».

Nous montrons, grâce à la principale étude de cette thèse, une plasticité dans l'activation du BO dépendante du statut nutritionnel : les seuils d'activation spatiotemporelle sont plus bas chez les animaux mis à jeun pendant 17 heures comparés aux rats nourris. Nous avons également voulu comprendre quels mécanismes pouvaient induire de tels changements. Nous nous sommes intéressés pour cela aux effets du jeûne sur la transcription des récepteurs à la leptine et l'insuline, récepteurs répondant à des hormones clés impliquées dans la prise alimentaire. Nous montrons que le jeûne de 17 heures ne s'accompagne pas de changements de ces transcriptions. De plus, l'injection i.p. de leptine n'affecte pas la réponse oscillatoire à l'odeur chez les rats à jeun anesthésiés. La leptine à elle seule ne pouvant donc expliquer la plasticité du BO en cas de jeûne, nous nous intéressons actuellement à l'implication locale des astrocytes comme médiateurs cellulaires potentiels de cette plasticité. Nous étudions les variations de molécules telles que la GFAP ou la connexine 30 grâce à des approches techniques de biologie moléculaire actuelles Enfin, nous montrons l'influence du THC, un agoniste des récepteurs CB1, sur les réponses oscillatoires aux odeurs : ce tout nouveau résultat dans le domaine de l'olfaction complète l'implication du BO dans les processus de prise alimentaire.

## **I. Étude des effets du jeûne sur le codage spatiotemporel dans le BO de rat**

### **I.1. Effets du jeûne sur la physiologie des rats**

Alors que la plupart des études au laboratoire NOeMI ont été effectuées sur des animaux ayant subi 48 heures de jeûne (Baly et al., 2007 ; Lacroix et al., 2008 ; Prud'Homme et al., 2009), dans cette étude nous avons réduit la durée du jeûne car nous l'avons jugé trop stressant pour nos protocoles d'imagerie et d'électrophysiologie. Nous avons opté pour un jeûne plus court de 17h en nous appuyant sur des nouveaux travaux non publiés de NOeMI, qui indiquent que les réponses olfactives de la MO mesurées en électro-olfactogramme sont déjà modifiées par ce type de jeûne. De plus, les animaux soumis à 17h de restriction alimentaire sont plus calmes et dociles comparés aux animaux privés pendant 48h. Nous nous sommes alors interrogés sur le profil métabolique et hormonal de ces rats suite à une restriction alimentaire plus courte.

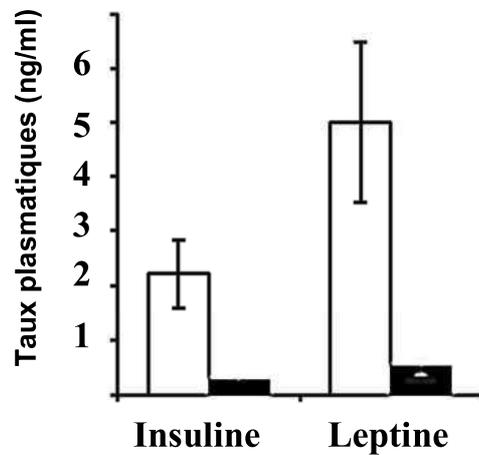
Nous avons vérifié l'effet du jeûne de 17h sur les rats en mesurant plusieurs paramètres métaboliques circulants. Tout d'abord, les rats perdent systématiquement de 2 à 5% de leur poids corporel au bout des 17h de restriction. La glycémie mesurée en début d'expérimentation chez des rats nourris ad libitum se trouve autour de 1,8 mg/ml alors que celle des rats à jeun tombe aux environs de 1,2 mg/ml.

Nous avons aussi mesuré les taux plasmatiques de la leptine et de l'insuline, deux hormones circulantes cruciales pour la signalisation du statut nutritionnel. Après un jeûne de 17h, ces taux atteignent des niveaux comparables à ceux induits par un jeûne de 48h (Baly et al., 2006 ; Lacroix et al., 2009). En effet, le taux d'insuline est réduit d'un facteur dix et passe de  $2,22 \pm 0,6$  ng/ml chez les rats nourris (n=5) à  $0,28 \pm 0,03$  ng/ml chez les rats à jeun (n=5). Les taux de leptine connaissent la même baisse drastique passant de  $5,01 \pm 0,48$  ng/ml chez les rats nourris à  $0,53 \pm 0,14$  ng/ml chez les rats à jeun (figure V.1).

Ainsi le statut nutritionnel des animaux est clairement affecté par la mise à jeun de 17h à un niveau comparable d'une mise à jeun de 48h.

### **I.2. Reconnaissance de l'odeur alimentaire**

Un papier filtre imbibé d'odeur alimentaire était placé dans un tube Eppendorf troué et présenté aux animaux : la totalité des rats ont essayé d'ouvrir le tube ou de le ronger de manière quasiment frénétique. Quand nous avons placé une odeur d'arôme d'orange (Vahiné commercial) dans le tube, la curiosité des rats était manifeste mais ils ne présentaient jamais de comportement d'excitation et de morsure du tube.



**Figure V.1. Histogrammes représentant les taux plasmatiques d'insuline et de leptine chez des rats nourris ad libitum (barres blanches) et des rats mis à jeun pendant 17 h (barres noires).** Comme attendu, les taux d'insuline sont plus élevés chez les rats nourris  $2,22 \pm 0,6$  ng/ml (n=5) que chez les rats à jeun  $0,28 \pm 0,03$  ng/ml (n=5). Les taux plasmatiques de leptine suivent aussi cette baisse suite au jeûne passant de  $5,01 \pm 0,48$  ng/ml chez les animaux nourris à  $0,53 \pm 0,14$  ng/ml chez les animaux à jeun.

### I.3. Effets du jeûne sur les cartes spatiales

Nous avons étudié la représentation spatiale d'une odeur alimentaire et d'une odeur non-alimentaire par imagerie optique intrinsèque chez les deux lots de rats. Ces expériences ont été réalisées au laboratoire IMNC.

#### I.3.1. Effets du jeûne sur les cartes spatiales induites par une odeur alimentaire

Dans des expériences préliminaires, nous avons testé les cartes spatiales induites par du beurre de cacahuètes (peanut butter Skippy, pâte d'arachide Dekatine). Les zones activées étaient différentes d'un animal à l'autre ce qui nous a conduit à renoncer à l'utilisation de cette odeur. Nous avons par la suite opté pour l'odeur d'arôme d'amande alimentaire Vahiné. Nous avons testé deux concentrations (2% et 5%) pour cette odeur.

De façon très intéressante, les animaux à jeun présentent toujours un meilleur rapport signal sur bruit que les rats nourris. L'activation est plus focale, plus résolue et par conséquent visualisée plus facilement sur les cartes optiques des rats à jeun que celles des rats nourris ou l'activation est plus diffuse.

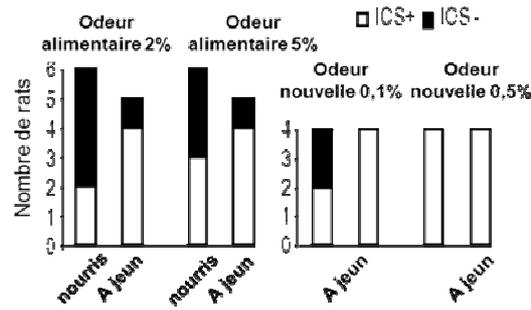
Pour quantifier cette réponse, nous avons dans un premier temps estimé le nombre de rats à jeun et nourris répondant en imagerie à l'odeur alimentaire. Les animaux qui répondent par un signal optique détectable marquant des zones d'activation bulbaire sont notés IOS+ (Intrinsic Optical Signal) tandis que ceux qui ne répondent pas à la stimulation sont notés IOS- (figure V.2A). Pour la faible concentration d'odeur alimentaire à 2%, nous avons observé davantage d'animaux IOS+ (4/5) chez les rats à jeun que chez les rats nourris (2/6). En augmentant la concentration à 5%, nous avons obtenu davantage de rats IOS+ chez les animaux nourris (3/6) qu'en réponse à la concentration de 2%, toutefois ceux-ci restent moins nombreux que les animaux IOS+ à jeun (4/5).

En augmentant l'intensité de la stimulation par l'odeur alimentaire de 2 à 5%, le nombre de zones activées passe de 1 à 2 chez les rats à jeun (4/5) tandis qu'il reste à une seule zone chez les rats nourris, même pour ceux qui ont répondu à la faible concentration (2/6) (figure V.2B).

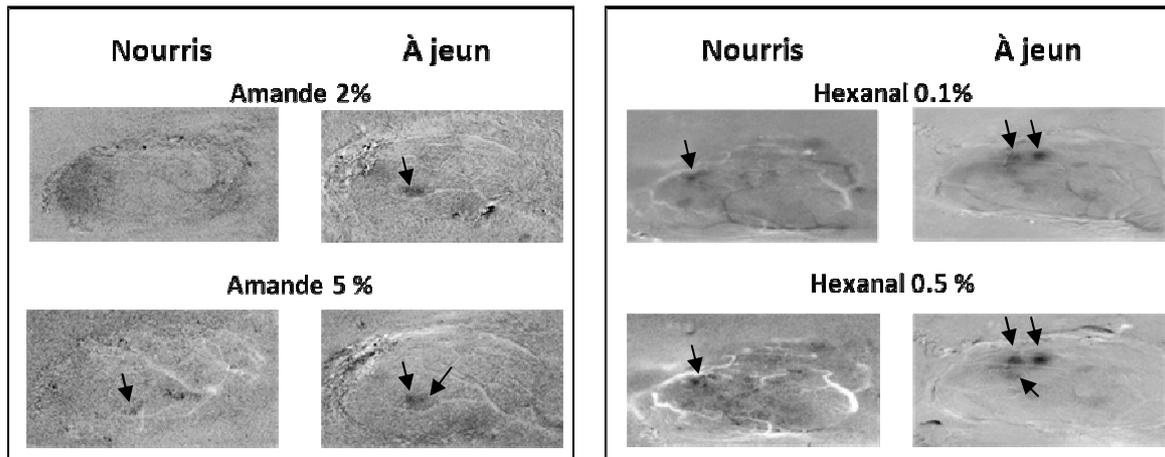
Les pics d'absorption, qui correspondent au maximum de l'absorption et donc à la valeur moyenne de pixels la moins élevée sur le décours temporel de l'activation dans chaque groupe, ont été calculés pour la zone glomérulaire la plus activée pour les deux concentrations utilisées. Ils montrent que le maximum d'absorption de la lumière rouge chez les animaux nourris sont respectivement de 0,047% pour l'amande à 2% et 0,052% pour l'amande à 5% (figure V.2C). Les réponses sont plus fortes chez les rats à jeun avec des pics de réflectance de l'ordre de 0.11% et 0.138% respectivement pour les concentrations d'amande à 2% et 5%.

Il est à noter que les variations de signal sont faibles en réponse à l'odeur alimentaire complexe et montrent une forte variabilité entre les individus testés. Dans ce contexte, aucune différence significative entre les intensités du signal optique n'a été observée lorsque nous avons augmenté les concentrations. Les tests statistiques s'avèrent difficiles à réaliser avec de telles variabilités.

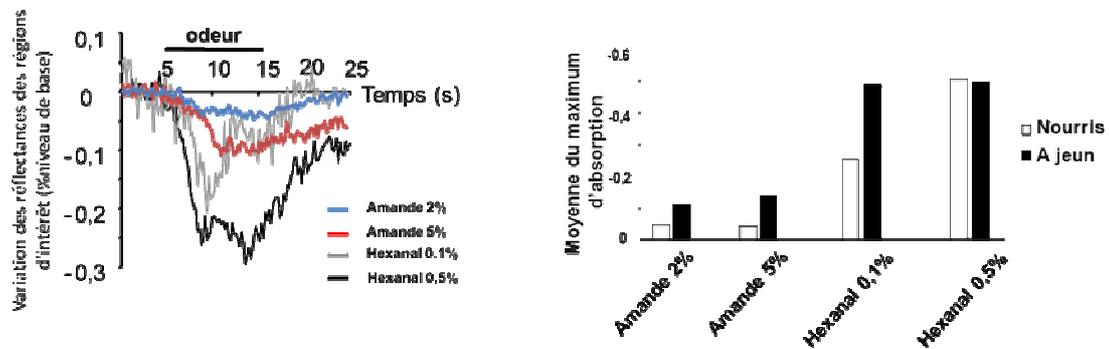
A



B



C



**Figure V.2. Effet du jeûne sur l'activation spatiale du BO visualisée en imagerie optique pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire.** A. Histogrammes montrant le nombre de rats nourris et à jeun ayant répondu aux stimulations d'amande 2% et 5% (respectivement n=5 et n=6) et d'hexanal 0,1% et 0,5% (n= 4 pour chaque concentration). B. Cartes spatiales obtenues chez des rats à jeun et nourris pour les 4 concentrations d'odeurs utilisées. C. Gauche : décours temporel de réflectance de la lumière rouge chez un animal à jeun pour les 2 concentrations utilisées d'odeur alimentaire (n=1) et d'odeur non alimentaire (n=1). Droite : histogramme montrant les pics d'absorption moyens chez les animaux nourris et à jeun.

### **I.3.2. Effets du jeûne sur les cartes spatiales induites par une odeur non alimentaire**

Afin de vérifier si le jeûne affecte le codage spatial de toutes les odeurs, ou si cet effet est spécifique aux odeurs alimentaires, nous avons analysé les signaux optiques en réponse à des stimulations avec l'odeur d'hexanal, une odeur nouvelle pour l'animal et non alimentaire, à deux concentrations 0,1% et 0,5%.

Pour la plus faible concentration d'hexanal à 0,1%, nous avons observé davantage de rats IOS+ chez les animaux à jeun (4/4) que chez les animaux nourris (2/4) (figure V.2). Lorsque nous avons augmenté la concentration à 0,5% tous les animaux nourris et à jeun ont répondu par une activation détectable par imagerie optique. Suite à l'augmentation de la concentration de l'odeur non alimentaire, les zones activées sont passées de 2 à 3 chez les animaux à jeun. Le nombre de zones activées reste à une seule chez les animaux qui avaient répondu à la concentration la plus faible. Les animaux qui n'avaient pas répondu à la faible stimulation (2/4) répondent aussi par l'activation d'une seule zone, la stimulation ne semble donc pas assez forte pour activer chez les animaux nourris autant de zones que chez les animaux à jeun.

Nous avons calculé l'amplitude des pics d'absorption dans la zone la plus activée chez les deux groupes. La figure V.2C montre que le maximum d'absorption pour la plus faible concentration d'hexanal 0,1% est plus élevé chez les animaux à jeun que chez les nourris. En effet, la stimulation induit une baisse de la réflectance de l'ordre de 0,48% en moyenne chez les rats à jeun alors que chez les rats nourris qui ont répondu à cette stimulation (2/4), elle induit une baisse de réflectance l'ordre de 0,25%.

Lorsque nous avons augmenté la concentration de l'odeur non alimentaire à 0,5%, les pics d'absorption n'étaient pas différents chez les deux groupes pour les zones les plus activées. La stimulation induit une baisse de réflectance de 0,49 % chez les rats à jeun et de 0,5 % chez les rats nourris.

De façon très intéressante, le signal IOS chez les animaux à jeun n'augmente pas quand on augmente la concentration d'hexanal suggérant que le maximum d'activation est atteint à la faible stimulation odorante chez les rats à jeun alors que les nourris rejoignent un niveau équivalent aux animaux à jeun à la forte concentration d'odeur non alimentaire.

### **I.3.3. Récapitulatif**

Nous avons montré par l'enregistrement de signaux optiques fonctionnels que le jeûne induisait une réduction du seuil d'activation des cartes spatiales dans le BO : les rats à jeûn répondent à de plus faibles concentrations que les rats nourris. Ces réponses sont plus fortes en termes de nombre des zones activées mais aussi en termes d'intensité. Les animaux sont donc plus sensibles à des faibles concentrations lorsqu'ils sont à jeun et ce aussi bien pour une odeur alimentaire que pour une odeur non-alimentaire.

### **I.4. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires**

Dans cette expérience, nous avons testé les réponses oscillatoires induites par une odeur alimentaire et une odeur non-alimentaire, les mêmes que celles utilisées pour l'imagerie. Nous nous sommes intéressés à trois bandes de fréquences qui ont été décrites précédemment dans le chapitre matériel et méthodes : la bande 15-40 Hz représente le rythme beta ; 60-80 Hz représente la bande que nous appellerons le bas gamma, et la bande 80-130 Hz représente le haut gamma. Nous avons comparé les puissances oscillatoires de ces pavés temps-fréquences pendant la durée de la stimulation (de la seconde 0 à 5) et comparé à des pavés de mêmes fréquences et durées, en ligne de base c'est-à-dire dans la période qui précède la stimulation (de la seconde -6 à la seconde -1, voir matériel et méthodes). Les groupes d'animaux sont considérés comme ayant répondu à l'odeur s'il y a une différence statistiquement significative entre les puissances oscillatoires des pavés entre la période contrôle et la période stimulation.

Notons que dans cette étude, la question était de savoir si les rats répondaient ou non à la concentration d'odeur utilisée. Nous comparons donc pour chaque lot la période de stimulation à la période référence (ligne de base) et non pas l'amplitude des changements entre le groupe à jeun et le groupe nourri.

#### **I.4.1. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires à l'odeur alimentaire**

Nous avons testé trois concentrations d'odeur alimentaire à 1%, 2% et 5%. Aucun des deux lots n'a répondu à la concentration la plus faible de 1%.

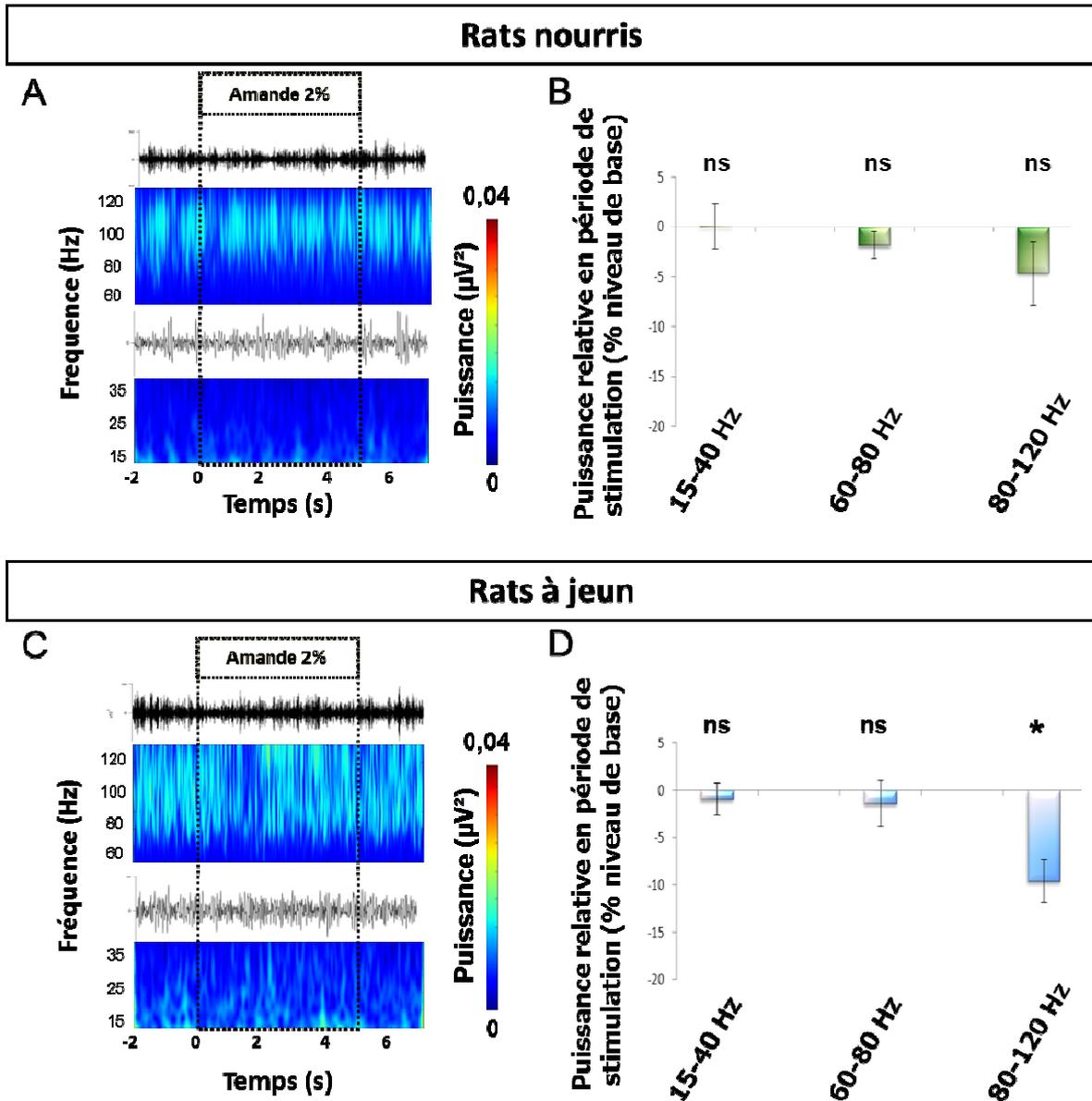
Pour clarifier la présentation des données, nous avons réduit dans la suite le texte au commentaire de la figure de la page suivante.

Il est à noter que nous n'avons observé aucun effet du jeûne sur le profile oscillatoire des rats, que ce soit sur les fréquences ou les puissances des oscillations à l'état basal.

##### ***I.4.1.1. Odeur alimentaire d'amande 2%***

En stimulant les rats nourris avec l'odeur alimentaire d'amande à 2% (figure V.3A, B), la puissance moyenne des oscillations ne change pas significativement entre la période de stimulation et la ligne de base. Nous en déduisons que la concentration utilisée n'est pas assez forte pour provoquer une réponse oscillatoire significative chez les animaux nourris, elle est donc infraliminaire pour ce lot d'animaux.

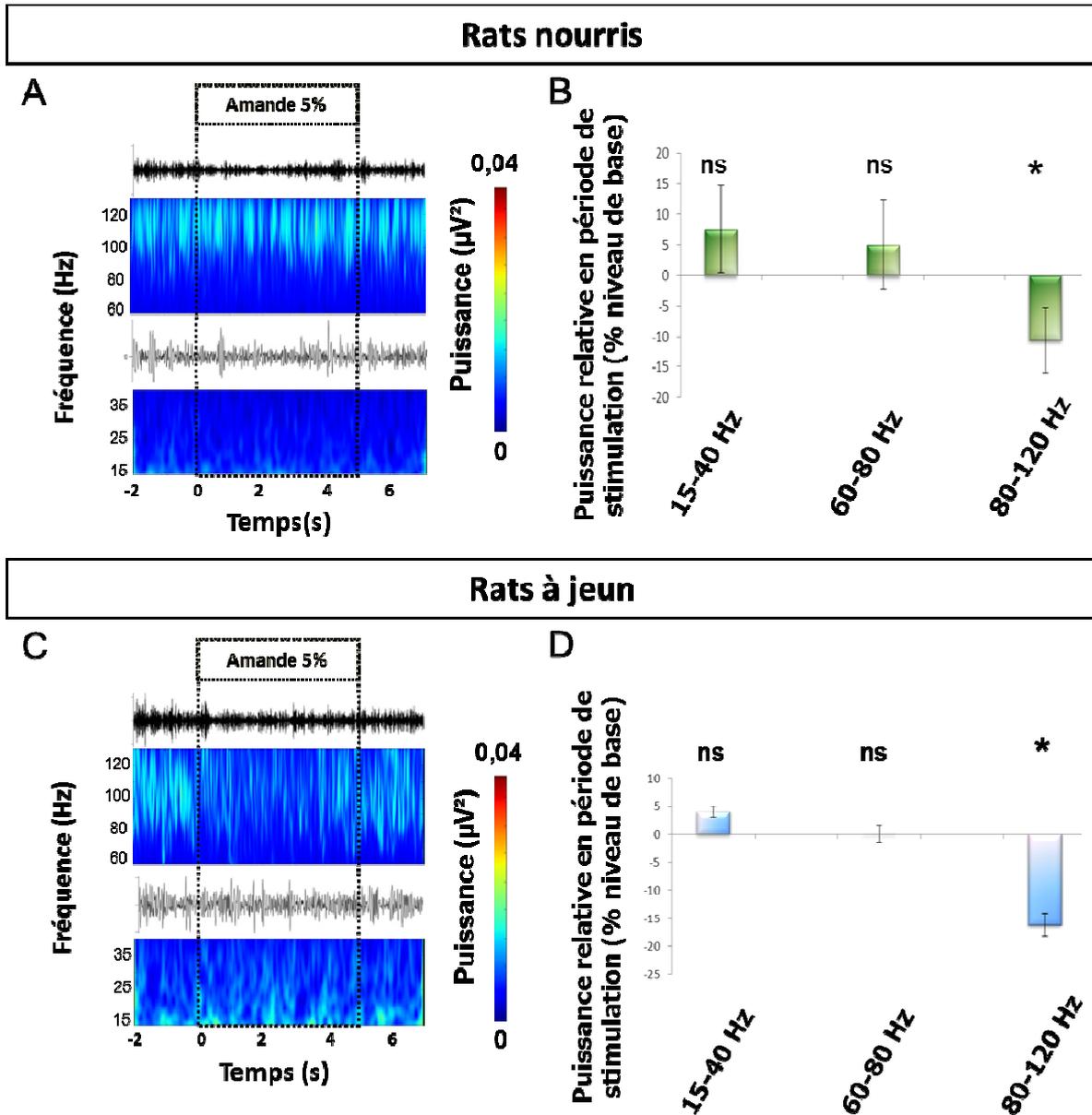
Les rats à jeun répondent à l'odeur alimentaire à 2% par une diminution de la puissance du haut gamma (80-130 Hz) de l'ordre de  $-9,21 \pm 2,23 \%$  ( $p < 0,05$  ; figure V.3C, D). Les puissances des autres bandes de fréquences ne changent pas de manière significative par rapport à la ligne de base.



**Figure V.3. Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur alimentaire d'amande 2%.** En haut, rats nourris (n=6). En bas : rats à jeun (n=6). A. A gauche, des cartes temps-fréquences moyennées sur 9 essais chez un rat nourri en haut et à jeun en bas dans les deux bandes de fréquence bêta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz). Chaque carte temps fréquence est en dessous d'un exemple d'un signal filtré, dans la bande de fréquence correspondante, pour un essai. A droite : les histogrammes représentant l'évolution de la puissance des oscillations pendant la période de stimulation comparée à la ligne de base. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de ligne de base. ns = non significatif. \* = différence significative avec  $p \leq 0,05$ .

#### ***1.4.1.2. Odeur alimentaire d'amande 5%***

Pour la concentration de l'odeur alimentaire d'amande à 5% (figure V.4), la stimulation odorante induit une baisse de la puissance oscillatoire dans la bande du haut gamma (80-130 Hz) chez les deux lots. Une baisse de l'ordre de  $-10,63 \pm 5,38 \%$  ( $p < 0,05$ ) est observée chez les rats nourris alors qu'une baisse de l'ordre de  $-14,75 \pm 2,06 \%$  ( $p < 0,05$ ) est observée chez les animaux à jeun.



**Figure V.4. Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur alimentaire d'amande 5%. En haut, rats nourris (n=6). En bas : rats à jeun (n=6). A. A gauche, des cartes temps-fréquences moyennées sur 9 essais chez un rat nourri en haut et à jeun en bas dans les deux bandes de fréquence bêta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz). Chaque carte temps fréquence est en dessous d'un exemple d'un signal filtré, dans la bande de fréquence correspondante, pour un essai. A droite : les histogrammes représentant l'évolution de la puissance des oscillations pendant la période de stimulation comparée à la ligne de base. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de ligne de base. ns = non significatif. \* = différence significative avec  $p \leq 0,05$**

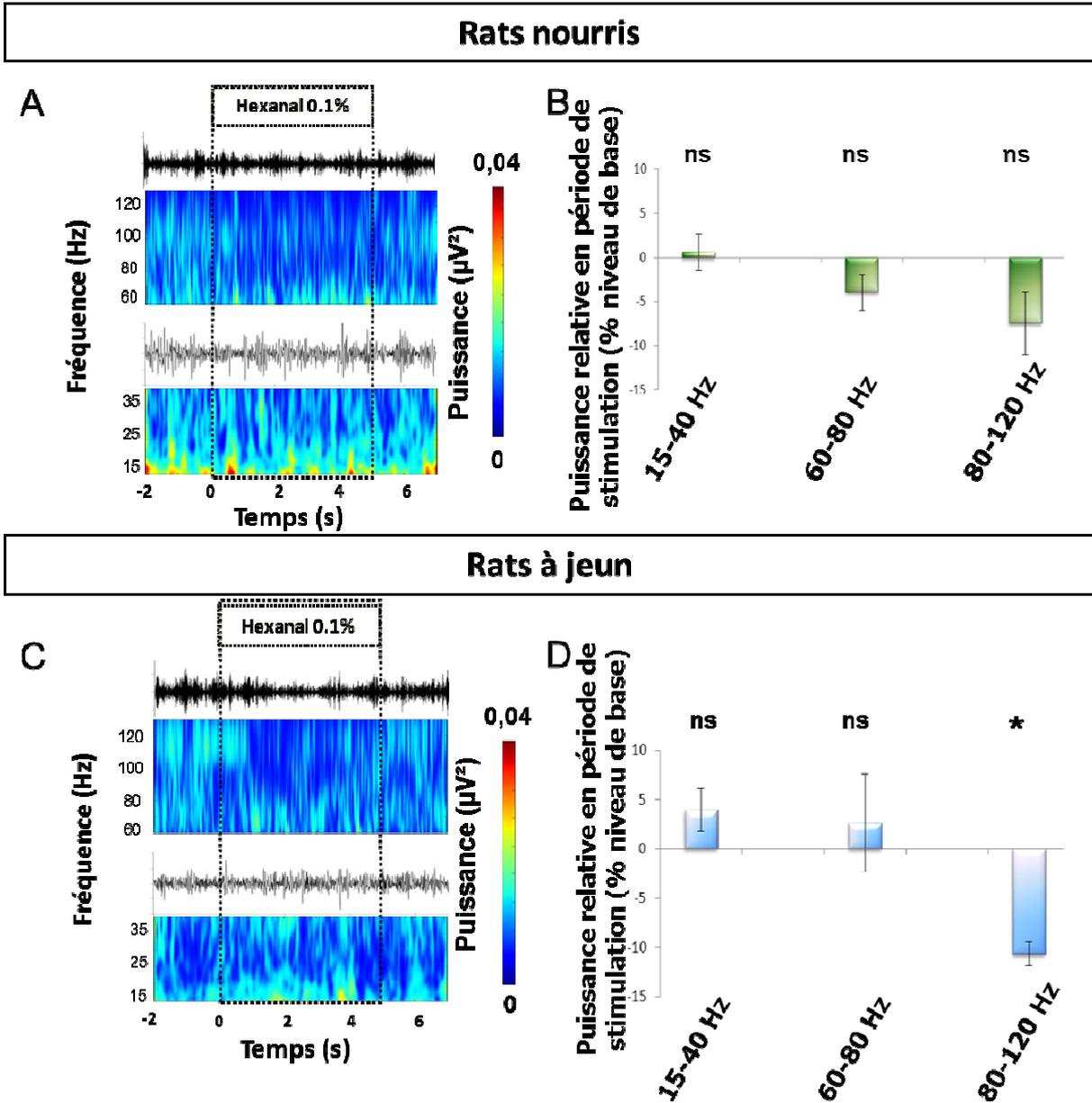
#### **I.4.2. Effets du jeûne sur les réponses oscillatoires à l'odeur non alimentaire**

Afin de vérifier si la diminution du seuil d'apparition des profils oscillatoires observé chez les rats à jeun est uniquement liée à l'odeur alimentaire ou si elle est indépendante de la valence de l'odeur, nous avons testé trois concentrations d'odeur non-alimentaire : 0,1%, 0,5% et 1% d'hexanal.

##### ***1.4.2.1. Odeur non alimentaire d'hexanal 0,1%***

En stimulant les rats nourris avec l'odeur non alimentaire d'hexanal à 0,1% (figure V.5A, B), aucune différence dans le profil oscillatoire n'a été observée en période stimulation, comparé au niveau de base. Comme pour l'odeur alimentaire d'amande à 2 %, la concentration faible d'hexanal à 0,1% est infraliminaire et n'est pas suffisante pour induire une réponse oscillatoire chez les rats nourris.

Les rats à jeun répondent à l'odeur non alimentaire d'hexanal à 0,1% par une diminution de la puissance oscillatoire de la bande haut gamma (80-130 Hz). Cette baisse est de l'ordre de  $10,69 \pm 1,22$  % par rapport au niveau de base ( $p < 0,05$  ; figure V.5C, D). Les puissances des autres bandes de fréquence, à savoir le bas gamma (60-80Hz) et le beta (15-40 Hz), ne varient pas.

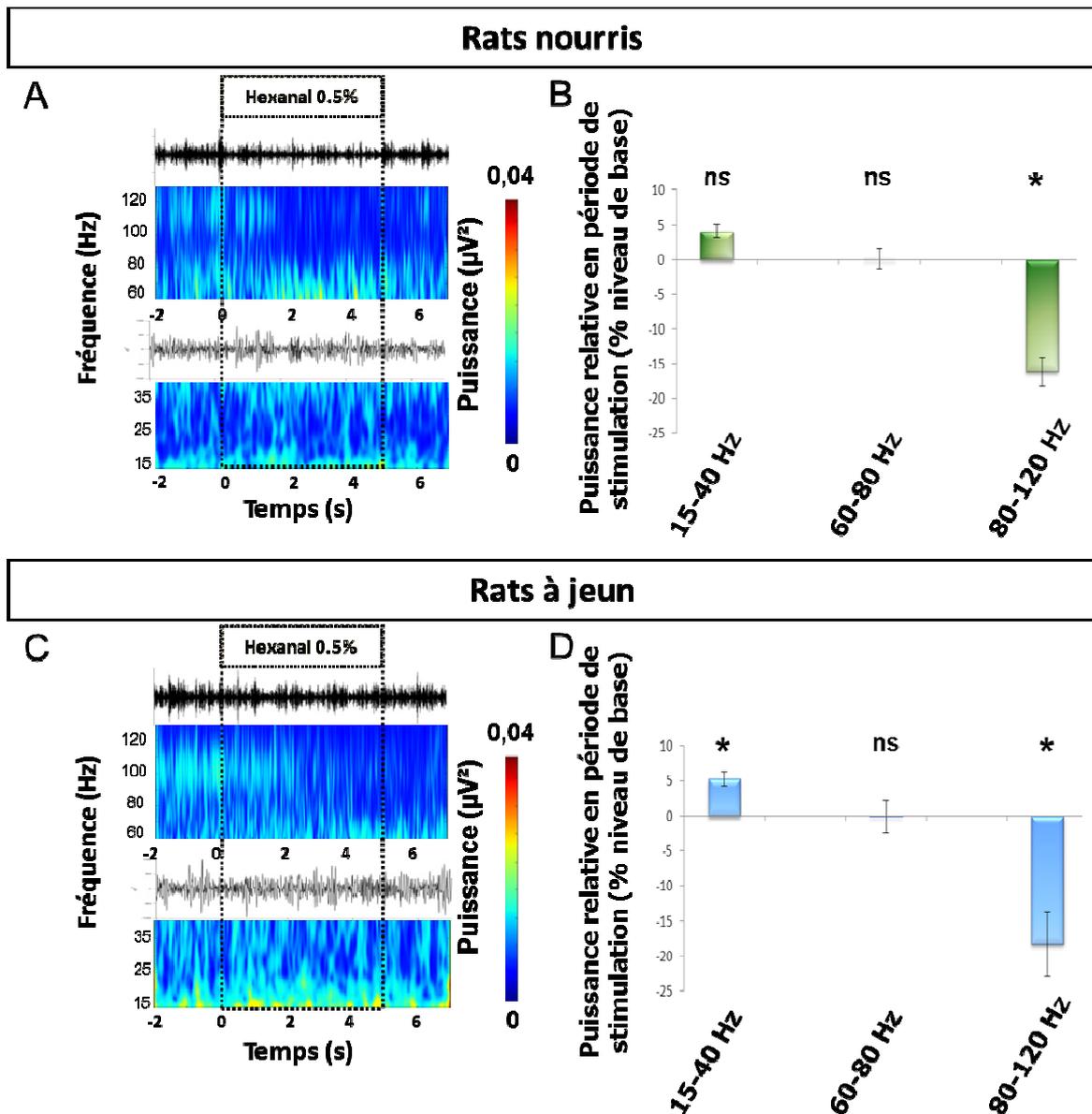


**Figure V.5. Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 0,1%.** En haut, rats nourris (n=6). En bas : rats à jeun (n=6). A. A gauche, des cartes temps-fréquences moyennées sur 9 essais chez un rat nourri en haut et à jeun en bas dans les deux bandes de fréquence bêta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz). Chaque carte temps fréquence est en dessous d'un exemple d'un signal filtré, dans la bande de fréquence correspondante, pour un essai. A droite : les histogrammes représentant l'évolution de la puissance des oscillations pendant la période de stimulation comparée à celle de la période ligne de base. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de ligne de base. ns = non significatif. \* = différence significative avec  $p \leq 0,05$ .

#### ***1.4.2.2. Odeur non alimentaire d'hexanal 0,5%***

Nous avons augmenté la concentration de l'odeur non alimentaire d'hexanal à 0,5 % et stimulé les deux lots de rats, à jeun et nourris (figure V.6). Les rats nourris ont répondu par une diminution significative de l'ordre de  $13,61 \pm 4,89$  % ( $p < 0,05$ ) de la puissance oscillatoire dans la bande du haut gamma (80-130 Hz). Les puissances des autres bandes de fréquence, à savoir la bande du bas gamma (60-80 Hz) et la bande beta (15-40 Hz), ne varient pas au cours de la stimulation (Figure V.6A, B).

Les rats à jeun ont été également stimulés avec l'odeur non alimentaire d'hexanal à 0,5%. Suite à la stimulation, le profil oscillatoire a significativement changé par rapport au niveau de base. Ainsi, la stimulation a diminué significativement la puissance oscillatoire de la bande de haut gamma (80-130 Hz) de  $15,80 \pm 3,47$  % ( $p < 0,05$ ) et augmenté la puissance de la bande beta (15-40Hz) de  $4,77 \pm 1,34$ % ( $p < 0,05$  ; figure V.6C, D). La puissance oscillatoire de la bande bas-gamma n'a pas changé de manière significative.

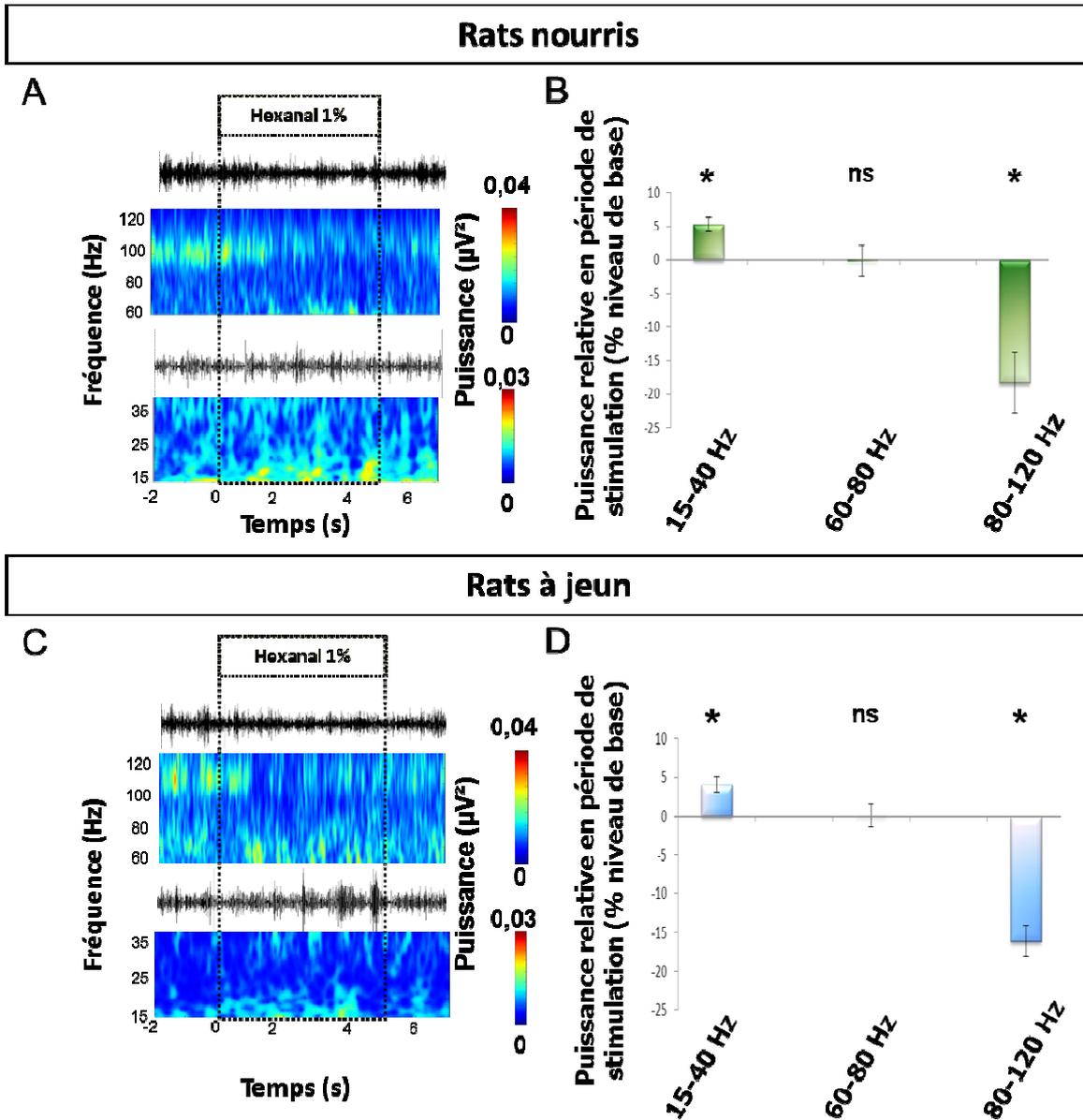


**Figure V.6. Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 0,5%.** En haut, rats nourris (n=6). En bas : rats à jeun (n=6). A. A gauche, des cartes temps-fréquences moyennées sur 9 essais chez un rat nourri en haut et à jeun en bas dans les deux bandes de fréquence bêta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz). Chaque carte temps fréquence est en dessous d'un exemple d'un signal filtré, dans la bande de fréquence correspondante, pour un essai. A droite : les histogrammes représentant l'évolution de la puissance des oscillations pendant la période de stimulation comparée à celle de la période ligne de base. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de ligne de base. ns = non significatif. \* = différence significative avec  $p \leq 0,05$ .

#### ***1.4.2.3. Odeur non alimentaire d'hexanal 1%***

Nous avons augmenté davantage la concentration d'odeur non alimentaire d'hexanal jusqu'à 1% (figure V.7). Cette concentration a aboli les différences entre les deux groupes à jeun et nourri. En effet, la stimulation a induit, chez les rats nourris et à jeun, une baisse de la puissance des oscillations respectivement de  $16,11 \pm 1,98\%$  et  $18,32 \pm 4,56 \%$  dans la bande du haut gamma (80-130 Hz).

Cette concentration a induit aussi, chez les animaux nourris et à jeun, une augmentation de la puissance oscillatoire respectivement de  $5,26 \pm 1,04 \%$  et  $4,06 \pm 0,96\%$  dans la bande beta (15-40 Hz). La bande de bas gamma ne change pas de puissance oscillatoire pour cette concentration.



**Figure V.7. Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 1 %.** En haut, rats nourris (n=6). En bas : rats à jeun (n=6). A. A gauche, des cartes temps-fréquences moyennées sur 9 essais chez un rat nourri en haut et à jeun en bas dans les deux bandes de fréquence bêta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz). Chaque carte temps fréquence est en dessous d'un exemple d'un signal filtré, dans la bande de fréquence correspondante, pour un essai. A droite : les histogrammes représentant l'évolution de la puissance des oscillations pendant la période de stimulation comparée à celle de la période ligne de base. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de ligne de base. ns = non significatif. \* = différence significative avec  $p \leq 0,05$ .

### **I.4.3. Récapitulatif**

Au terme de cette expérience d'électrophysiologie utilisant l'arôme d'amande comme stimulation odorante alimentaire et l'hexanal comme stimulation odorante non alimentaire, nous avons montré que le jeûne induisait une baisse du seuil d'activation dans le BO. Ainsi, seuls les animaux à jeun répondent à la faible concentration de l'odeur alimentaire, cette réponse se caractérise par une diminution de la puissance de la bande du haut gamma.

Pour l'odeur alimentaire, l'augmentation de la concentration supprime les différences entre les groupes et induit une réponse chez les deux lots d'animaux dans la bande du haut gamma. Les puissances des autres bandes de fréquence ne varient pas en réponse à cette odeur.

Pour l'odeur non alimentaire, l'augmentation de la concentration induit une réponse dans la bande du haut gamma chez les deux lots mais aussi l'apparition d'une nouvelle réponse qui se caractérise par une augmentation de puissance oscillatoire dans la bande beta chez les animaux à jeun uniquement.

Une plus forte concentration d'hexanal abolit les différences de réponses oscillatoires à la stimulation entre les animaux nourris et les animaux à jeun. Elle induit les mêmes réponses oscillatoires dans les bandes haut gamma et beta chez les deux lots.

Ces résultats obtenus sur la représentation temporelle des odeurs dans le BO en réponse à une odeur alimentaire et non alimentaire confortent l'hypothèse d'un effet du jeûne sur le seuil d'activation du BO chez le rat que nous avons observé par imagerie. Le tableau V.1 récapitule les différentes réponses dans les bandes de fréquences pertinentes.

| Bande de fréquence | Odeur                     | Concentration | Rats nourris            | Rats à jeun             |
|--------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| Beta               | alimentaire : amande      | 2%            | 0,13 ± 2,28 %           | -0,9 ± 1,75 %           |
|                    |                           | 5%            | 7,54 ± 7,16 %           | 0,08 ± 1,01 %           |
|                    | Non alimentaire : hexanal | 0,1%          | 0,58 ± 2,13 %           | 3,91 ± 2,14%            |
|                    |                           | 0,5%          | 0,22 ± 0,94 %           | <b>4,77 ± 1,34%</b>     |
|                    |                           | 1%            | <b>4,08 ± 0,96 %</b>    | <b>5,26 ± 1,04%</b>     |
| Gamma              | Alimentaire : amande      | 2%            | - 4,63 ± 3,17 %         | <b>-9,61 ± 2,23 %</b>   |
|                    |                           | 5%            | <b>- 10,63 ± 5,38 %</b> | <b>-14,75 ± 2,06 %</b>  |
|                    | Non alimentaire : hexanal | 0,1%          | - 7,49 ± 3,56 %         | <b>- 10,69 ± 1,22 %</b> |
|                    |                           | 0,5%          | <b>- 13,61 ± 4,89 %</b> | <b>- 15,81 ± 3,47 %</b> |
|                    |                           | 1%            | <b>- 16,11 ± 1,98%</b>  | <b>- 16,11 ± 1,98%</b>  |

**Tableau V.1. Récapitulatif des variations de réponses oscillatoires aux stimulations odorantes pour les deux odeurs aux différentes concentrations utilisées.** Les variations des puissances oscillatoires moyennes pendant la période de stimulation sont exprimées en pourcentage de ligne de base. Les valeurs en caractères gras représentent les variations significatives. Dans la bande beta, aucune variation significative n'est observée pour les deux concentrations d'amande utilisées et ce chez les rats nourris (n=6) et à jeun (n=6). Pour l'hexanal, les rats à jeun (n=6) montrent une réponse significative dans la bande beta à partir de la concentration d'hexanal à 0,5% alors que les rats nourris (n=6) ne répondent dans cette bande qu'à la concentration la plus élevée d'hexanal 1%. Dans la bande gamma, les animaux à jeun (n=6) répondent significativement aux deux concentrations d'amande utilisées alors que les animaux nourris (n=6) ne répondent qu'à la plus forte. De même pour l'hexanal, les animaux à jeun (n=6) répondent à la plus faible concentration utilisée d'hexanal 0,1% alors que les animaux nourris ne répondent qu'aux concentrations plus élevées d'hexanal 0,5 et 1%.

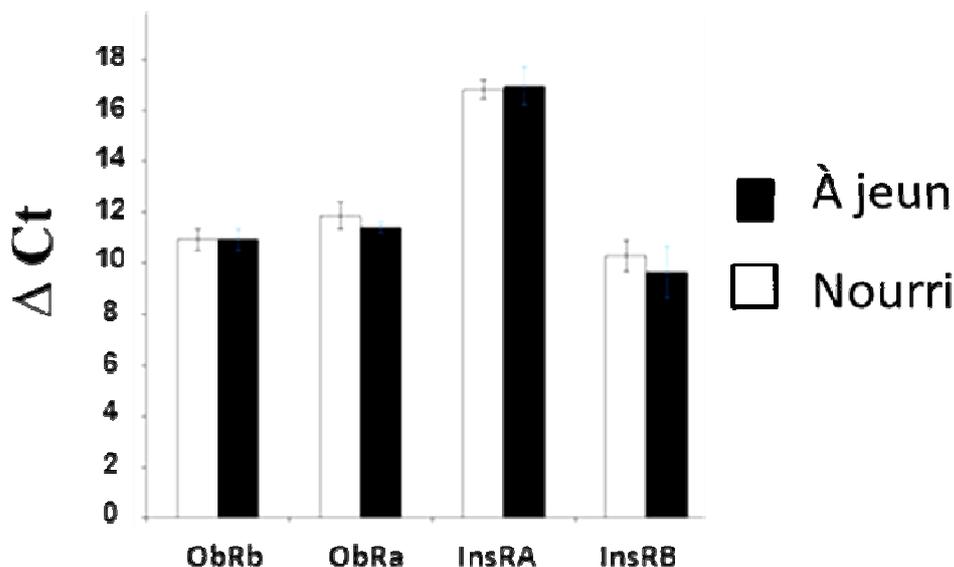
## I.5. Signaux du statut nutritionnel responsables de la plasticité du BO

### I.5.1. Effet du jeûne sur la transcription bulbaire des signaux du statut nutritionnel

Afin d'expliquer les différences de seuil d'activation entre rats nourris et à jeun, nous avons émis l'hypothèse que le jeûne pouvait affecter l'expression de certains récepteurs pour des hormones du statut nutritionnel connus pour être exprimés dans le BO qui voient leur expression varier en fonction d'un jeûne de 48h dans la MO (Baly et al., 2007 ; Lacroix et al., 2008) ou le BO (données non publiées de NOeMI). Nous avons donc quantifié par RT-PCRq les niveaux d'ARNm transcrits pour les récepteurs à la leptine et à l'insuline dans les BO d'animaux à jeun (n=5) et d'animaux nourris (n=5).

La figure V.8 résume les résultats obtenus en comparant les expressions relatives des gènes chez des animaux nourris ou à jeun pendant 17h indiquée en delta Ct (Ct gène d'intérêt-Ct gène référent). Aucune différence significative n'est observée dans les niveaux d'expression des transcrits des récepteurs à la leptine (Ob-Ra et Ob-Rb) ou à l'insuline (IR-A et IR-B) entre ces 2 états. Les variations des cartes d'activation spatio-temporelles chez les animaux à jeun ne sont pas corrélées à des variations du niveau d'expression des gènes codant pour ces 2 récepteurs métaboliques dans le BO.

## Expression des gènes



**Figure V.8. Effets du jeûne sur les quantités d'ARNm des récepteurs à la leptine et l'insuline dans le BO.** Le jeûne de 17h n'affecte pas la transcription des gènes codant pour les différentes formes de récepteurs à la leptine et à l'insuline dans le BO.

### **I.5.2. Effet de la leptine sur les réponses oscillatoires aux odeurs chez les animaux à jeun**

Une des pistes qui pouvaient expliquer une diminution de seuil d'activation induit par le jeûne pour les deux types d'odeurs dans le BO était une action directe des hormones circulantes sur le fonctionnement du BO. Compte tenu i) des résultats de RT-PCRq et des taux plasmatiques des deux principales hormones anorexigènes drastiquement réduits par le jeûne ii) des résultats précédemment publiés par NOEMI (Prud'Homme et al., 2009) et iii) du temps qui nous était imparti dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pu étudier que les effets de la leptine. La leptine est censée mimer un état rassasié chez des animaux à jeun. Chez des rats à jeun, nous avons injecté de la leptine en i.p. et comparé la réponse à l'odeur d'amande à 2% après injection par rapport à la période contrôle précédant l'injection.

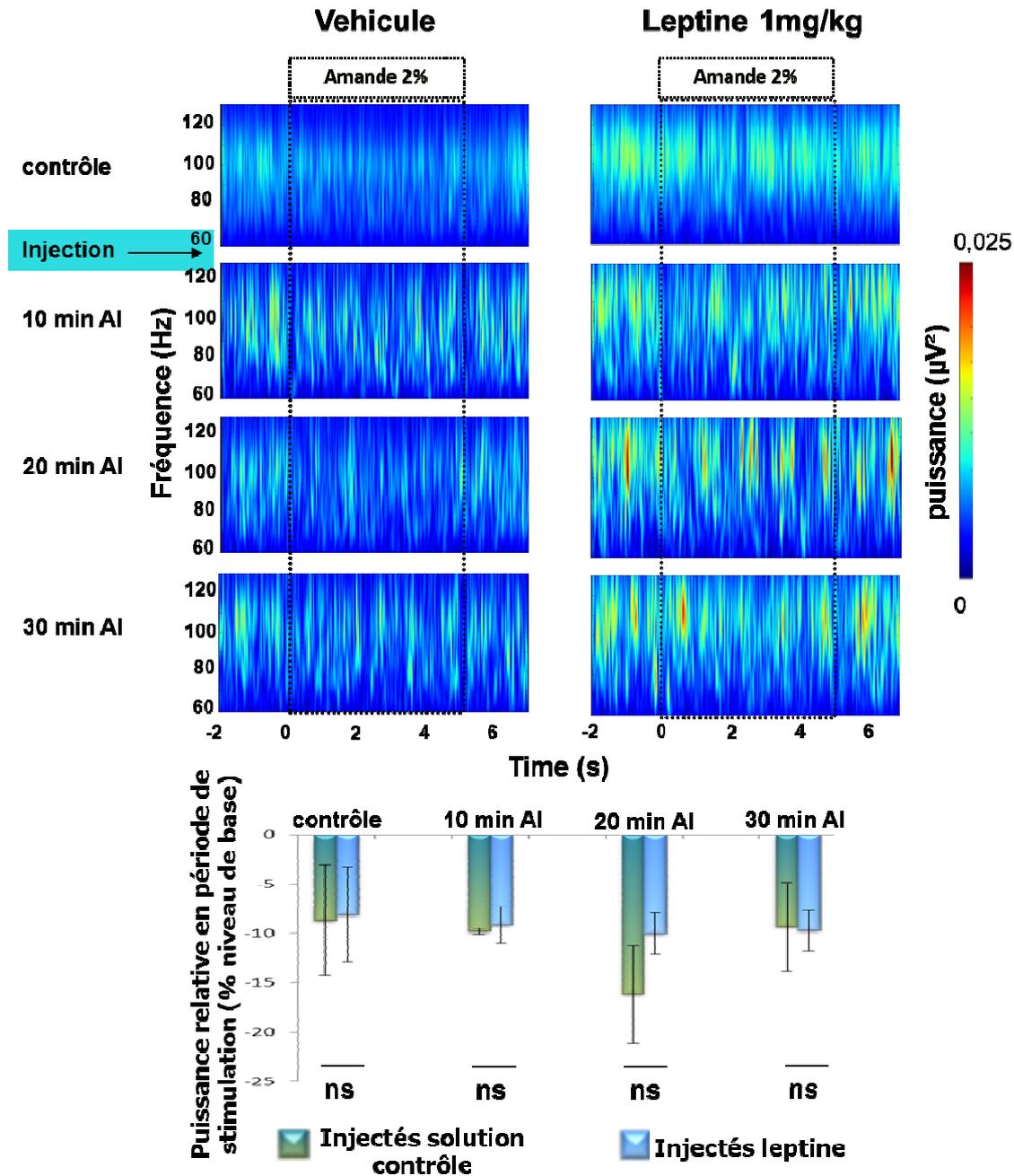
Les résultats (figure V.9) montrent que la diminution du gamma en réponse à l'odeur alimentaire d'amande à 2% chez les rats à jeun avant injection est conservée après l'injection de leptine.

Tout d'abord, chez les animaux injectés en solution de sérum physiologique, la réponse à la stimulation avant l'injection se caractérise par une diminution de la puissance du haut gamma de l'ordre de  $-8,68 \pm 5,56$  % comparée à la ligne de base (n=2). Les réponses enregistrées dix, vingt et

trente minutes après injection sont aussi caractérisées par une baisse de la puissance relative de la bande haut gamma, respectivement de  $-9,82 \pm 0,31\%$ ,  $-16,18 \pm 4,94\%$  et  $-9,29 \pm 4,45\%$ .

Chez les animaux injectés en leptine, la réponse avant injection se caractérise par une diminution dans la puissance moyenne de la bande haut gamma de l'ordre de  $-8 \% \pm 4,81 \%$  comparé à la ligne de base (n=3). Cette réponse est conservée dix, vingt et trente minutes après l'injection de la leptine ou elle est respectivement de l'ordre de  $-9,1 \pm 1,86\%$ ,  $-10,04 \pm 2,06\%$  et  $-9,73 \pm 2,02\%$ . Les animaux ayant subi une injection i.p. de leptine présentent donc les mêmes profils que les animaux injectés avec du sérum physiologique.

La leptine seule n'a pas d'effet direct sur le profil des réponses oscillatoires à l'odeur dans le BO induits par l'odeur alimentaire d'amande à 2% chez les rats anesthésiés.



**Figure V.9.** La leptine n'affecte pas les réponses oscillatoires en réponse à une odeur alimentaire d'amande 5%. Cartes temps fréquence montrant la réponse à l'odeur d'amande 2% chez des animaux à jeun injectés en sérum physiologique (gauche, n=2) ou en leptine (droite, n=3). Les réponses contrôle sont enregistrées avant toute injection puis et comparées aux réponses 10, 20 et 30 minutes après injection. En bas, les histogrammes montrent l'évolution de la réponse en haut gamma au cours du temps après les injections. AI = Après Injection de leptine. ns = non significatif.

## **I.6. Récapitulatif général de l'étude des effets du jeûne sur le codage spatiotemporel dans le BO de rat**

Au terme de ces expériences d'imagerie pour appréhender la représentation spatiale des odeurs, d'électrophysiologie pour analyser les dynamiques temporelles induites par stimulation odorante et d'analyse moléculaire des protéines potentiellement impliquées, nous avons montré pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire que i) le seuil pour obtenir une réponse spatiale mais aussi temporelle est fortement diminué chez les animaux à jeun comparé aux rats nourris et ii) la leptine ne peut expliquer à elle seule cet impact du jeûne sur la représentation des odeurs dans le BO chez les animaux anesthésiés.

## **II. Etude de l'impact du jeûne sur les protéines astrocytaires du BO : une étude préliminaire**

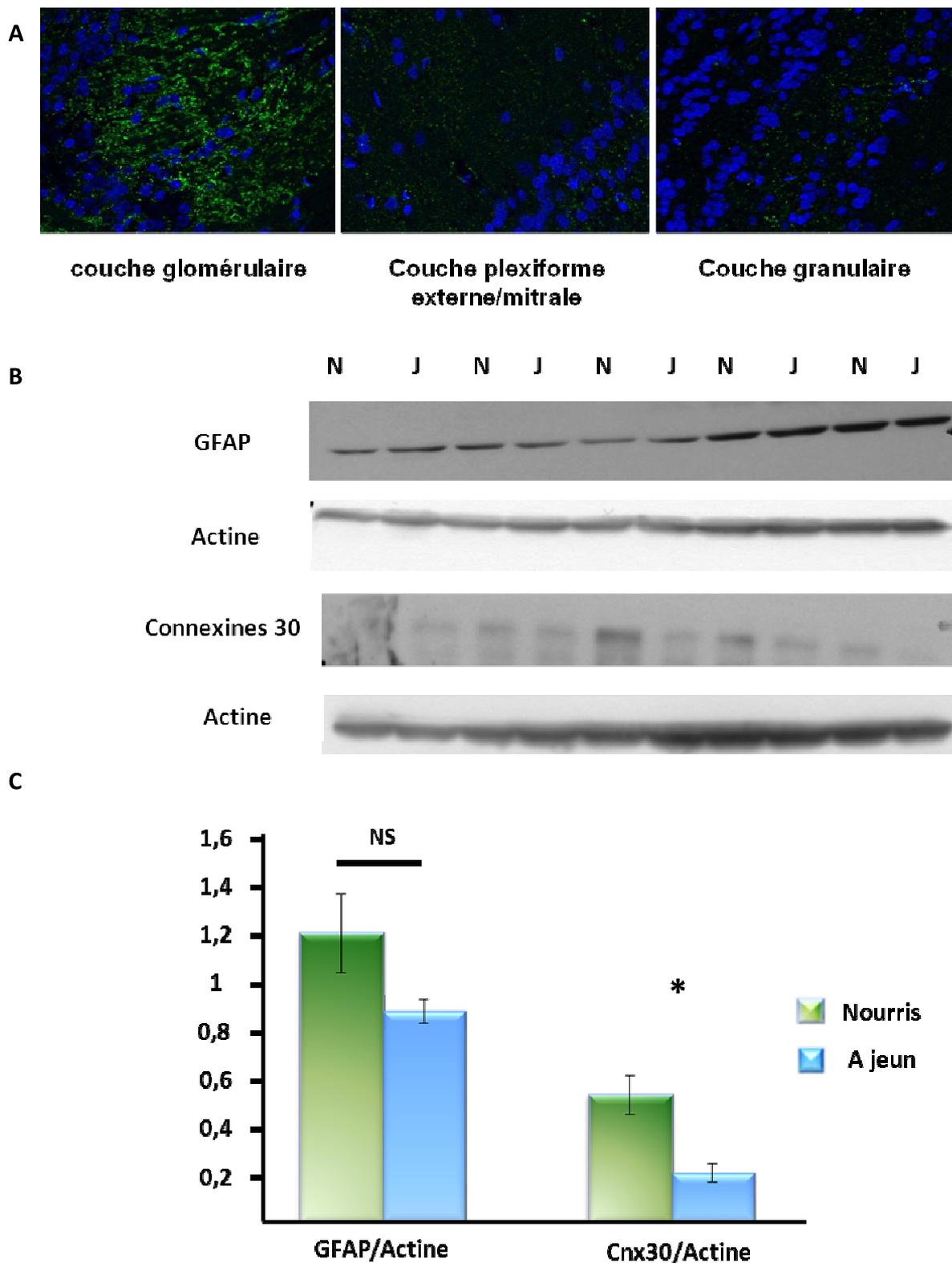
L'équipe MIO a montré que les astrocytes jouent un rôle important à la fois dans les signaux optiques de cartographie spatiale (Gurden et al., 2006) et dans les oscillations induites par les odeurs (Martin et al., 2011 soumis). Nous avons voulu analyser le versant astrocytaire des signaux spatiotemporels que nous observons chez les rats à jeun et nourris pour explorer l'éventuelle implication de ce type cellulaire dans l'impact du jeûne observé sur le BO.

Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de la GFAP et de la connexine 30 dans le BO par des techniques de western blot et d'immunohistochimie développées au laboratoire NOeMI (figure V.10) :

Nous avons effectué des marquages immunohistochimiques de ces deux protéines d'intérêt sur des coupes de BO prélevés chez des animaux nourris et à jeun 17h (n=2) (Figure V.10A). Les marquages obtenus ont permis de localiser la connexine 30 dans différentes couches de cellules gliales du BO (glomérules, couche plexiforme externe, couche granulaire). Aucune différence dans la répartition ou l'intensité de ce marquage entre BO d'animaux nourris ou à jeun n'a pu être établie par cette méthode.

Afin d'affiner notre analyse, nous avons voulu quantifier ces protéines par western blot sur des échantillons de protéines totales isolées de BO prélevés chez des rats à jeun (n=5) ou nourris (n=5). Si ces analyses ont permis d'identifier sans problème ces 2 protéines sous la forme d'une bande à la taille attendue (GFAP à 55 kDa et connexine 30 à 30 kDa), nous n'avons pas mesuré de différence statistique de niveaux d'expression entre les échantillons selon l'état nutritionnel (Figure V.10B). En effet, l'existence d'un gradient de concentration visible sur la bande d'actine devant être utilisée pour faire la normalisation interne a rendu difficile les quantifications relatives (Figure IV.10B, C). Les signaux de la protéine d'intérêt rapportée à l'actine varient sans lien avec l'état métabolique. Malgré plusieurs tests réalisés au laboratoire depuis mon passage, l'origine de ce gradient n'est toujours pas

établie. Au moment où j'écris cette thèse, les modifications et améliorations de la technique sont encore en cours et ce travail sera achevé ultérieurement.



**Figure V.10. Etude de l'expression des protéines astrocytaires connexine 30 et GFAP.** A. Immunohistochimie montrant la présence de connexine 30 principalement dans la couche glomérulaire. B. Gels de western blot pour la GFAP et la connexine 30 chez 5 animaux nourris (notés N) à jeun (notés J). C. histogrammes montrant l'évolution de la GFAP et Cx 30, exprimés en rapport protéine d'intérêt/actine (protéines référence).

### III. Etude du rôle des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1 sur le codage temporel des odeurs

Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Giovanni Marsicano à Bordeaux, qui travaille sur le rôle des récepteurs CB1 dans la prise alimentaire. L'activation de ces récepteurs constitue en effet un signal orexigène puissant et induit une hyperphagie chez les souris. Pour explorer le rôle éventuel de l'olfaction dans cette hyperphagie, nous avons suivi le protocole décrit dans le chapitre matériel et méthodes. Nous avons soumis les souris anesthésiées et mises à jeun depuis 24h à une première séquence de stimulation avec de l'hexanal à 5% afin d'enregistrer une première réponse témoin. La figure V.10 montre que la réponse aux stimulations pendant cette séquence contrôle se caractérise par une augmentation des puissances des oscillations dans les deux bandes de fréquences beta (15-40 Hz) et gamma (60-130 Hz) et ce, chez les souris avant injection de THC ou chez les souris contrôles avant injection d'alcool à 2% qui est le solvant du THC.

Nous avons alors réalisé l'injection de THC (ou d'alcool 2% pour les contrôles) puis acquis des séquences à respectivement 5, 20, 40 et 60 minutes après injection de THC ou d'alcool. Nous avons comparé les réponses des séquences 5, 20 et 40 minutes après injection de THC ou de solution contrôle sur les souris C57Bl6 en prenant chaque lot d'animaux comme son propre témoin. Nous avons constaté chez les souris injectées en solution d'alcool que la réponse à la stimulation odorante diminuait au cours des stimulations (figure V.11). En effet, la réponse initiale est une augmentation des puissances des bandes beta et gamma respectivement de  $25,30 \pm 6,44\%$  et  $27,12 \pm 17,59\%$ . Quarante minutes après injection, la réponse à l'odeur se caractérisait par une augmentation de l'ordre de  $8,27 \pm 6,45\%$  et  $1,87 \pm 1,06\%$  respectivement pour les bandes beta et gamma. Nous expliquons ces diminutions, de l'ordre de 67,3% pour la bande beta et 93,07% pour le gamma par une désensibilisation à l'odeur d'hexanal.

Afin de déterminer si cet effet est dû à l'alcool, nous avons aussi testé deux souris sans aucune injection et avons retrouvé le même profil d'habituation que chez des souris injectées avec l'alcool, ce qui conforte l'absence d'un effet qui serait lié directement à l'alcool. Afin d'écartier l'effet éventuel de la médétomidine, nous avons également testé un mélange de kétamine-médétomidine sur les souris C57Bl6, un mélange couramment utilisé dans le laboratoire chez le rat : les souris injectées à la solution d'alcool se désensibilisaient comme dans le cas du mélange kétamine-xylazine au fur et à mesure des stimulations odorantes.

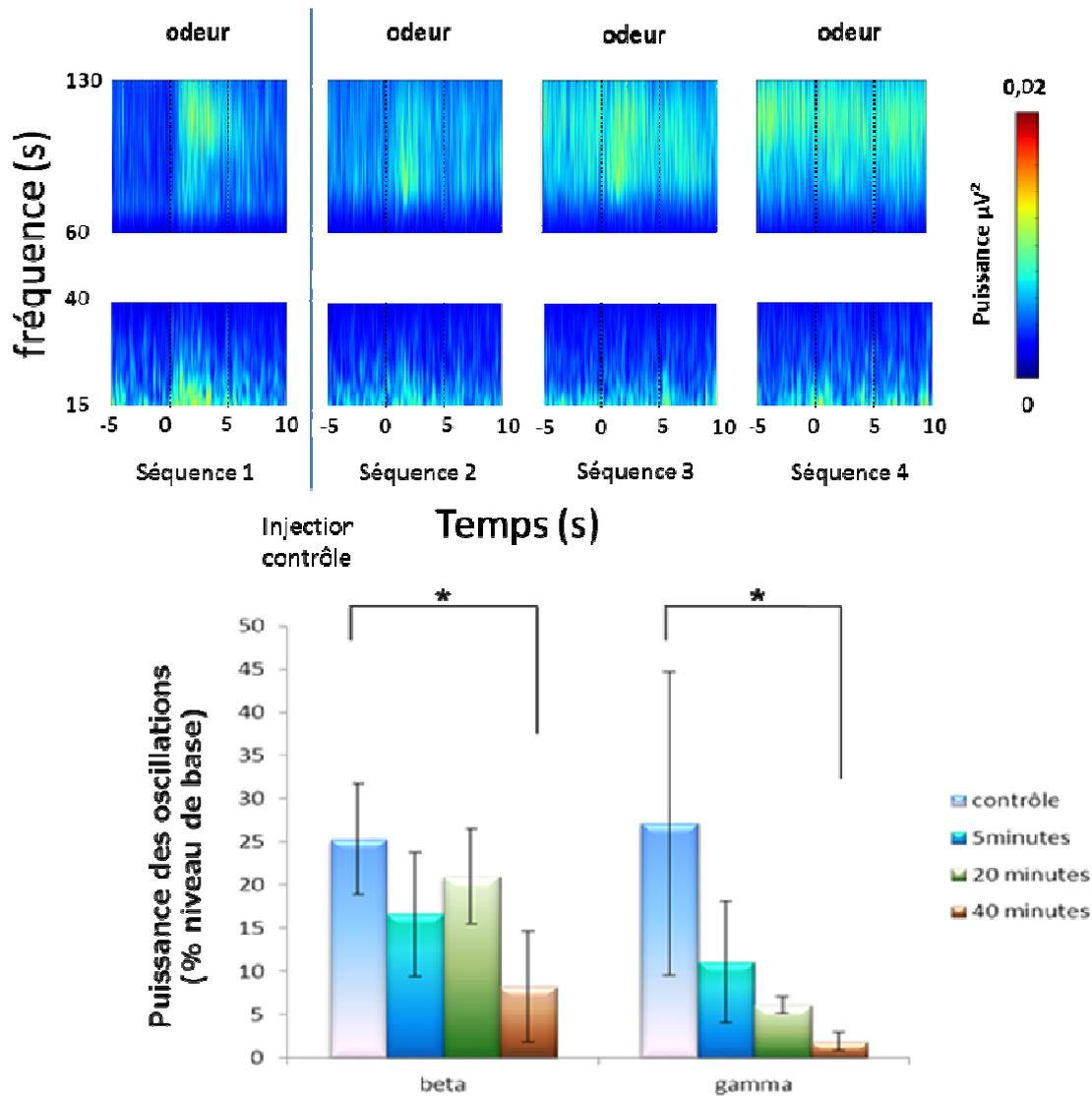
De façon intéressante, les souris injectées avec du THC ne présentent pas la désensibilisation des souris contrôles dans les deux bandes de fréquences (figure V.12), suggérant ainsi un effet du THC sur la désensibilisation des souris aux stimulations odorantes. En effet, en réponse à la situation contrôle, les souris répondent par une augmentation de la puissance de la bande gamma de l'ordre de  $36,51 \pm 11,12\%$  et de la bande beta de l'ordre de  $42,6 \pm 16,67\%$ . Quarante minutes après injection de

THC, les réponses aux odeurs se caractérisent toujours par une augmentation de  $23,31 \pm 5,11$  % dans la puissance de la bande beta et de  $39,61 \pm 33,09$  % dans la puissance de la bande gamma. Aucune différence significative n'est observée entre la quatrième séquence d'acquisition, quarante minutes après injection de THC, et la séquence contrôle avant toute injection.

Les écart-types et variabilités très importantes nous obligent à réaliser plus de souris afin de réduire l'effet de la variabilité et d'observer éventuellement des changements légers qui arriveraient plus tôt (séquence 2 ou 3).

Les tests comportementaux qui sont actuellement réalisés par nos collaborateurs sur l'habituation des souris, révèlent une tendance à la suppression de l'habituation comportementale par l'injection de THC mais la difficulté de ce test ne permet pas encore d'établir une conclusion à ce stade de l'expérimentation.

Nous avons également travaillé sur des souris KO n'exprimant pas les récepteurs CB1 sur les terminaisons présynaptiques des synapses excitateurs. Dans une étude récente (Bellocchio et al., 2010), nos collaborateurs bordelais ont montré que la délétion des récepteurs CB1 sur ces afférences présynaptiques entraînent une perte de la prise alimentaire normale chez les souris avec une forte tendance à l'hyperphagie. Nous avons d'abord testé les profils de réponses chez les animaux sauvages et mutés. Les souris sauvages  $+/+$  montrent une habituation en réponse à une stimulation répétitive de l'odeur d'hexanal et présentent le même profil que les animaux C57Bl6 injectées avec des solutions d'alcool. Les souris transgéniques  $-/-$ , déficientes en récepteurs CB1 sur les terminaisons présynaptiques excitatrices, semblent conserver une réponse dans la bande beta (15-40 Hz) alors que la réponse dans la bande gamma (60-120 Hz) semble décroître au fur et à mesure des séquences de stimulation.



**Figure V.11. Effets de l'injection d'une solution d'alcool sur les réponses à des stimulations répétées.** Les cartes temps fréquence montrent chez les animaux injectés avec la solution contrôle que la réponse à l'odeur décroît au cours du temps. Les histogrammes montrent qu'il y a une baisse significative dans la réponse oscillatoire dans les bandes beta et gamma.

Nous avons alors été très surpris par le fait que l'injection de THC chez les souris sauvages  $+/+$  entraînaient une désensibilisation dans la bande beta seulement et non pas dans la bande gamma. Devant un tel manque de reproductibilité dans des conditions contrôles, chez les animaux sauvages  $+/+$  nous avons regardé tous les paramètres pouvant être à l'origine de cette hétérogénéité d'habitation. Nous avons constaté que les souris ayant voyagé depuis Bordeaux montraient du stress : elles étaient agressives et s'infligeaient des blessures profondes à tel point que nous avons été obligé d'euthanasier quelques-unes. De plus, le taux de mortalité des souris  $-/-$  suite à l'injection d'anesthésique était élevé comparé à celui des souris sauvages (1/4 pour les  $+/+$  et 1/2 chez les  $-/-$ ). Une mortalité pour des raisons inconnues a aussi été observée chez les CB1-KO. Tous ces effets ont réduit notre confiance dans les résultats obtenus chez ces souches, et nous avons donc choisi de ne pas montrer ces résultats, en attendant d'avoir une reproductibilité des profils oscillatoires.

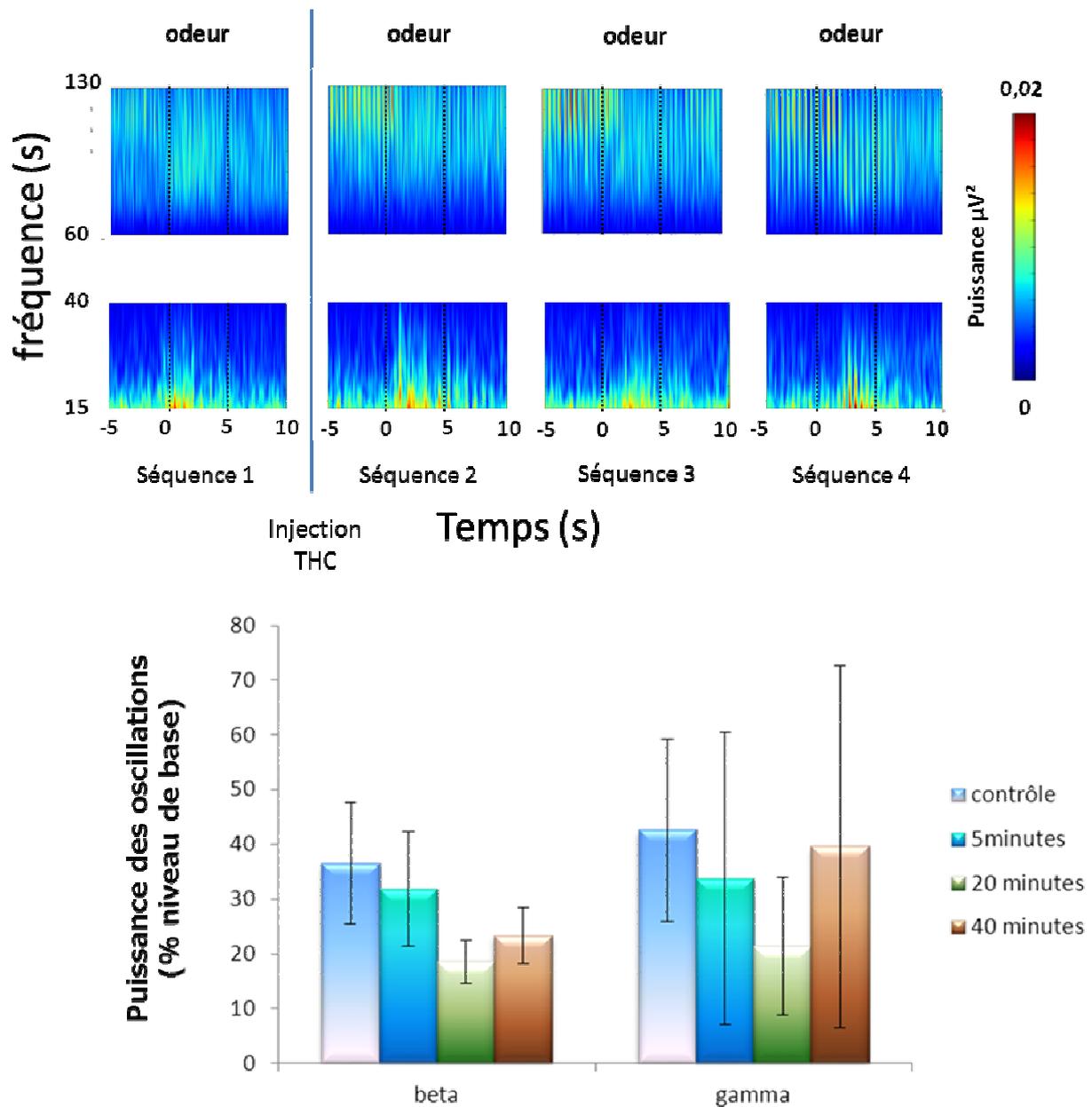


Figure V.12. Effets de l'injection d'une solution de THC à 1 mg/kg sur les réponses à des stimulations répétées. Les cartes temps fréquence montrent, chez les animaux injectés avec la solution contrôle que la réponse à l'odeur ne décroît pas au cours des stimulations. Les histogrammes montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la réponse oscillatoire dans les bandes beta et gamma.

# **Chapitre VI. Discussion**

## **I. Choix techniques**

## **II. Plasticité des cartes spatiales induite par le statut nutritionnel pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire**

## **III. Plasticité de la représentation temporelle d'une odeur alimentaire et d'une odeur non alimentaire**

## **IV. Signaux responsables de la plasticité spatiotemporelle de la représentation des odeurs chez les animaux à jeun : leptine et ECB**

Nous avons organisé cette discussion en trois parties. Nous avons d'abord discuté les choix techniques que nous avons effectués dans la mise au point de nos protocoles expérimentaux (partie I). Nous avons ensuite commenté les résultats que nous avons obtenus sur la plasticité des cartes olfactives obtenues en imagerie optique, et sur les modifications de profil oscillatoire obtenu en électrophysiologie (partie II). Dans les deux cas, nous avons proposé trois mécanismes (entrées sensorielles, inhibition latérale et retours centrifuges) qui seraient probablement à l'origine des changements que nous avons observés. Dans ce cadre, nous avons également consacré une discussion sur la nature alimentaire ou non alimentaire de l'odeur étudiée en comparant nos données avec la littérature. Nous avons enfin terminé cette discussion sur les résultats obtenus avec les deux candidats de signalisation que nous avons testés (partie III), la leptine en tant que signal périphérique, et les ECB en tant que nouveau signal central de la régulation de la prise alimentaire et de l'activité du BO.

## **I. Choix techniques**

En entreprenant cette thèse nous avons dû choisir et mettre au point un ensemble d'éléments techniques qui concernent la préparation des animaux (choix de l'odeur alimentaire, de la période de jeûne et de l'anesthésie), et l'acquisition des signaux fonctionnels dans le BO chez les animaux anesthésiés (choix de la technique d'imagerie optique et celle d'enregistrement des oscillations des LFP).

### **I.1. Choix de l'odeur alimentaire**

Comme nous l'avons vu au chapitre III sur la problématique de cette thèse, une question centrale des études sur les interactions olfaction/prise alimentaire est de comprendre si la plasticité olfactive due au statut nutritionnel était spécifique des odeurs alimentaires. Afin de pouvoir apporter notre contribution dans l'étude de la sélectivité aux odeurs alimentaires et non alimentaires, nous avons voulu tester une odeur d'aliment que les rats connaissent. Dans une première approche, nous avons commencé par l'odeur des croquettes habituelles des rats, une odeur alimentaire complexe difficile à préparer en un mélange homogène et qui donne rarement du signal exploitable en imagerie optique. Dans les rares cas où nous avons obtenu des cartes d'activation, elles n'étaient pas reproductibles d'un essai sur l'autre ou d'un animal à l'autre. Nous avons alors choisi de tester les effets d'odeurs que les rats apprennent à consommer dans leur alimentation. Après avoir essayé sans succès d'obtenir des cartes spatiales reproductibles avec des odeurs d'aliments commerciaux comme le beurre de cacahuètes ou la pâte d'arachide déjà étudiées dans la littérature (Rubin et Katz, 1999), nous avons essayé l'odeur d'arôme d'amande commercial qui donne des cartes qui ressemblent à l'odorant benzaldehyde, molécule qui sent effectivement l'amande. Avec cette odeur commerciale d'amande, nous avons pu obtenir à la fois des cartes reproductibles et des réponses électrophysiologiques détectables. Nous avons pu, avec succès, mener les rats à reconnaître l'odeur d'arôme d'amande comme étant une odeur alimentaire. Leur excitation, en présence de l'odeur seule, et leur consommation immédiate de l'aliment contenant

cette odeur, ont montré clairement que cette odeur était associée pour eux à un aliment. Cependant, le fait d'odoriser un aliment peut induire une augmentation de la prise alimentaire (Le Magnen, 1999a) et nous avons veillé à ce que tous les animaux ne reçoivent que des quantités minimales de la pâte odorisée que nous avons préparée (2 boulettes de 0,5 g chacune) afin de ne pas perturber leur balance énergétique. Il est à noter que dans ces conditions, cette odeur associée à la présence quotidienne d'une faible quantité de boulettes introduit également une notion de récompense. Or, le système olfactif et le circuit de la récompense sont étroitement connectés et ce dernier est naturellement impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, ce qui ne présente pas un obstacle majeur pour effectuer notre étude en utilisant ce protocole de reconnaissance de l'odeur alimentaire.

## **I.2. Choix de la période de jeûne**

Pour éviter le stress des animaux, nous avons réduit la durée du jeûne de 48 heures, habituellement utilisée au laboratoire NOeMI (Baly et al., 2007; Lacroix et al., 2008; Prud'homme et al., 2009), à 17 heures. Ce jeûne plus court a été validé par la mesure de la perte de poids des rats et par la mesure des taux de leptine et d'insuline qui sont semblables aux études précédentes (Baly et al., 2007; Lacroix et al., 2008).

## **I.3 Choix de l'anesthésie**

Nous avons travaillé sur des rats et des souris anesthésiés et avons dû choisir un protocole d'anesthésie qui permette d'observer à la fois des signaux en imagerie et en électrophysiologie. Nous avons opté pour l'injection d'un mélange d'anesthésiques composé d'un antagoniste alpha 2 adrénergique (médétomidine, Domitor) couplé à un antagoniste des récepteurs NMDA (kétamine, Imalgène). Pour l'étude des oscillations chez les souris injectées avec du THC, nous avons tenté d'utiliser ce mélange mais la perte ou le mauvais niveau d'anesthésie des souris nous a poussé à remplacer la médétomidine par un autre antagoniste alpha 2 adrénergique moins sélectif et classiquement utilisé, la xylazine (Rampun).

## **I.4. Choix de la technique d'imagerie optique *in vivo***

Comme nous l'avons décrit dans la deuxième partie du chapitre I, il existe plusieurs techniques d'imagerie fonctionnelle permettant la visualisation des cartes d'activation spatiale dans le BO. Le laboratoire IMNC étant spécialisé dans les imageries optiques, nous avons choisi d'utiliser l'IOSI chez l'animal anesthésié pour mesurer des signaux endogènes liés à l'état d'oxygénation et du volume sanguin (Rubin et Katz, 1999 ; Gurden et al., 2006). L'IOSI présente l'avantage par rapport à l'IRM d'avoir une meilleure résolution spatiotemporelle même si elle ne permet de visualiser que la partie dorsale du BO. L'imagerie calcique chez l'animal en contention (Verhagen et al., 2007) présente une meilleure résolution que l'IOSI et a l'énorme avantage de pouvoir être appliqué chez le rat éveillé mais elle n'est pas encore disponible au laboratoire, qui a choisi de développer plutôt l'enregistrement

des signaux endogènes autofluorescents provenant des flavoprotéines mitochondriales comme signal cellulaire.

### **I.5. Choix de la technique d'enregistrement des oscillations des LFP *in vivo***

Pour obtenir les enregistrements électrophysiologiques sur le même type de préparation que les enregistrements optiques réalisés chez le rat anesthésié à la kétamine/médétomidine, et ainsi pouvoir discuter des signaux spatiotemporels acquis dans les mêmes conditions chez les rats à jeun, nous avons acquis les LFP sur les animaux qui ont été soumis au même protocole d'anesthésie. Cependant, nous avons vu dans la troisième partie du chapitre I. consacrée à la représentation temporelle des odeurs que, pour comprendre les dynamiques temporelles liées à la stimulation odorante dans le BO, il serait pertinent d'observer à la fois l'activité unitaire et les oscillations, et ceci préférablement chez les animaux vigiles. La technique disponible au laboratoire au moment de ma thèse était l'enregistrement des oscillations sur une préparation en aigu, et nous l'avons appliquée dans le cadre de mon sujet de recherche même si depuis les enregistrements en chronique ont également commencé.

Enfin, comme nous comparons les activités spatiales et temporelles, il est à noter que les signaux électriques qui traduisent le mieux les activités vasculaires enregistrées en imagerie seraient ceux du LFP qui sont le reflet d'un traitement local (Logothetis et al., 2001 ; Logothetis, 2003), même si dans notre enregistrements ce sont deux étages du BO qui sont enregistrés.

## **II. Plasticité des cartes spatiales induite par le statut nutritionnel pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire**

Deux caractéristiques principales définissent les cartes spatiales chez les animaux à jeun (figure V.2, dans le chapitre V consacré aux résultats) : (i) un plus grand nombre de glomérules activés ; (ii) un meilleur rapport signal sur bruit à l'intérieur d'un glomérule, ce qui donne une forme circulaire bien mieux définie et moins diffuse que les chez les rats nourris. Nous allons avancer des hypothèses concernant ces deux caractéristiques : nous évoquerons d'abord trois voies d'interactions cellulaires dans le circuit du BO (partie II.1), puis nous émettrons l'hypothèse d'une modification spécifique des astrocytes glomérulaires (partie II.2). Nous terminerons par des perspectives d'études complémentaires en imagerie (partie II.3).

### **II.1. Hypothèses de mécanismes induisant la plasticité des cartes olfactives chez des rats à jeun**

Nous pouvons proposer trois voies complémentaires de régulation aux trois étages d'intégration du signal sensoriel dans le BO (figure VI.1. voies 1, 2, 3).

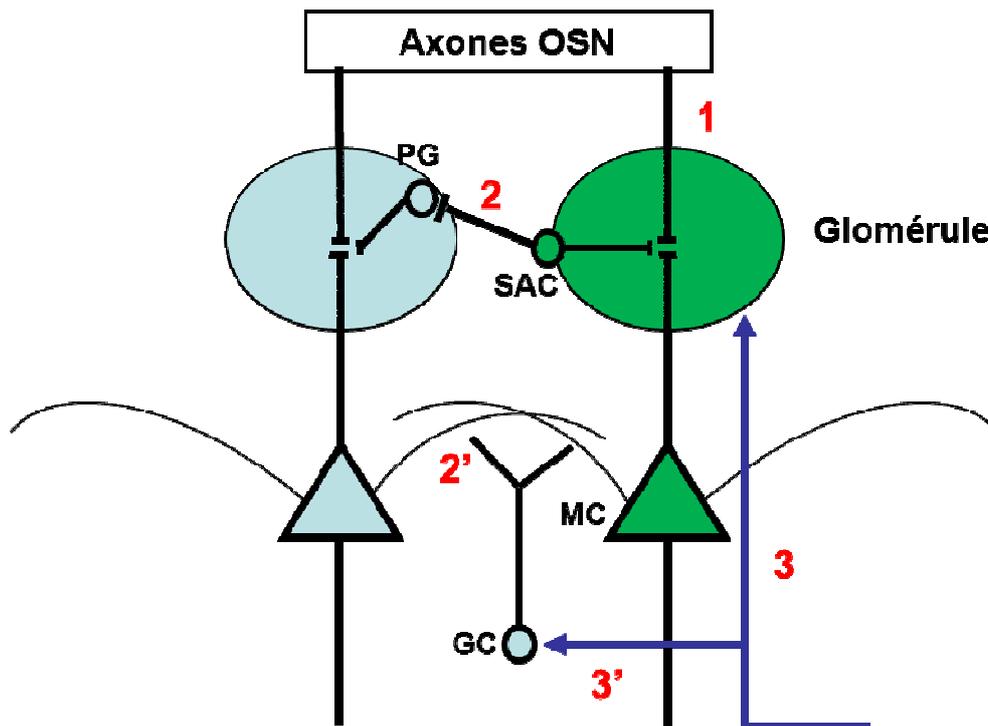
**Voie 1, entrées sensorielles.** Le signal obtenu par imagerie optique est, comme nous l'avons dit en introduction, d'origine présynaptique et nécessite la libération de glutamate présynaptique par les OSN (Gurden et al., 2006). L'augmentation de l'activité bulbaire induite par le jeûne que nous avons

observée par imagerie peut être due à la modulation de l'activité des OSN qui ne seraient plus inhibés par l'activité de la leptine ou de l'insuline. En effet, les taux plasmatiques de ces deux hormones sont plus faibles chez les animaux à jeun que chez les animaux nourris, conformément aux études menées précédemment par le laboratoire NOeMI (Baly et al., 2007; Lacroix et al., 2008). De plus, indépendamment des taux plasmatiques, les transcrits de ces deux peptides et leurs récepteurs sont modulés par le statut nutritionnel au niveau même de la MO (Baly et al., 2007; Lacroix et al., 2008). Ces peptides sont connus pour diminuer la réponse des OSN aux stimulations odorantes (Savigner et al., 2009), diminution observée notamment *in vitro* par l'action de la leptine sur le potentiel membranaire des OSN qui se produit rapidement en quelques minutes (Spanswick., 1997). Le jeûne augmente donc très probablement l'entrée sensorielle dans le BO, ce qui serait au moins en partie responsable de l'augmentation du nombre de glomérules détectés par IOSI induite par le jeûne.

**Voie 2, inhibition latérale interglomérulaire.** Cette théorie est basée sur le fait que les glomérules fortement activés inhibent les terminaisons synaptiques des OSN des glomérules adjacents et diminuent donc l'activité glomérulaire autour du glomérule principal activé par l'odeur afin d'améliorer le contraste signal sur bruit (Vucinić et al., 2006). La couche glomérulaire exprime des récepteurs à la leptine et aux orexines (Prud'homme et al., 2009) et les récepteurs aux orexines sont présents dans le glomérule au niveau des PGC, des ETC et des dendrites des M/TC (Hardy et al., 2005). De plus, les glomérules sont interconnectés par des PGC spéciaux, les SAC (Aungst et al., 2003). La balance favorable aux signaux de satiété chez les animaux nourris peut jouer en faveur d'une inhibition latérale inter-glomérulaire, qui serait supprimée par le jeûne et augmenterait le nombre de glomérules activés. Cette possibilité reste cependant peu probable car l'existence même d'une inhibition interglomérulaire a été remise en question récemment (McGann et al., 2005; Pérez & Wachowiak, 2008) : l'inhibition aurait davantage lieu à l'intérieur d'un même glomérule entre les fibres afférentes des OSN qu'entre glomérules et famille différentes de fibres. Une hypothèse alternative concernant les JC serait un rôle des astrocytes que nous verrons dans la partie II.2.

**Voie 3, retours centrifuges sur les JC.** Une autre explication très probable à cette plasticité des cartes spatiales vient du fait que les structures centrales peuvent exercer un retour centrifuge sur les glomérules (voir partie I.3 du chapitre I sur l'anatomie du BO) et réguler l'activité glomérulaire induite par les odeurs. Les afférences neuromodulatrices principales contiennent de la sérotonine, de la noradrénaline et de l'acétylcholine et ce sont notamment les afférences sérotoninergiques qui ont attiré l'attention en premier lieu puisque les PGC expriment les récepteurs à la sérotonine (Petzold et al., 2009) qui provient de neurones situés dans le tronc cérébral (Gracia-Llanes et al., 2010). Des études chez les souris SpH révèlent que l'activation des récepteurs à la sérotonine augmente l'activité des cellules JC inhibitrices et diminue donc les réponses SpH présynaptiques, alors que leur blocage par des antagonistes l'augmente (Petzold et al., 2009). Cependant, dans le contexte d'une régulation glomérulaire par une mise à jeun, la piste sérotoninergique ne semble pas la bonne dans la mesure où

la sérotonine est un facteur orexigène inhibé par la leptine (Yadav et al., 2009 et 2011) : si les effets que nous observons étaient dus à ces retours centrifuges chez les animaux à jeun qui exprimeraient plus de sérotonine que chez les animaux nourris, nous aurions moins d'activation des glomérules. L'effet d'autres neuromodulateurs, ou l'intégration de l'ensemble de ces systèmes modulateurs, restent des hypothèses valables pour expliquer la plasticité des cartes spatiales chez les rats à jeun.



**Figure VI.1. Représentation schématique des différentes voies capables d'induire une plasticité des représentations spatiales (au niveau glomérulaire) et temporelles (au niveau des interactions des M/TC/GC) chez les rats à jeun.** 1 : la voie d'entrée sensorielle. 2. inhibition latérale interglomérulaire. 3. retours centrifuges vers les glomérules. 2'. Inhibition latérale inter-colonnes. 3'. Retours centrifuges vers les GC. Les abréviations sont explicitées dans le texte.

## II.2. Les astrocytes glomérulaires : un candidat potentiel pour expliquer les changements de cartes olfactives chez les rats à jeun ?

Pour les deux odeurs testées, les cartes spatiales induites chez les animaux à jeun contiennent des zones activées qui présentent un signal très focal, débarrassé du halot diffus qui est visible sur les rats nourris (pour ceux qui ont pu répondre à la stimulation odorante). Cette meilleure résolution peut s'expliquer par un effet spécifique des astrocytes.

Plusieurs faisceaux convergeant de données nous permettent de penser que ces cellules gliales peuvent être responsables des changements du rapport signal/bruit : (i) les astrocytes sont fortement impliqués

dans la régulation du débit et du volume sanguin cérébral ( pour revue, Iadecola & Nedergaard, 2007) qui font partie des sources biophysiques du signal intrinsèque (Meister & Bonhoeffer, 2001) ; (ii) le signal intrinsèque est déclenché dans le BO par l'activité de libération présynaptique de glutamate et de l'activité astrocytaire de recapture du glutamate (Gurden et al., 2006 ; Petzold et al., 2008). (iii) l'absence de recapture perturbe l'activité oscillatoire (Martin et al., 2011 soumis). Les astrocytes glomérulaires sont donc au centre même de ces signaux fonctionnels que nous avons enregistrés chez les rats.

De plus, ils sont intimement connectés par des jonctions communicantes constituées spécifiquement des Cx 30 (résultats d'une collaboration de l'équipe MIO/IMNC : thèse de Lisa Roux, dans l'équipe de Christian Giaume de l'UMR7241 CNRS-INSERM U1050/Collège de France) : ils ne projettent pas sur les autres glomérules et forment un réseau spécifique de chaque glomérule. Or, nos résultats préliminaires montrent malgré une absence de variation de l'expression de la GFAP ou des transporteurs du glutamate GLAST et GLT1, que le jeûne pourrait induire une diminution des quantités de Cx 30 astrocytaires dans le BO. Les résultats non encore publiés de l'équipe MIO/IMNC dans le cadre de la thèse de Barbara L'Heureux soutenue fin 2009 concernaient l'étude d'une délétion des Cx 30 chez des souris Cx30-KO : chez ces souris, il existe un changement radical des cartes spatiales avec une augmentation du nombre de zones activées et une diminution du seuil d'activation.

Enfin, les astrocytes glomérulaires expriment des récepteurs à la leptine (Caillol et al., 2003 ; Prud'Homme et al., 2009), et pourraient très bien être pourvus d'autres récepteurs à des signaux (an)orexigènes. Nous verrons d'ailleurs plus bas, dans la partie IV.1. de la discussion consacrée à la leptine, que les astrocytes sont également des bons candidats pour expliquer l'impact local de cette hormone sur les réseaux du BO.

L'ensemble de ces données nous fait supposer que pendant l'activation glomérulaire chez les animaux nourris, les Cx 30 servent à transmettre le signal entre les astrocytes et activent un large réseau intraglomérulaire, connecté à toute l'arborisation vasculaire qui est complexe et très dense au niveau de la couche glomérulaire (Lecoq et al., 2009). Cette activation induit l'augmentation des volumes sanguins locaux autour des régions activées ce qui dépasse les contours glomérulaires et donnent un signal diffus, avec des images peu résolues (Meister et Bonhoeffer, 2001 ; Gurden et al. 2006). Si le jeûne induit une diminution des quantités de Cx 30 et donc une plus faible connexion inter-astrocytaire, l'activation à travers le réseau astrocytaire est moindre et l'augmentation des volumes sanguins autour des glomérules est moins étendue dans l'espace, ce qui génère des signaux plus résolus. Cependant, il faut noter que cette perte de fonction astrocytaire qui aboutirait, semble-t-il, à un gain de fonction sur le rapport signal/bruit glomérulaire ne peut être affirmée que s'il existe un impact sur le comportement des souris Cx30-KO. Celles-ci pourraient mieux détecter des basses

concentrations ou plus facilement distinguer deux odeurs. Ces hypothèses sont actuellement testées au cours des tâches d'apprentissage effectuées dans l'équipe MIO.

### **II.3. Perspectives d'étude en imagerie**

Pour la première fois à notre connaissance, nous avons montré au cours de nos expériences une plasticité des cartes spatiales représentant une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire. Nous avons utilisé des lots d'animaux différents, à jeun versus nourris, donc cette plasticité n'a pas été révélée chez le même groupe d'animaux étudiés en longitudinal. Une plasticité spatiale des cartes acquises en imagerie calcique des terminaisons présynaptiques des OSN dans les glomérules a été démontré en étude longitudinale chez les mêmes rats vigiles en contention et effectuant une tâche d'apprentissage de lick/no lick (Verhagen et al., 2007). Cependant, les rattes de cette étude n'étaient dans un statut nutritionnel particulier et c'est la fréquence de flairage qui a été montré comme élément déterminant de la plasticité des cartes olfactives. Ce paramètre de flairage avait été mimé dans des études antérieures effectuées par le même groupe qui forçait par double trachéotomie les animaux à flairer artificiellement (Spors et al., 2006). Dans nos expériences, la respiration des rats dans les deux groupes étudiés n'était pas contrôlée : ils respiraient librement sous anesthésie à une fréquence moyenne de 1 à 2 Hz. Aucune des études de la littérature en IOSI n'a d'ailleurs tenté de contrôler ce paramètre du fait de la dynamique temporelle faible du signal intrinsèque par rapport au signal calcique, mais également des perturbations que la double trachéotomie peut induire notamment en l'absence d'expiration active.

Nous avons montré que les cartes spatiales sont plus reproductibles en cas de jeûne qu'en cas de satiété. Ainsi, nous avons trouvé qu'à chaque concentration d'une odeur alimentaire ou non alimentaire présentée aux animaux à jeun, le même nombre de glomérules activés était observé, ce qui était très différent des animaux nourris qui répondaient sporadiquement aux basses concentrations. Ces résultats sont en accord avec des différences de seuil d'activation interindividuelles observées dans d'autres études sur la plasticité des cartes olfactives (Verhagen et al., 2007; Carey et al., 2009). Une étude passionnante serait de suivre les cartes olfactives représentant les odeurs nutritives chez des rats vigiles en imagerie calcique en réponse aux odeurs nutritives en changeant le statut nutritionnel des rats : la dynamique temporelle des activations glomérulaires serait ainsi analysée et comparée entre animaux à jeun et nourris.

### **III. Plasticité de la représentation temporelle d'une odeur alimentaire et d'une odeur non alimentaire**

Deux caractéristiques principales définissent les activités oscillatoires chez les animaux à jeun sous anesthésie que nous avons analysés et comparés aux rats nourris (figures V.3 à V.7, chapitre V consacré aux résultats) : (i) une baisse du seuil d'apparition des réponses oscillatoires pendant des stimulations d'odeurs à des concentrations faibles ; (ii) une absence dans les profils oscillatoires de

différences entre les réponses à l'odeur alimentaire et non alimentaire. Nous allons avancer des hypothèses concernant ces deux caractéristiques : nous comparerons d'abord les profils de réponses que nous avons enregistré aux données de la littérature (III.1), nous détaillerons ensuite trois voies susceptibles d'expliquer la plasticité de l'activité oscillatoire dans le BO en fonction du statut nutritionnel, et notamment l'absence de différence entre odeur alimentaire et non alimentaire, (partie III.2), puis nous émettrons les hypothèses de mécanismes d'action concernant la leptine et les ECB (partie III.3).

### **III.1. Changements des profils oscillatoires chez les rats à jeun**

**Activité basale.** Les caractéristiques des oscillations en activité spontanée dans le BO sont dépendantes de l'anesthésique utilisé. La plupart des données de la littérature ont été enregistrées sous uréthane, anesthésique avec lequel les signaux de LFP ne présentent pas de manière spontanée une oscillation dans la bande de fréquence gamma (Cenier et al., 2008, 2009; Courtiol et al., 2011). Au contraire, chez les rats anesthésiés avec un mélange de kétamine/médétomidine que nous avons étudiés, des bouffées gamma sont superposées au cycle respiratoire ; le signal se rapproche donc davantage de ce qui est obtenu chez l'animal éveillé (Martin et al, 2004), comme cela avait été montré auparavant (Fontanini & Bower 2005). De plus, les fréquences gamma atteignent 110-130 Hz (également observé par Neville et Haberly 2003) et sont donc plus élevées sous kétamine que sous uréthane (50-100Hz dans Neville & Haberly 2003, 40-80 Hz dans Cenier et al, 2009) ou que chez le rat éveillé (60-90 Hz dans Martin et al, 2004). Cependant, dans notre étude tous les groupes de rats étaient soumis aux mêmes doses d'anesthésiques, respiraient librement à une fréquence de 1 à 2 Hz et présentaient par conséquent les mêmes fréquences de gamma en activité spontanée sans présentation d'odeur. On aurait pu imaginer que les activités oscillatoires basales soient changées par l'état de jeun qui est installé depuis 17 heures mais il n'en est rien : cela est probablement dû à la trop faible activité des afférences du MO et des retours centrifuges qui sont impliqués d'après notre hypothèse dans la régulation de l'activité du BO. D'ailleurs chez le rat vigile l'activité spontanée du BO est inchangée chez les rats à jeun (Chabaud et al., 2000). En considérant l'ensemble de ces explications, nous ne pensons donc pas que ce facteur intervienne dans la différence de plasticité entre les rats à jeun et rassasiés sur les variations des oscillations gamma et bêta induites par l'odeur.

**Gamma et bêta.** Les réponses oscillatoires aux stimulations odorantes (hexanal et odeur alimentaire d'amande) que nous avons observées chez les rats à jeun sont caractérisées par une diminution de la puissance des oscillations dans la bande de fréquence gamma (100-130 Hz), pour toutes les odeurs et toutes les concentrations. Cette diminution du gamma pendant la présentation d'une odeur est caractéristique des profils obtenus chez les rats éveillés (Martin et al, 2004), elle est aussi rapportée chez l'animal anesthésié en réponse à l'hexanal par Aylwin et al. (2009). Dans nos enregistrements chez les rats à jeun, l'odeur alimentaire d'amande n'induit pas d'oscillations bêta, seul l'hexanal donne

une réponse caractérisée par une augmentation de la puissance dans cette bande de fréquence (fréquence) comme ce qui est observé chez les animaux éveillés (Martin et al., 2004; Martin et al., 2006; Chapuis et al., 2009 ; Lowry et Kay 2007) ou les animaux anesthésiés à l'uréthane (Cenier et al., 2008 et 2009; Courtiol et al., 2011). Cette augmentation n'a lieu que pour les fortes concentrations utilisées, 0,5 et 1 % pour les rats à jeun et 1% pour les nourris. Ceci va à l'encontre des résultats trouvés par d'autres études montrant que la fréquence bêta est favorisée par des faibles stimulations alors que le gamma est favorisé par les fortes stimulations (Courtiol et al., 2011; Neville & Haberly, 2003). Ces différences peuvent s'expliquer de deux manières : (i) dans notre étude, nous n'avons pas les mêmes profils de réponses que dans les études citées ou les rats sont anesthésiés en uréthane, et ces différences pourraient avoir une influence non seulement sur le gamma mais aussi sur le bêta (ii) une autre explication valable pourrait être que la faible concentration que nous utilisons reste infraliminaire pour induire l'augmentation du gamma alors qu'elle serait efficace pour induire une réponse bêta associée à une diminution de la fréquence gamma. Ainsi, l'augmentation de concentration de 0.5 à 1% d'hexanal induirait une réponse dans la bande bêta, mais ne serait pas suffisante pour changer le bêta en gamma. Une augmentation concomitante de gamma et de bêta pendant la présentation de l'odeur est possible puisque dans l'autre série d'expériences que j'ai menée au cours de ma thèse chez la souris injectée avec du THC l'augmentation de puissances dans les deux bandes de fréquence bêta et gamma sont observables en réponse à l'hexanal 5%. En accord avec notre hypothèse, d'autres études menées sur la souris dans notre laboratoire montrent que la stimulation avec une concentration plus faible d'hexanal (2%) induit seulement une augmentation du bêta (Martin et al., 2011, soumis).

### **III.2. Hypothèses de mécanismes induisant la plasticité des profils oscillatoires chez des rats à jeun pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire**

De façon similaire à la plasticité spatiale, nous commencerons par exposer les trois voies complémentaires de régulation aux trois étages d'intégration du signal sensoriel dans le BO qui expliqueraient la plasticité des réponses oscillatoires induites par le statut nutritionnel (figure VI.1. 1, 2', 3').

*Voie 1, entrées sensorielles.* L'activation des M/TC dépendent de deux principaux facteurs : l'intensité de la stimulation sensorielle afférente, et leur excitabilité que nous verrons avec la voie 2 plus bas (Chen et al., 2002). Elle induit l'activation des GC, et donc de la boucle M/TC/GC, lieu de génération des oscillations du LFP (pour revue Rojas-Libano & Kay, 2008). La présence d'une réponse oscillatoire à la stimulation à basse concentration chez les animaux à jeun peut donc être due à l'augmentation de l'entrée sensorielle des OSN dans les glomérules comme nous l'avons vu plus haut pour les mécanismes de plasticité de la représentation spatiale (partie II.1.) : chez les rats à jeun, la MO serait plus sensible à des concentrations basses d'odeur, ce qui entraînerait une modification de l'intensité de la stimulation sensorielle dans les glomérules, donc en entrée des colonnes de M/TC,

aboutissant ainsi à une diminution du seuil des réponses oscillatoires (Neville & Heberly, 2003 ; Cenier et al., 2008 ; Courtiol et al., 2011).

Les différences de seuil d'activation observées entre les animaux nourris et à jeun sont également observées chez des animaux vigiles en comportement (Aimé et al., 2007). Ainsi, des animaux ayant associé un malaise gastrique à une odeur dans leur eau de boisson durant un protocole d'aversion olfactive conditionnée apprennent à éviter de consommer la boisson odorisée. Même chez des rats assoiffés, la détection de l'odeur entraîne l'évitement de la consommation de l'eau de boisson, et cet évitement est observé chez les animaux à jeun à de plus faibles concentrations que chez les animaux nourris (Aimé et al., 2007). Mimer l'état affamé chez des animaux nourris avec des injections i.c.v. d'orexine diminue les seuils de détection. D'un autre côté mimer l'état nourris par injection de leptine chez des animaux affamés augmente le seuil de détection et diminue les performances olfactives (Julliard et al., 2007). Logiquement, chez les animaux qui doivent trouver leurs aliments en comptant sur leur sens olfactif, il est utile d'avoir de meilleures performances olfactives.

***Voie 2, inhibition latérale entre les colonnes formées par les M/TC.*** En plus d'être à l'origine des oscillations gamma dans le BO, la boucle M/TC/GC serait également à l'origine du bêta, lorsque la régulation par les retours centrifuge est augmentée (Neville & Haberly 2003, Martin et al, 2004). Ceci implique que tout changement dans l'activité des M/TC et GC est susceptible de modifier les oscillations dans les deux bandes de fréquence. Ainsi, une plus forte activation des M/TC (Neville & Haberly, 2003) ou un renforcement de leurs effets sur les GC (Nusser et al., 2001) peut changer les réponses oscillatoires aux odeurs (Lepoussez et al., 2010).

Plusieurs études effectuées *in vitro* sur tranches de BO ont essayé de déterminer le rôle des peptides, signaux du statut nutritionnel, sur les interactions entre les M/TC et GC. Il en est ainsi pour les orexines par exemple. Les récepteurs aux orexines sont localisés sur les corps cellulaires des GC et M/TC et dans les synapses réciproques entre les deux types cellulaires (Hardy et al., 2005). Des études sur tranches ont montré que l'orexine A induisait principalement des hyperpolarisations des M/TC, qui sont supprimées par l'application de la TTX et donc des potentiels d'action au niveau de toute la tranche du BO. Ceci suggère que ces effets hyperpolarisant de l'orexine, que la plus part des cellules qui répondent à l'orexine expriment, ne sont pas dus à des actions des récepteurs présents sur les M/TC mais à des transmissions dépendantes de la dépolarisation des GC, causée par les orexines, qui en retour inhibent les M/TC (Hardy et al., 2005). Des récepteurs à la leptine sont également présents dans les couches MCL et GCL (Caillol et al., 2003 ; Prud'Homme et al., 2009) et des récepteurs à l'insuline ont été détectés, notamment dans des cultures de neurones bulbaires (Colley et al., 2004). Des résultats non publiés du laboratoire NOeMI en collaboration avec une équipe lyonnaise du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon montrent également l'existence des récepteurs à l'insuline dans ces deux couches (Thèse d'Agnès Savigner 2009).

L'insuline est un autre candidat qui pourrait agir sur la boucle M/TC/GC en régulant les canaux potassiques voltage-dépendant de type Kv qui inhibent les potentiels membranaires des neurones. En tranche de BO, les courants IA médiés par les Kv.1.3, qui sont des courants potassiques hyperpolarisants, sont inhibés par les phosphorylations dues à l'insuline ou au BDNF par exemple (Colley et al., 2004). Peu d'informations sont disponibles à ce jour sur les mécanismes moléculaire/cellulaire induits par la leptine sur les M/TC, mais leptine et insuline partageant les mêmes voies de signalisation, on peut penser que son action sur les neurones bulbaire soit similaire. Nous consacrerons une partie plus détaillée sur l'implication de la leptine sur l'activité bulbaire plus bas, dans la partie IV.1. de la discussion.

Ces études sur tranches permettent l'étude des effets des signaux de jeûne ou de satiété sur l'activité basale des neurones isolés et d'émettre des hypothèses quant à leur excitabilité et à leur capacité d'enclencher des réactions dans un réseau en mettant en jeu des actions d'excitation/inhibition (Hardy et al., 2005). Dans ces conditions particulières, loin de l'activité des réseaux *in vivo*, des effets étonnants sont décrits puisque l'excitation des neurones est décrite à la fois pour des facteurs orexigènes (orexine, Hardy et al., 2005) ou anorexigènes (insuline, Colley et al., 2004) alors qu'on s'attendrait à un effet inverse des deux signaux. En fait, le même signal anorexigène, comme le glucose ou la leptine par exemple, est capable de dépolariser certaines populations de neurones et d'hyperpolariser d'autres populations mais le pourcentage de recouvrement entre ces populations n'est pas encore connu. Il faudrait de plus effectuer des études par stimulation du nerf olfactif, ou mieux encore par décaillage de glutamate (glutamate uncaging) pour réduire la partie du réseau sollicitée par l'excitation, pour analyser de façon séquentielle sur le même neurone activé l'effet de la molécule anorexigène puis orexigène. Reste que l'un des principaux inconvénients de l'utilisation des tranches réside dans le fait que l'entrée sensorielle et les retours centraux, qui sont modifiés par le statut nutritionnel, sont sectionnés dans la tranche.

***Voie 3, retours centrifuges sur les GC et odeur alimentaire versus non alimentaire.*** Les fibres centrifuges jouent certainement un rôle très important dans la modulation de la représentation temporelle des odeurs par le statut nutritionnel. Comme nous l'avons vu dans la partie I.3 de l'introduction consacrée aux fibres centrifuges, en plus des retours des excitateurs massifs du cortex piriforme, le BO reçoit des projections modulatrices d'origine orexinergique, sérotoninergique, noradrenergique et acetylcholinergique.

Les études sur la représentation temporelle des odeurs, que ce soit sur le plan unitaire ou en LFP, montrent l'implication des retours centrifuges dans la reconnaissance sélective des odeurs alimentaires : des enregistrements multi-unitaires ont montré que la réponse aux odeurs des M/TC étaient augmentées uniquement pour les odeurs alimentaires en cas de jeûne de 24 heures (Pager et al., 1972). Cette modulation dépend des retours centraux puisqu'une lésion des voies centrifuges abolit

cette différence entre odeur alimentaire et odeur non alimentaire. De même, ces différences ont été observées en LFP : les rats à jeun depuis 16 heures répondent plus fortement que les rats rassasiés particulièrement dans la bande bêta (15-30 Hz) et ce sélectivement pour une odeur alimentaire (Chabaud et al., 2000). Ces réponses oscillatoires sont également observées au niveau des cortex olfactifs (cortex piriforme antérieur et postérieur, et entorhinal) ce qui renforce l'idée d'un effet important des retours centrifuges. De plus, le blocage de la voie cholinergique par la scopolamine abolit les différences entre une odeur d'aliment et une odeur neutre comme l'acétate d'isoamyl (Chabaud et al., 2000). Les auteurs de cette étude rapportent également un fait très important : chez les rats éveillés rassasiés, des stimulations successives avec l'odeur alimentaire induisent une baisse de la réponse à cette odeur, qualifiée par les auteurs « d'habituation ». Cette habituation n'est pas observée chez les animaux à jeun qui répondent toujours à l'odeur d'aliment. En revanche, dans le cortex entorhinal et le cortex piriforme postérieur la réponse à l'odeur augmente avec le nombre des stimulations. Le blocage par la scopolamine abolit ce maintien de la réponse bulbaire à plusieurs stimulations avec l'odeur alimentaire chez le rat à jeun.

Ces différentes études, que ce soit sur le plan unitaire ou du LFP, montrent (i) qu'il existe chez les animaux éveillés et affamés une réponse bulbaire augmentée sélectivement pour les odeurs de nourriture, qui n'est pas observable pour les odeurs neutres (ii) que cette sélectivité à l'odeur alimentaire est due aux retours centrifuges.

L'implication des retours centraux dans le maintien des oscillations bêta au cours des processus d'apprentissage (Martin et al., 2006, Chapuis et al, 2009) montrent qu'elles sont impliquées dans la mémorisation des odeurs, et leur association par apprentissage à une valence (récompense ou malaise gastrique). Au moins certaines odeurs alimentaires tomberaient naturellement dans cette catégorie de stimuli olfactifs.

Les retours centrifuges jouent un rôle très important dans l'augmentation de la réponse sélectivement pour des odeurs alimentaires chez les animaux éveillés et affamés. Chez les animaux anesthésiés, nous n'avons pas trouvé de différence entre l'odeur alimentaire et l'odeur non alimentaire, pour les deux odeurs le BO des animaux ayant subi 17 heures de jeûne répondent à de plus faibles concentrations que les animaux nourris *ad libitum*. De même, dans une étude menée sur la réponse des M/TC à différentes odeurs, Apelbaum et Chaput (2003) ne rapportent pas de sélectivité entre odeurs chez les animaux anesthésiés à l'uréthane suite à un jeûne de 22 heures. Ils expliquent cela par le fait que l'anesthésique semble diminuer le contrôle des interneurons sur les M/TC, contrôle nécessaire pour la réponse sélective des M/TC qui est observée chez le rat vigile.

#### **IV. Signaux responsables de la plasticité spatiotemporelle de la représentation des odeurs chez les animaux à jeun : leptine et ECB**

Afin d'expliquer les résultats sur la modification des profils oscillatoires de rats mis à jeun, nous avons analysé l'action des signaux de faim et de satiété sur les réseaux neuronaux bulbaires. Nous avons choisi la leptine comme molécule de signalisation produit en périphérie et agissant au niveau central et les ECB comme molécule de signalisation produit au niveau central. Nous verrons dans cette section les mécanismes qui peuvent expliquer l'absence de modulation des oscillations par la leptine (IV.1) et les voies de régulation de l'activité du BO par le THC et les ECB en général (IV.2).

##### **IV.1. Absence de modulation par la leptine**

La leptine, l'insuline et l'orexine ont des récepteurs au niveau du BO et peuvent modifier l'activité électrophysiologique des cellules bulbaires. Nous avons d'abord examiné les effets du jeûne sur la transcription des récepteurs à l'insuline et à la leptine dans le BO. La transcription des récepteurs de ces deux hormones change au niveau de la MO après 48 heures de jeûne (Baly et al., 2007; Lacroix et al., 2009). Nous avons donc effectué des RT-PCR quantitatives pour évaluer les effets d'un jeûne de 17 heures sur les quantités de transcrits pour les récepteurs bulbaires de ces différents signaux du statut nutritionnel (figure V.8, chapitre V consacré aux résultats). Aucune différence significative n'a été trouvée dans ces expériences, ce qui correspond aux résultats obtenues par les études menées suite à un jeûne de 48 heures (Prud'Homme et al., 2009). Des études précédentes du laboratoire NOeMI ont montré que la leptine et l'orexine modifiaient l'activité c-fos des neurones des différentes couches bulbaires (Prud'Homme et al., 2009). D'autres études ont montré que les effets du jeûne ou de la satiété sur les seuils d'activation étaient inversés par ces peptides, ainsi, comme nous l'avons évoqué plus haut, les animaux affamés détectent de plus faibles concentrations d'odeurs que les animaux nourris (Aimé et al., 2007). Ce phénomène peut être inversé par une simple injection de leptine chez des animaux affamés. Inversement, des animaux rassasiés qui reçoivent une injection i.c.v. d'orexine diminuent leur seuil de détection, comme s'ils étaient affamés (Julliard et al., 2007). Cette implication des systèmes de leptine et d'orexine dans la prise alimentaire qui passerait par une modulation du système olfactif nous a conduit à émettre l'hypothèse que les taux circulants de leptine et d'insuline, qui varient au cours du jeûne, peuvent être responsables des modifications des seuils d'activation observés dans nos études en imagerie et en électrophysiologie.

Etant donné le temps qui nous était imparti, nous ne pouvions tester les effets de ces deux molécules de signalisation. Nous avons choisi d'étudier les effets de la leptine (décrite dans la partie I.3.3. du chapitre II sur la régulation de la prise alimentaire). Cette hormone peut agir directement sur le BO mais peut également moduler l'activité du système orexinergique ainsi que d'autres systèmes de neurotransmetteurs impliqués dans la prise alimentaire (pour revue Ahima & Osei, 2004). Notre hypothèse était que la leptine devait augmenter le seuil de détection des animaux à jeun : nous l'avons

donc injecté par i.p. à des doses qui modifient le comportement alimentaire des rats à jeun (Wetzler et al., 2004) et nous avons effectué des stimulations par l'odeur de nourriture à une concentration à laquelle seuls les animaux à jeun testés sous anesthésie répondaient. Si l'hypothèse « leptine » était juste, les animaux à jeun qui répondaient à la stimulation d'odeur alimentaire d'amande à 2% auraient dû présenter, après injection de leptine, une perte de la réponse oscillatoire. Cependant, nous n'avons vu aucun effet de cette hormone à court terme sur l'effet de seuil que nous avons décrit chez les animaux à jeun.

#### **IV.1.1. Effet à court et à long terme de la leptine**

La leptine a deux effets possibles, l'un à court terme, l'autre à long terme.

L'effet à court terme est observé sur l'activité électrophysiologique des neurones en tranches quelques minutes après injection (Spanswick et al., 1997 ; Ahima & Osei, 2004) par modulation de nombreux canaux ioniques potassiques, pour revue (Harvey & Ashford, 2003). Il est présent chez les rats vigiles à jeun qui reçoivent l'injection de leptine une heure avant le test comportemental (Julliard et al., 2007).

L'action à long terme concerne les voies de phosphorylation qui peuvent agir sur des transcriptions de gènes. Il est connu que la leptine et même l'insuline induisent des modifications d'expressions de gènes, ainsi, par leur présence, la leptine et l'insuline peuvent bloquer l'expression des ARNm des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (revue Donato et al., 2010) mais aussi des éléments qui peuvent changer les propriétés électrophysiologiques : dans des cultures cellulaires gonadotropes de l'hypothalamus, il a été montré qu'une exposition de 48h à la leptine augmentait l'expression de canaux calciques (Avelino-Cruz et al., 2009). Le jeûne diminue les taux circulants de leptine et pourrait également affecter, à plus ou moins long terme, l'expression de canaux ioniques qui modifieraient le fonctionnement des réseaux. Ces pistes restent à explorer et les effets du jeûne sur l'expression de différents gènes pouvant réguler l'activité des réseaux neuronaux est encore incomplète.

Dans nos expériences, nous nous sommes placés dans des conditions permettant de tester les effets à court terme de la leptine car nous avons dû réduire la durée d'enregistrement après l'injection de leptine pour maintenir une anesthésie correcte des rats. En effet, ces tests ont été faits après de nombreuses sessions de stimulation olfactive, comprenant également des laps de temps conséquents sans stimulation.

#### **IV.1.2. Action locale de la leptine sur les astrocytes du BO versus action sur les structures envoyant les fibres centrifuges sur le BO**

Nous émettons ici l'hypothèse de l'existence d'une modulation de l'activité du BO par la leptine au niveau local, directement sur les astrocytes du BO, et au niveau central sur des structures qui envoient

des fibres centrifuges sur le BO. Ces deux régulations seraient en équilibre et régulées de manière différente chez les rats vigiles ou anesthésiés.

La piste de régulation locale de la leptine pourrait passer par les astrocytes. Ainsi, il est maintenant avéré que les astrocytes, en plus de ses nombreux rôles de régulation synaptique et énergétique (partie I.2.2. du chapitre 1), possèdent des récepteurs ObRs à la leptine. Les ObRs astrocytaires sont présents dans l'hypothalamus (Hsuchou et al., 2009) mais aussi dans le BO, notamment dans la couche glomérulaire (Prud'Homme et al., 2009). De façon très intéressante, ces récepteurs une fois activés induisent des vagues calciques inter-astrocytaires dans l'hypothalamus (Hsuchou et al., 2009). Or, nous avons alors émis l'hypothèse que l'activité astrocytaire puisse être affectée par le jeûne (baisse de l'expression des Cx30, voir la partie II.2 de la discussion sur la plasticité spatiale plus haut) ce qui pourrait très bien être dû à l'arrêt de l'activation des ObRs par la leptine qui chute pendant cette période à jeun.

Nous avons vu que l'anesthésique peut constituer un inhibiteur des retours centrifuges, notamment sur les synapses réciproques M/TC/GC et que cette inhibition pourrait expliquer l'absence d'effet spécifique du jeûne sur les odeurs alimentaires chez nos rats anesthésiés. Le fonctionnement altéré des retours centrifuges peut empêcher l'action de la leptine qui agit sur le NTS (Dallaporta et al., 2009) et surtout l'hypothalamus (Harvey & Ashford, 2003), deux structures qui projettent sur le BO. Parmi ces retours sur le BO, l'action inhibitrice de la leptine peut s'effectuer sur les neuropeptides orexigènes, comme les orexines mais aussi le NPY car selon des résultats récents en cours de rédaction au laboratoire NOeMI montre l'existence de récepteurs fonctionnels au NPY dans le BO.

Malgré toutes ces explications valables, il reste difficile d'expliquer avec les données bibliographiques actuelles le fait que la leptine n'ait pas pu inverser l'effet du jeûne sur le seuil d'activation du BO dans nos expériences. L'hypothèse d'une balance entre des effets locaux, notamment astrocytaires, et des effets centraux peut être posée mais des études sur les effets du jeûne sur l'expression des protéines astrocytaires doivent se poursuivre et devront être complétées par l'étude des afférences hypothalamiques au BO qui restent mal connues.

#### **IV.1.3. Perspectives d'étude en électrophysiologie**

Pour comprendre les effets des différents signaux orexigènes et anorexigènes sur la plasticité bulbaire chez des animaux à différents statuts nutritionnels, des études sur animaux vigiles restent nécessaires. Par exemple, au cours d'un protocole d'aversion olfactive conditionnée (Aimé et al., 2007) il serait passionnant d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques du LFP et/ou de l'activité unitaire chez des animaux implantés avec des électrodes à demeure. Cette étude ne permettra cependant pas de faire les différences entre les odeurs alimentaires et non alimentaires, dans la mesure où il est difficile d'installer une aversion avec un aliment consommé et qu'un aliment rendu aversif n'induit plus

d'augmentation sélective de la réponse des MC aux odeurs en réponse aux odeurs alimentaires (Pager & Royet, 1976). En s'inspirant de l'étude de Getchell et collaborateurs (2006), une expérience pourrait être menée sur la capacité des animaux à trouver leur nourriture à de faibles concentrations, chez des animaux affamés ou nourris, et comparer leur capacité pour trouver une nouvelle odeur. Cette étude pourrait également être combinée à des enregistrements électrophysiologiques et des tests pharmacologiques impliquant différents signaux orexigènes et anorexigènes.

## **IV.2. Modulation de l'activité du BO par les ECB**

### **IV.2.1. ECB et BO**

Au cours de cette thèse, nous avons également testé le rôle des ECB sur l'activité du BO dans un contexte où nos collaborateurs bordelais avaient montré une hyperphagie chez des souris mises à jeun pendant 24 heures et injectées en i.p. avec du THC à faible dose (1mg/kg) (Belloschio et al., 2010). Les résultats immunohistochimiques de nos collaborateurs montraient également que les CB1 sont exprimés présynaptiquement et majoritairement sur les fibres centrifuges glutamatergiques. Nous avons reproduit exactement le même protocole de jeûne afin de pouvoir corrélérer nos résultats électrophysiologiques à ces résultats comportementaux : nous avons mis à jeun des souris pendant 24 heures pour les amener approximativement à un même point de sensation de faim. Afin de savoir si l'hyperphagie est induite par un circuit qui inclut une activité du BO, nous avons testé chez des souris anesthésiées l'effet d'une injection d'un agoniste puissant des CB1, le THC, sur les réponses oscillatoires du BO.

Les effets hyperphagiques ont été observés par nos collaborateurs au bout d'une demi heure et duraient quatre heures : nous avons donc prolongé au maximum les séquences de stimulations pour observer d'éventuels changements dans les réponses oscillatoires avec un effet retardé du THC. L'injection i.p. de THC ne modifie pas le profil oscillatoire basal ni les réponses oscillatoires à une odeur nouvelle. Par contre, l'effet (inattendu) du THC sur les réponses olfactives a été la suppression de la désensibilisation aux stimulations répétées d'une forte concentration d'odeur. En effet, les animaux non injectés présentaient progressivement une réduction des réponses, et ne répondaient plus au bout de 40 minutes et après 40 stimulations avec la même odeur d'hexanal à 5%.

Cette habituation aux odeurs dans le système olfactif a été observée dans la littérature et a été étudiée chez les rats avec différents types de protocoles. Des études chez l'animal éveillé ont montré que des animaux nourris stimulés trois fois avec une odeur alimentaire ne répondaient plus à la stimulation alors que les animaux à jeun ne montraient pas cette habituation (Chabaud et al., 2000). Cette étude a également montré que cette levée de l'habituation sélective à l'odeur alimentaire était dépendante des retours centrifuges vers le BO. Cette habituation est également observée chez des animaux anesthésiés suite à des présentations longues d'odeurs non alimentaires, au niveau des réponses unitaires des

M/TC mais aussi les neurones du cortex piriforme (Wilson et al., 2000). Enfin un protocole d'habituation étalé sur plusieurs jours et avec une exposition de 20 minutes (Buonviso & Chaput, 2000; Buonviso et al., 1998) a également été réalisé, même s'il semble évident que des mécanismes d'apprentissage interviennent fortement dans les résultats obtenus.

#### **IV.2.2. Hypothèses concernant les mécanismes de désensibilisation induits par le THC**

Dans notre cas, nous avons constaté sur des animaux anesthésiés et affamés, une désensibilisation après des présentations successives d'odorants. Les animaux injectés en THC ne subissent pas cette désensibilisation et continuent de répondre aux stimulations odorantes, aussi fortement que lors des premières stimulations au bout de 40 minutes. Les explications possibles se situent comme pour la plasticité spatiotemporelle des représentations des odeurs alimentaires et non alimentaires chez le rat à jeun aux trois mêmes niveaux d'action qui sont complémentaires (figure VI.1).

**1. entrée sensorielle.** Les données sur les interactions entre ECB et MO ont été obtenues et publiées chez le Xénope (Breunig et al., 2010), mais les récepteurs CB1 sont également présents au niveau de la MO du rat (résultats non publiés du laboratoire NOeMI). Chez les larves de Xénope, les taux d'ECB, notamment 2-AG, sont plus élevés à jeûne. Le 2-AG augmente les réponses des OSN aux stimulations odorantes et réduit leur latence de réponses. Si le même effet est présent chez les mammifères, nous pouvons supposer que le THC injecté par voie systémique stimule la MO et garde sa capacité de réponse élevée pour les stimulations odorantes répétitives, ce qui lui permet de répondre plus longtemps à de multiples stimulations.

**2' interactions latérales entre colonnes de M/TC.** La présence de récepteurs CB1 au niveau des couches des M/TC et des GC a été montrée par nos collaborateurs bordelais. Des souris pour lesquelles le CB1 a été délété dans les neurones GABAergiques montrent un marquage au niveau de la couche des M/TC alors que le modèle de souris déficientes en CB1 dans les neurones glutamatergiques montre un marquage dans la couche des GC (pour les modèles transgéniques voir : Bellochio et al., 2010). Ceci laisse penser à une action d'inhibition de la libération de glutamate par les ECB, une libération qui serait freinée par les récepteurs CB1 présynaptiques. Cette hypothèse est confortée par une mesure effectuée sur des tranches de BO (Delgado & Jaffe., 2010) : la libération de GABA par les neurones bulbaires induite par la présence de glutamate dans le bain de perfusion est réduite en présence d'agonistes des récepteurs CB1 et augmentée par ses antagonistes.

**3' fibres centrifuges excitatrices.** Nous avons cité précédemment les résultats de nos collaborateurs bordelais qui suggèrent un effet direct des projections ECB dans le BO sur les récepteurs CB1 des GC et des M/TC, modulant ainsi l'activité de la boucle M/TC/GC et par conséquent les oscillations. En effet, en plus du BO, le diacylglycerol lipase alpha, une enzyme responsable de la synthèse des ECB, est fortement exprimée dans les différentes régions du système olfactif comme l'AON, le tractus

olfactif latéral ou le cortex piriforme (Suárez et al., 2011). L'effet du THC sur le BO pourrait être également indirect par la modulation d'autres retours centrifuges non-cannabinoïdes, mais dont l'activité peut être modulée par les ECB dans la mesure où ils présentent des récepteurs notamment de type CB1 comme le cortex piriforme (Cota et al., 2007) ou le NTS (Bermudez-Silva et al., 2010).

Dans notre modèle, nous avons constaté une absence de la désensibilisation de l'activité oscillatoire en réponse à l'odeur en présence de THC. Les réponses aux premières stimulations ne sont pas différentes chez les animaux injectés en THC ou en solution contrôle donc on imagine mal un effet direct sur la boucle M/TC/GC. Nous expliquons donc cet effet principalement par une modulation de l'activité des fibres centrifuges. Le rôle des retours centraux a préalablement été montré dans l'absence d'habituation à une odeur alimentaire : des animaux éveillés et nourris qui reçoivent trois stimulations successives avec une odeur alimentaire diminuent leur réponse oscillatoire à cette odeur alors que les animaux à jeun continuent de répondre sélectivement à l'odeur d'aliment (Chabaud et al., 2000). Cette levée de la désensibilisation sélective à l'odeur alimentaire dans le BO est sous-tendue par des retours centraux dans la mesure où leur blocage par la scopolamine, un antagoniste cholinergique, donne un profil semblable chez les animaux nourris et à jeun : son injection induit une habituation chez les animaux à jeun.

Une des façons de vérifier cette hypothèse serait de co-injecter dans le BO de souris du THC et de l'acétylcholine, pour voir si cette signalisation cholinergique peut être suffisante pour la sélectivité de la levée de l'habituation à l'odeur alimentaire. De plus, l'étude que nous avons menée chez la souris anesthésiée montrant une levée de l'habituation des réponses électrophysiologiques en réponse à la THC serait idéalement complétée par une étude comportementale mais l'habituation comportementale d'une souris à une odeur s'avère compliquée. Les tests comportementaux appliqués par nos collaborateurs s'avèrent non concluants, probablement pour des raisons de motivation de la souris affamée à sentir des odeurs neutres.

Si nous voulons replacer cette étude dans un contexte physiologique, les ECB sont augmentés par le jeûne et constituent un facteur orexigène puissant (Kirkham et al., 2002). Cet effet orexigène s'expliquerait hypothétiquement, au moins en partie, par la suppression de l'habituation aux odeurs alimentaires et donc l'augmentation la prise alimentaire, par exemple en maintenant un plaisir au goût. Cependant, d'autres études, notamment sur le sens gustatif, montrent que la satiété sensorielle se fait au niveau du cortex orbitofrontal, qui arrête de répondre à un stimulus sucré alors que le cortex primaire et le nerf gustatif continuent de transmettre l'information du goût de manière inchangée même après satiété (Rolls, 2005).

Cette théorie est controversée dans la mesure où, comme nous l'avons également exposé en introduction de cette thèse (partie III du chapitre II sur la régulation de la prise alimentaire), les ECB sont connus pour augmenter la sensibilité au goût sucré, inversement à la leptine (Yoshida et al.,

2010 ; Niki et al., 2010). Nous émettons ainsi l'hypothèse que le THC fait durer les perceptions sensorielles en donnant plus d'informations sur la palatabilité et en prolongeant la stimulation olfactive, ce qui est un facteur pouvant augmenter la prise alimentaire (Le Magnen, 1999a). Ou alors un prolongement de la phase où la stimulation olfactive est efficace augmente la durée pendant laquelle les aliments sont appétitifs, ce qui provoque un ralentissement de l'arrivée de l'effet de satiété et donc une phase de prise alimentaire plus longue.

#### **IV.3. Une vue intégrée des mécanismes de régulation de l'activité du BO à jeun**

Nos résultats obtenus en imagerie et électrophysiologie convergent parfaitement dans le fait que la représentation spatiale et temporelle des odeurs ont été modifiées dans le même sens par la mise à jeun : il existe dans les deux cas une baisse des seuils d'activation du BO en réponse à l'odeur alimentaire et à l'odeur non alimentaire. Comme il est supposé que les retours centrifuges sont bien plus massifs sur les GC que les JC, on aurait pu s'attendre à une plasticité différente des couches superficielles par rapport aux couches profondes, mais il n'en est rien. L'intégration de l'activité des OSN et des retours centraux donne donc un profil de plasticité homogène de réponses à travers les couches du BO. Dans cette partie de la discussion, nous voudrions décrire une vue d'ensemble de tous les mécanismes que nous avons décrits dans ce manuscrit en mettant en perspective la plasticité spatiotemporelle du BO dans un contexte physiologique général quand l'organisme est à jeun.

En périphérie, l'état de jeûne induit une diminution des signaux de satiété (tels que la leptine, l'insuline, le glucose et les acides gras) et augmente des signaux de faim comme la ghréline. Ces molécules modifient l'activité de la MO et du BO. Par exemple, la leptine diminuant la capacité des OSN à répondre aux odeurs, la baisse de ses taux circulants induirait donc l'augmentation des seuils d'activation des OSN. Par conséquent, les cartes d'activation spatiales enregistrées par un signal optique d'origine présynaptique dans le BO comprendraient davantage de modules activés chez les animaux à jeun que chez les animaux nourris. Cet effet de libération accrue de glutamate présynaptique activerait davantage les JC et les astrocytes glomérulaires qui expriment spécifiquement des récepteurs à la leptine. Les astrocytes présenteraient par ailleurs une diminution de leurs Cx 30 durant la mise à jeun, une diminution qui serait responsable d'une augmentation du rapport signal/bruit glomérulaire et également du plus grand nombre de glomérules activés. Une régulation de l'activité des JC par les retours centraux pourrait également avoir lieu.

Dans les couches plus profondes, l'augmentation de l'entrée sensorielle sur les M/TC provenant du niveau glomérulaire participerait à la réponse oscillatoire détectée dès les faibles concentrations d'odeurs chez les animaux à jeun. La boucle M/TC/GC serait régulée également par les signaux centraux et périphériques du statut nutritionnel capables de modifier directement par leurs récepteurs l'excitabilité des M/TC mais aussi par les retours centraux sur les GC. Les M/TC informeraient les autres structures corticales olfactives et limbiques (comme le cortex piriforme, l'amygdale ou

l'hypothalamus) qui possèdent également des récepteurs aux signaux du statut sensoriel : ces structures, via les fibres centrifuges afférentes au BO, pourraient participer à la plasticité de l'activité spatiotemporelle du BO en agissant sur les GC et les JC. Enfin, les récepteurs CB1 présynaptiques réguleraient spécifiquement la libération de transmetteur par les retours centrifuges glutamatergiques et auraient un impact sur la boucle M/TC/GC dans le sens d'une baisse de la désensibilisation des profils oscillatoires à la présentation répétée des odeurs, empêchant ainsi une inhibition de l'activité accrue du BO due au jeûne.

Le codage spatiotemporel constituant une information sur l'identité mais aussi l'intensité de l'odeur, le jeûne induirait des représentations spatiales et temporelles efficaces d'une stimulation odorante à très faible concentration ce qui permettrait d'augmenter l'intensité d'une stimulation qui serait infraliminaire dans un état de satiété. Nous formulons l'hypothèse que le jeûne met le système olfactif entier dans un état d'excitabilité qui lui permette d'accentuer le traitement d'une faible stimulation odorante afin d'une part faciliter la recherche de nourriture et d'autre part augmenter la palatabilité de cette nourriture une fois qu'elle est trouvée.

En conclusion, nos études montrent que le changement du statut nutritionnel, induit par un protocole de mise à jeun ou pharmacologiquement par une injection de facteur orexigène, modifie les réponses bulbaires aux odeurs. Cette modification affecte le seuil d'activation du BO et sa capacité à répondre à des stimulations répétitives, deux changements qui peuvent être impliqués séquentiellement dans la régulation prise alimentaire.

Tout d'abord, la baisse de seuil d'activation en cas de jeûne jouerait un rôle crucial pour la survie des animaux qui se basent sur le sens olfactif pour trouver leur nourriture car elle permettrait de détecter de loin une source de nourriture et de trouver de faibles quantités de nourriture. Ensuite, une fois la nourriture trouvée, la baisse de seuil et la plus faible désensibilisation des réponses dans le BO participeraient de façon efficace à la régulation de la prise alimentaire à court terme puisque les systèmes sensoriels donnent une information sur la palatabilité des aliments et augmentent la prise alimentaire pour des aliments palatables (voir partie IV du chapitre II sur la régulation de la prise alimentaire). La baisse de seuil de détection augmenterait la palatabilité et la valeur hédonique d'aliments qui peuvent paraître non palatables car faibles en saveur ou en odeurs à l'état rassasié. Les stimulations olfactives se répétant à chaque bouchée d'aliments ingérées par voie retro et ortho nasale, l'habituation pourrait s'installer très rapidement. Or dans le cas d'un animal affamé, les ECB sont élevés et maintiennent les stimulations olfactives et gustatives qui procurent un certain plaisir à consommer les aliments. L'arrêt de la prise alimentaire pourrait intervenir avec une baisse des taux d'ECB au fur à mesure que la satiété s'installe (voir partie II.2. du chapitre II sur la prise alimentaire) et l'habituation est enclenchée ce qui diminuerait le plaisir et la valeur hédonique des aliments renforçant ainsi la satiété.

# Conclusion

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux variations des seuils d'activation du BO en réponse à une odeur alimentaire et non alimentaire chez des rats à jeun comparés à des rats nourris. Nous avons étudié chez des rats anesthésiés les cartes spatiales de ces odeurs par imagerie optique intrinsèque et les réponses temporelles par enregistrements du LFP suite à des stimulations à de faibles concentrations. Pour les deux types d'odeurs, nous avons montré de façon convergente par les deux approches que les animaux à jeun répondaient à de plus faibles concentrations que les animaux nourris. Nous avons exploré les pistes moléculaires pouvant expliquer ces différences de seuil d'activation spatiotemporelle du BO des rats à jeun. Nous avons montré que le jeûne n'affectait pas les quantités de transcrits des récepteurs à la leptine dans le BO. De plus, nous n'avons pas observé d'effets de la leptine injectée en i.p. sur les oscillations induites par une odeur alimentaire dans le BO des rats à jeun. Parmi ces résultats, nous voudrions souligner que nous avons montré pour la première fois (i) qu'il existe une plasticité de la représentation spatiale des odeurs dans le BO induite par le statut nutritionnel (ii) que le système de signalisation hormonal par la leptine est incapable d'inverser les profils oscillatoires du BO des rats à jeun étudiés en aigu, suggérant l'importance des retours centrifuges dans les effets de cette hormone précédemment observés chez les animaux vigiles.

Dans une étude parallèle, nous avons exploré pour la première fois les effets sur le BO d'un nouveau système de signalisation contrôlant la prise alimentaire, le système des ECB. L'injection i.p. de THC, un agoniste puissant des récepteurs CB1 exprimés dans le BO inhibe la désensibilisation de l'activité oscillatoire du BO à des stimulations répétées d'une même odeur chez les souris anesthésiées. L'étude des effets du THC sur les réponses aux odeurs est une nouveauté dans le domaine de l'olfaction et ouvrira sans doute une voie très importante dans la compréhension de la modulation de la prise alimentaire par le système des ECB.

En conclusion, nos données sur la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le BO sont à même de poser les bases neurophysiologiques des résultats comportementaux qui montraient que le jeûne augmente les capacités olfactives. Cette augmentation passe donc au moins en partie par plasticité du signal olfactif traité au niveau du BO avec l'intégration de l'activité afférente provenant des OSN de la MO et de l'activité de contrôle exercé par les retours centrifuges. Ainsi, le jeûne mettrait fortement en éveil le système olfactif à la fois pour permettre la recherche de nourriture dans l'environnement mais aussi augmenter la palatabilité de la nourriture une fois que celle-ci est trouvée pour combler efficacement le déficit énergétique corporel.

# Références bibliographiques

- Abraham, N., Spors, H., Carleton, A., Margrie, T., Kuner, T., & Schaefer, A. (2004). Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron*, 44(5), 865-876. Elsevier. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/9737/>
- Adrian, B. Y. E. D. (1942). Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *Journal of Physiology* 100, 459-473.
- Ahima, R. S., & Osei, S. Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology & behavior*, 81(2), 223-41. doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.014
- Aimé, P., Duchamp-Viret, P, Chaput, M a, Savigner, a, Mahfouz, M., & Julliard, a K. (2007). Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behavioural brain research*, 179(2), 258-64. doi:10.1016/j.bbr.2007.02.012
- Albrecht J, Schreder T, Kleemann a M, et al. Olfactory detection thresholds and pleasantness of a food-related and a non-food odour in hunger and satiety. *Rhinology*. 2009;47(2):160-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19593973>.
- Ames, a. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain research. Brain research reviews*, 34(1-2), 42-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086186>
- Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. *The Yale journal of biology and medicine*, 24(2), 123-140.
- Anand, b. k., Chhina, g. s., Sharma, k. n., Dua, s., & Singh, b. (1964). activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *American Journal of Physiology*, 207, 1146-1154.
- Apelbaum, a F., & Chaput, M a. (2003). Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chemical senses*, 28(5), 389-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826535>
- Aroniadou-Anderjaska, V., Ennis, M, & Shipley, M T. (1999). Current-source density analysis in the rat olfactory bulb: laminar distribution of kainate/AMPA- and NMDA-receptor-mediated currents. *Journal of Neurophysiology*, 81(1), 15-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914263>
- Aroniadou-Anderjaska, V., Zhou, F. M., Priest, C. A., Ennis, M, & Shipley, M T. (2000). Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *Journal of Neurophysiology*, 84(3), 1194-1203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979995>
- Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(10), 1133-1145. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598490>
- Aungst, J. L., Heyward, P M, Puche, A C, Karnup, S. V., Hayar, A, Szabo, G, & Shipley, M T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*, 426(6967), 623-629. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668854>
- Avelino-Cruz, J. E., Flores, A., Cebada, J., Mellon, P. L., Felix, R., & Monjaraz, E. (2009). Leptin increases L-type Ca<sup>2+</sup> channel expression and GnRH-stimulated LH release in LbetaT2 gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 298(1-2), 57-65. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2659688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Axmacher, N., Mormann, F., Fernández, G., Elger, C. E., & Fell, J. (2006). Memory formation by neuronal synchronization. *Brain Research Reviews*, *52*(1), 170-182. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545463>
- Aylwin, M L, Aguilar, G. a, Flores, F. J., & Maldonado, P E. (2009). Odorant modulation of neuronal activity and local field potential in sensory-deprived olfactory bulb. *Neuroscience*, *162*(4), 1265-78. IBRO. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.05.051
- Bailey, M. S., & Shipley, M T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *Journal of Comparative Neurology*, *328*(4), 501-526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8429132>
- Baly, Christine, Aioun, J., Badonnel, Karine, Lacroix, Marie-Christine, Durieux, Didier, Schlegel, C., Salesse, Roland, et al. (2007). Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain research*, *1129*(1), 130-41. doi:10.1016/j.brainres.2006.10.030
- Banks, W. a. (2004). The many lives of leptin. *Peptides*, *25*(3), 331-8. doi:10.1016/j.peptides.2004.02.014
- Barres, B. a. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, *60*(3), 430-40. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Bathellier B, Lagier S, Faure P, Lledo P-M. Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*. 2006;95(4):2678-2691. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381804>.
- Bellocchio, L., Lafenêtre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, Nagore, Grandes, Pedro, Chaouloff, F., Piazza, P.V & Marsicano, G. (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature neuroscience*, *13*(3), 281-3. doi:10.1038/nn.2494
- Belluscio, L, & Katz, L C. (2001). Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *21*(6), 2113-22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245695>
- Bermudez-Silva, F. J., Viveros, M. P., McPartland, J. M., & Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *95*(4), 375-82. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.pbb.2010.03.012
- Beshel, J., Kopell, N., & Kay, Leslie M. (2007). Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(31), 8358-65. doi:10.1523/JNEUROSCI.1199-07.2007
- Bhalla, U S, & Bower, J M. (1997). Multiday recordings from olfactory bulb neurons in awake freely moving rats: spatially and temporally organized variability in odorant response properties. *Journal of computational neuroscience*, *4*(3), 221-56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257234>
- Bischofberger, J., & Jonas, P. (1997). Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells. *The Journal of physiology*, *504* ( Pt 2, 359-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843256>
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J., & Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *256*(2), 377-380. Academic Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079192>

- Bonvento, G., Sibson, N., & Pellerin, L. (2002). Does glutamate image your thoughts? *Trends in Neurosciences*, 25(7), 359-364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12079764>
- Bozza, T., McGann, J. P., Mombaerts, Peter, & Wachowiak, Matt. (2004). In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron*, 42(1), 9-21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066261>
- Breunig, E., Manzini, I., Piscitelli, F., Gutermann, B., Marzo, V. D., Schild, Detlev, & Czesnik, D. (2010). The Endocannabinoid 2-Arachidonoyl-Glycerol Controls Odor Sensitivity in Larvae of *Xenopus laevis*. *Molecular Physiology*, 30(26), 8965- 8973. doi:10.1523/JNEUROSCI.4030-09.2010
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840504>
- Buonviso, N, & Chaput, M. (2000). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*, 95(2), 325-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658611>
- Buonviso, N, & Chaput, M. A. (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. *Journal of Neurophysiology*, 63(3), 447-454. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2329354>
- Buonviso, N, Gervais, R, Chalansonnet, M., & Chaput, M. (1998). Short-lasting exposure to one odour decreases general reactivity in the olfactory bulb of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 10(7), 2472-2475. Retrieved from <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046%2Fj.1460-9568.1998.00266.x>
- Buonviso, Nathalie, Amat, C., & Litaudon, P. (2006). Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chemical senses*, 31(2), 145-54. doi:10.1093/chemse/bjj010
- Buonviso, Nathalie, Amat, C., Litaudon, P., Roux, Stephane, Royet, J.-P., Farget, Vincent, & Sicard, G. (2003). Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1811-1819. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02619.x
- Burdakov, D., Jensen, L. T., Alexopoulos, H., Williams, R. H., Fearon, I. M., O'Kelly, I., Gerasimenko, O., et al. (2006). Tandem-pore K<sup>+</sup> channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron*, 50(5), 711-22. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.032
- Buzsáki, G. (2010). Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron*, 68(3), 362-85. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.023
- Cabanac, M., & Duclaux, R. (1973). Olfactory-gustatory alliesthesia and food intake in humans. *Journal De Physiologie*, 66(2), 113-135.
- Caillol, Monique, Aïoun, J., Baly, Christine, Persuy, M.-A., & Salesse, Roland. (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 research*, 960(1-2), 48-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505657>
- Carey, R. M., Verhagen, J. V., Wesson, D. W., Pérez, N., & Wachowiak, Matt. (2009). Temporal Structure of Receptor Neuron Input to the Olfactory Bulb Imaged in Behaving Rats. *Journal of Neurophysiology*, 101(2), 1073-1088. American Physiological Society. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2657066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Canier, T., Amat, C., Litaudon, P., Garcia, S., Lafaye de Micheaux, P., Liquet, B., Roux, Stéphane, et al. (2008). Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of

- the anesthetized rat. *The European journal of neuroscience*, 27(6), 1432-40. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06123.x
- Cenier, T., David, F., Litaudon, P., Garcia, S., Amat, C., & Buonviso, Nathalie. (2009). Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. *The European journal of neuroscience*, 29(5), 921-30. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06651.x
- Chabaud, P, Ravel, N, Wilson, D. a, Mouly, a M., Vigouroux, M, Farget, V, & Gervais, R. (2000). Exposure to behaviourally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chemical senses*, 25(5), 561-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015328>
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, Etienne, & Charpak, Serge. (2003). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 13081-13086. National Academy of Sciences. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=240748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knöpfel, T., & Charpak, Serge. (2007). The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6452-6460. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567806>
- Chao, T. I., Kasa, P., & Wolff, J. R. (1997). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *Journal of Comparative Neurology*, 388(2), 191-210. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368837>
- Chapuis, J., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Ferreira, G., Gervais, Remi, & Ravel, Nadine. (2009). The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(33), 10287-98. doi:10.1523/JNEUROSCI.0505-09.2009
- Chaput, M. A. (1986). Respiratory-phase-related coding of olfactory information in the olfactory bulb of awake freely-breathing rabbits. *Physiology & Behavior*, 36(2), 319-324. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3961008>
- Chaput, M, & Holley, A. (1979). Spontaneous activity of olfactory bulb neurons in awake rabbits, with some observations on the effects of pentobarbital anaesthesia. *Journal De Physiologie*, 75(8), 939-948.
- Chaudhury, D., Escanilla, O., & Linstner, C. (2009). Bulbar Acetylcholine Enhances Neural and Perceptual Odor Discrimination. *Drugs*, 29(1), 52- 60. doi:10.1523/JNEUROSCI.4036-08.2009
- Chee, M. J. S., & Colmers, W. F. (2008). Y eat? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 24(9), 869-77. doi:10.1016/j.nut.2008.06.007
- Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., Weingarth, D. T., Adams, J. R., Frazier, E. G., Shen, Z., et al. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, 145(6), 2607-2612. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962995>
- Chen, W. R., & Shepherd, G M. (1997). Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Research*, 745(1-2), 189-196. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9037409>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>

- Chuang, K.-H., Belluscio, Leonardo, & Koretsky, Alan P. (2010). In vivo detection of individual glomeruli in the rodent olfactory bulb using manganese enhanced MRI. *NeuroImage*, 49(2), 1350-1356. Elsevier B.V. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800011>
- Chung, S., Parks, G. S., Lee, C., & Civelli, O. (2011). Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 43(1), 115-21. doi:10.1007/s12031-010-9411-4
- Colley, B., Tucker, K., & Fadool, D. A. (2004). Comparison of modulation of Kv1.3 channel by two receptor tyrosine kinases in olfactory bulb neurons of rodents. *Receptors channels*, 10(1), 25-36.
- Coopersmith R, Leon M. Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science*. 1984;225(4664):849-851. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/225/4664/849.short>.
- Cota, D., Steiner, M.-A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J. P., Grübler, Y., Stalla, J., et al. (2007). Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*, 148(4), 1574-81. doi:10.1210/en.2005-1649
- Courtiol, E., Amat, C., Thévenet, M., Messaoudi, B., Garcia, S., & Buonviso, Nathalie. (2011). Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. *PloS one*, 6(1), e16445. doi:10.1371/journal.pone.0016445
- Cury, K. M., & Uchida, Naoshige. (2010). Robust odor coding via inhalation-coupled transient activity in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 68(3), 570-585. Elsevier Inc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040855>
- Czesnik, D., Schild, Detlev, Kuduz, J., & Manzini, I. (2007). Cannabinoid action in the olfactory epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2967-2972. National Academy of Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301239>
- Dallaporta, M., Pecchi, E., Pio, J., Jean, a, Horner, K. C., & Troadec, J. D. (2009). Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *Journal of neuroendocrinology*, 21(1), 57-67. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01799.x
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(2):748-753. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15208&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Debarbieux, F., Audinat, E, & Charpak, S. (2003). Action potential propagation in dendrites of rat mitral cells in vivo. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5553-5560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843256>
- Deisig, N., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2010). Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *Journal of neurophysiology*, 103(4), 2185-94. doi:10.1152/jn.00342.2009
- De Jesús, M. L., Sallés, J., Meana, J. J., & Callado, L. F. (2006). Characterization of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity in postmortem human brain homogenates. *Neuroscience*, 140(2), 635-643. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563642>
- Delgado, A., & Jaff, E. H. (2011). Release from Rat Olfactory Bulb : Involvement of Endocannabinoids — Cannabinoids and Acute Stress Modulate GABA Release, 2011. doi:10.1155/2011/529851
- Derby, C. D. (2000). Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures. *Physiology & behavior*, 69(1-2), 203-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854930>

- De Saint Jan, D., & Westbrook, G. L. (2007). Disynaptic amplification of metabotropic glutamate receptor 1 responses in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 27(1), 132-140. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202480>
- Desmaisons, D., Vincent, J.-didier, & Lledo, P.-marie. (1999). Control of Action Potential Timing by Intrinsic Subthreshold Oscillations in Olfactory Bulb Output Neurons. *Solutions*, 19(24), 10727-10737.
- Dhawale, A. K., Hagiwara, A., Bhalla, Upinder S, Murthy, Venkatesh N, & Albeanu, Dinu F. (2010). Non-redundant odor coding by sister mitral cells revealed by light addressable glomeruli in the mouse. *Nature Neuroscience*, 13(11), 1404-1412. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nn.2673
- Di Prisco, G. V., & Freeman, W. J. (1985). Odor-related bulbar EEG spatial pattern analysis during appetitive conditioning in rabbits. *Behavioral Neuroscience*, 99(5), 964-978. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3843313](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3843313)
- Donato, J., Frazão, R., & Elias, C. F. (2010). The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*, 54(7), 591-602. SBEM-SOC BRASIL ENDOCRINOLOGIA & METABOLOGIA. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159253>
- Dong, H.-W., Heinbockel, T., Hamilton, K. A., Hayar, Abdallah, & Ennis, Matthew. (2009). Metabotropic glutamate receptors and dendrodendritic synapses in the main olfactory bulb. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1170, 224-238. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686141>
- Doucette, W., & Restrepo, Diego. (2008). Profound context-dependent plasticity of mitral cell responses in olfactory bulb. *PLoS biology*, 6(10), e258. doi:10.1371/journal.pbio.0060258
- Doucette, W., Gire, D. H., Whitesell, J., Carmean, V., Lucero, M. T., & Restrepo, Diego. (2011). Associative cortex features in the first olfactory brain relay station. *Neuron*, 69(6), 1176-87. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.024
- Doving, K. B., & Trotier, D. (1998). Structure and function of the vomeronasal organ. *Journal of Experimental Biology*, 201(21), 2913-2925. Co Biol. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9866877>
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., & Düfer, M. (2010). Electrophysiology of islet cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 654, 115-163.
- Dulac, C. (2000). The physiology of taste, vintage 2000. *Cell*, 100(6), 607-610. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=10761926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=10761926)
- Egaña, J. I., Aylwin, M L, & Maldonado, P E. (2005). Odor response properties of neighboring mitral/tufted cells in the rat olfactory bulb. *Neuroscience*, 134(3), 1069-1080. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994017>
- Egger, V., & Urban, N. N. (2006). Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Seminars in cell & developmental biology*, 17(4), 424-32. doi:10.1016/j.semcdb.2006.04.006
- Ennis, M, Zhou, F. M., Ciombor, K. J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A, Borrelli, E., Zimmer, L. A., et al. (2001). Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *Journal of Neurophysiology*, 86(6), 2986-2997. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731555>
- Fantana, A. L., Soucy, E. R., & Meister, Markus. (2008). Rat olfactory bulb mitral cells receive sparse glomerular inputs. *Neuron*, 59(5), 802-814. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786363>

- Fehm, H. L., Kern, W., & Peters, a. (2006). The selfish brain: competition for energy resources. *Progress in brain research*, 153(06), 129-40. doi:10.1016/S0079-6123(06)53007-9
- Feinstein, P., & Mombaerts, Peter. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117(6), 817-31. doi:10.1016/j.cell.2004.05.011
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211-8. doi:10.1038/35093026
- Fletcher, M L, Masurkar, A V, Xing, J, Imamura, F, Xiong, W, Nagayama, S., Mutoh, H., et al. (2009). Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 102(2), 817-830. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724327&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fletcher, Max L, & Wilson, Donald A. (2003). Olfactory bulb mitral-tufted cell plasticity: odorant-specific tuning reflects previous odorant exposure. *Journal of Neuroscience*, 23(17), 6946-6955. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2367229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Florant, G. L., Fenn, A. M., Healy, J. E., Wilkerson, G. K., & Handa, R. J. (2010). To eat or not to eat: the effect of AICAR on food intake regulation in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *The Journal of experimental biology*, 213(Pt 12), 2031-7. doi:10.1242/jeb.039131
- Fontanini, A., & Bower, James M. (2005). Variable coupling between olfactory system activity and respiration in ketamine/xylazine anesthetized rats. *Journal of neurophysiology*, 93(6), 3573-81. doi:10.1152/jn.01320.2004
- Freeman, W. J. (1960). Correlation of electrical activity of prepyriform cortex and behavior in cat. *Journal of Neurophysiology*, 23, 111-131.
- Freeman, W. J. (1978). Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 44(5), 586-605.
- Freeman, W. J., & Schneider, W. (1982). Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. *Psychophysiology*, 19(1), 44-56. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8986.1982.tb02598.x>
- Fried, H. U., Fuss, S. H., & Korsching, S. I. (2002). Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3222-3227. The National Academy of Sciences. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Friedrich, R. W. (2006). Mechanisms of odor discrimination: neurophysiological and behavioral approaches. *Trends in neurosciences*, 29(1), 40-7. doi:10.1016/j.tins.2005.10.004
- Fuentes, R. a, Aguilar, M. I., Aylwin, María L, & Maldonado, Pedro E. (2008). Neuronal activity of mitral-tufted cells in awake rats during passive and active odorant stimulation. *Journal of neurophysiology*, 100(1), 422-30. doi:10.1152/jn.00095.2008
- Fulton S, Pissios P, Manchon RP, et al. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*. 2006;51(6):811-822. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982425>.
- Garcia S, Fourcaud-Trocmé N. OpenElectrophy: An Electrophysiological Data- and Analysis-Sharing Framework. *Frontiers in neuroinformatics*. 2009;3(May):10. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Gardner, E. L., & Vorel, S. R. (1998). Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiology of Disease*, 5(6 Pt B), 502-533. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9974181>
- Gerozissis, K. (2008). Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *European journal of pharmacology*, 585(1), 38-49. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.050
- Gervais, Rémi, Buonviso, Nathalie, Martin, C., & Ravel, Nadine. (2007). What do electrophysiological studies tell us about processing at the olfactory bulb level? *Journal of physiology, Paris*, 101(1-3), 40-5. doi:10.1016/j.jphysparis.2007.10.006
- Getchell, T. V., Kwong, K., Saunders, C. P., Stromberg, A. J., & Getchell, M. L. (2006). Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.*, 87, 848-856.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2), 87-99. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087359>
- Goldman, S. a, & Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), 2390-4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=393826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gómez C, Briñón JG, Barbado MV, et al. Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2005;29(4):238-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927786> [Accessed August 2, 2011].
- Gracia-Llanes, F. J., Blasco-Ibáñez, J. M., Náchter, J., Varea, E., Liberia, T., Martínez, P., Martínez-Guijarro, F. J., et al. (2010). Synaptic connectivity of serotonergic axons in the olfactory glomeruli of the rat olfactory bulb. *Neuroscience*, 169(2), 770-780. Elsevier Inc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493930>
- Gray, C. M., & Skinner, J. E. (1988). Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Experimental Brain Research*, 69(2), 378-386.
- Grinvald, A, Lieke, E., Frostig, R. D., Gilbert, C. D., & Wiesel, T. N. (1986). Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 324(6095), 361-364. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v324/n6095/abs/324361a0.html>
- Grosmaître, X., Santarelli, L. C., Tan, J., Luo, M., & Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature Neuroscience*, 10(3), 348-354. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310245>
- Grossman, K. J., Mallik, A. K., Ross, J., Kay, Leslie M, & Issa, N. P. (2008). Glomerular activation patterns and the perception of odor mixtures. *The European journal of neuroscience*, 27(10), 2676-85. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06213.x
- Gurden, Hirac, Uchida, Naoshige, & Mainen, Z. F. (2006). Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron*, 52(2), 335-45. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.022
- Gómez, C., Briñón, J. G., Barbado, M. V., Weruaga, E., Valero, J., & Alonso, J. R. (2005). Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *Journal of chemical neuroanatomy*, 29(4), 238-54. doi:10.1016/j.jchemneu.2005.01.005

- Hallschmid, M., Benedict, C., Born, J., Fehm, H.-L., & Kern, Werner. (2004). Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiology & Behavior*, *83*(1), 55-64.
- Hanson, L. R., & Frey, William H. (2007). Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS. *Journal of neuroimmune pharmacology the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *2*(1), 81-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040829>
- Hanson, L. R., & Frey, William H. (2008). Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC neuroscience*, *9 Suppl 3*, S5. doi:10.1186/1471-2202-9-S3-S5
- Hardy, A. B., Aïoun, J., Baly, Christine, Julliard, K. a, Caillol, Monique, Salesse, Roland, & Duchamp-Viret, Patricia. (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*(9), 4042-53. doi:10.1210/en.2005-0020
- Harvey, J., & Ashford, M. (2003). Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology*, *44*(7), 845–854. Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390803000765>
- Harvey, J., Hardy, S. C., Irving, a J., & Ashford, M. L. (2000). Leptin activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> (KATP) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *The Journal of physiology*, *527 Pt 1*, 95-107. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Harvey, J., McKenna, F., Herson, P. S., Spanswick, D., & Ashford, M. L. (1997). Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *The Journal of physiology*, *504 ( Pt 3)*, 527-35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1159957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hayar, Abdallah, Karnup, S., Shipley, Michael T, & Ennis, Matthew. (2004). Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *Journal of Neuroscience*, *24*(5), 1190-1199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762137>
- Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological Reviews*, *86*(3), 1009-1031. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816144>
- Heale, V. R., Vanderwolf, C. H., & Kavaliers, M. (1994). Components of weasel and fox odors elicit fast wave bursts in the dentate gyrus of rats. *Behavioural Brain Research*, *63*(2), 159-165.
- Heeger, D. J., & Ress, D. (2002). What does fMRI tell us about neuronal activity? *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(2), 142-151. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836522>
- Hsia, A. Y., Vincent, J.-didier, Lledo, P.-marie, Kiyokage, E., Pan, Y.-zhen, Shao, Z., Kobayashi, Kazuto, et al. (1999). Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology*, 1082-1085.
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., et al. (2009). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain : a journal of neurology*, *132*(Pt 4), 889-902. doi:10.1093/brain/awp029
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1369-1376. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nn2003

- Isaacson, J. S. (1999). Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron*, 23(2), 377-384. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399942>
- Itoh, K., Sakata, M., Watanabe, M., Aikawa, Y., & Fujii, H. (2008). The entry of manganese ions into the brain is accelerated by the activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 154(2), 732-40. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.080
- Jamshidi, N., & Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British journal of pharmacology*, 134(6), 1151-1154. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1573067&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jiang, T., Soussignan, R., Rigaud, D., Martin, S., Royet, J.-pierre, Brondel, L., & Schaal, B. (2008). Physiology & Behavior Alliesthesia to food cues : Heterogeneity across stimuli and sensory modalities. *Physiology & Behavior*, 95, 464-470. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.014
- Johnson, Brett A, & Leon, M. (2007). Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, 503(1), 1-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213457/>
- Johnson, Brett A, Ho, S. L., Xu, Z., Yihan, J. S., Yip, S., Hingco, Edna E, & Leon, M. (2002). Functional mapping of the rat olfactory bulb using diverse odorants reveals modular responses to functional groups and hydrocarbon structural features. *Journal of Comparative Neurology*, 449(2), 180-194. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115688>
- Julliard, a K., Chaput, M a, Apelbaum, a, Aimé, P., Mahfouz, M., & Duchamp-Viret, P. (2007). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behavioural brain research*, 183(2), 123-9. doi:10.1016/j.bbr.2007.05.033
- Jyotaki, M., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2010). Modulation of sweet taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors. *Endocrine journal*, 57(6), 467-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431269>
- Karlsson, A. C., Lindroos, A. K., Lissner, L., Torgerson, J. S., Carlsson, B., Carlsson, L. M. S., & Sjöström, L. (2002). Evidence for gender-specific associations between leptin and olfaction. *The journal of genderspecific medicine JGSM the official journal of the Partnership for Womens Health at Columbia*, 5(6), 25-32.
- Kashiwadani, H., Sasaki, Y. F., Uchida, Naoshige, Mori, Kensaku, Kay, Leslie M, Lazzara, P., Wang, X.-jing, et al. (2011). Synchronized Oscillatory Discharges of Mitral / Tufted Cells With Different Molecular Receptive Ranges in the Rabbit Olfactory Bulb Synchronized Oscillatory Discharges of Mitral / Tufted Cells With Different Molecular Receptive Ranges in the Rabbit Olfact. *Society*, 1786-1792.
- Kauer, John S. (2002). On the scents of smell in the salamander. *Nature*, 417(6886), 336-342. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015614>
- Kawai, F. (1999). Simulation analysis of effects of adrenaline on spike generation in olfactory receptor cells. *Chemical Senses*, 24(6), 701-704.
- Kay, L M, & Freeman, W. J. (1998). Bidirectional processing in the olfactory-limbic axis during olfactory behavior. *Behavioral Neuroscience*, 112(3), 541-553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9676972>
- Kay, Leslie M. (2003). Two species of gamma oscillations in the olfactory bulb: dependence on behavioral state and synaptic interactions. *Journal of Integrative Neuroscience*, 2(1), 31-44. Imperial College Press. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15011275](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15011275)

- Kay, Leslie M. (2005). Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3863-3868. National Academy of Sciences. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kay, Leslie M, & Laurent, Gilles. (1999). modulation of mitral cell activity in behaving rats. *America*, 1003-1009.
- Kay, Leslie M, & Stopfer, Mark. (2006). Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates. *Seminars in cell developmental biology*, 17(4), 433-442. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766212>
- Kay, Leslie M, Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Libano, D., & Kopell, N. (2009). Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends in neurosciences*, 32(4), 207-14. doi:10.1016/j.tins.2008.11.008
- Kay, Leslie M, & Beshel, J. (2010). A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *Journal of Neurophysiology*, 104(2), 829-839. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538778>
- Kepecs, A., Uchida, Naoshige, & Mainen, Z. F. (2006). The sniff as a unit of olfactory processing. *Chemical senses*, 31(2), 167-79. doi:10.1093/chemse/bjj016
- Kida, I., Xu, F., Shulman, R. G., & Hyder, F. (2002). Mapping at glomerular resolution: fMRI of rat olfactory bulb. *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(3), 570-576. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12210928>
- Kim, E.-K., Miller, I., Landree, L. E., Borisy-Rudin, F. F., Brown, P., Tihan, T., Townsend, C. A., et al. (2002). Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 283(5), E867-E879. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376313>
- Kirkham, Tim C, Williams, Claire M, Fezza, F., & Marzo, V. D. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British journal of pharmacology*, 136(4), 550-557. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1573386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kishi, T., & Elmquist, J. K. (2005). Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Molecular psychiatry*, 10(2), 132-46. doi:10.1038/sj.mp.4001638
- Kosaka, T., & Kosaka, K. (2011). "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neuroscience research*, 69(2), 93-9. doi:10.1016/j.neures.2010.10.002
- Lacroix, M-C, Badonnel, K, Meunier, N., Tan, F., Schlegel-Le Poupon, C., Durieux, D, Monnerie, R., et al. (2008). Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *Journal of neuroendocrinology*, 20(10), 1176-90. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01777.x
- Lagier, S., Carleton, Alan, & Lledo, P.-M. (2004). Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4382-4392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128852>
- Laurent, Gilles. (1996). Dynamical representation of odors by, (1987), 489-496.
- Laurie, D. J., Seeburg, P. H., & Wisden, W. (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 12(3), 1063-1076. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312132>

- Lazarini, F., & Lledo, P.-M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in Neurosciences*, 34(1), 20-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980064>
- Laziz, I., Larbi, a, Grebert, D., Sautel, M., Congar, P., Lacroix, M. C., Salesse, R, et al. (2011). Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium. *Neuroscience*, 172, 20-9. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.063
- Lecoq, J., Tiret, P., Najac, M., Shepherd, Gordon M, Greer, C. a, & Charpak, Serge. (2009). Odor-evoked oxygen consumption by action potential and synaptic transmission in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(5), 1424-33. doi:10.1523/JNEUROSCI.4817-08.2009
- Lehmkuhle, M. J., Normann, R. a, & Maynard, E. M. (2006). Trial-by-trial discrimination of three enantiomer pairs by neural ensembles in mammalian olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, 95(3), 1369-79. doi:10.1152/jn.01334.2004
- Lepousez G, Mouret A, Loudes C, Epelbaum J, Viollet C. Somatostatin contributes to in vivo gamma oscillation modulation and odor discrimination in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(3):870-875. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089895>.
- Levasseur, G., Baly, Christine, Grébert, D., Durieux, Didier, Salesse, Roland, & Caillol, Monique. (2004). Anatomical and functional evidence for a role of arginine-vasopressin (AVP) in rat olfactory epithelium cells. *European Journal of Neuroscience*, 20(3), 658-670.
- Levin, B. E. (2001). Glucosensing neurons do more than just sense glucose. *International journal of obesity and related metabolic disorders journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25 Suppl 5, S68-S72. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840219>
- Li, C., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2011). Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacology & therapeutics*, 129(3), 307-20. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.10.006
- Lin, D. Y., Shea, S. D., & Katz, Lawrence C. (2006). Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron*, 50(6), 937-49. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.021
- Linster, C., Johnson, B A, Yue, E., Morse, A., Xu, Z., Hingco, E E, Choi, Y., et al. (2001). Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9837. Soc Neuroscience. doi:10.1523/JNEUROSCI.1219-03.2004
- Linster, C., Johnson, Brett A, Morse, A., Yue, E., & Leon, M. (2002). Spontaneous versus Reinforced Olfactory Discriminations. *Animal Cognition*, 22(16), 6842-6845.
- Lledo, P.-M., & Lazarini, F. (2007). Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system. *Comptes rendus biologiques*, 330(6-7), 510-20. doi:10.1016/j.crv.2007.01.002
- Logothetis, N. K. (2003). The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), 3963-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764080>
- Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., & Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*, 412(6843), 150-157. doi:10.1038/35084005
- Lohr, C., Thyssen, A., & Hirnet, D. (2011). Extrasynaptic neuron-glia communication: The how and why. *Communicative & integrative biology*, 4(1), 109-11. doi:10.4161/cib.4.1.14184
- Louis-Sylvestre, J. (1991). Régulation métabolique de l'ingestion chez les monogastriques. *Reproduction Nutrition Développement*, 31(3), 189-203. doi:10.1051/rnd:19910301

- Lowry, C. A., & Kay, Leslie M. (2007). Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. *Journal of Neurophysiology*, 98(1), 394-404. Am Physiological Soc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442770>
- Luquet, S., Gaudel, C., Holst, D., Lopez-Soriano, J., Jehl-Pietri, C., Fredenrich, A., & Grimaldi, P. a. (2005). Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochimica et biophysica acta*, 1740(2), 313-7. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.011
- Macht, M. (1999). Characteristics of Eating in Anger , Fear , Sadness and Joy Institute for Psychology ( I), University of Wu. *Psychology*, (1), 129-139.
- Macrides, F., Eichenbaum, H. B., & Forbes, W. B. (1982). Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *Journal of Neuroscience*, 2(12), 1705-1717. Citeseer. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.138.6427&rep=rep1&type=pdf>
- Le Magnen, J. (1956). Role of olfacto-gustatory stimulations in the mechanism of regulation of alimentary intake. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 10(3), 153-188.
- Le Magnen, J. (1999a). Increased food intake induced in rats by changes in the satiating sensory input from food (first published in French in 1956). *Appetite*, 33(1), 33-5. doi:10.1006/appe.1999.0257
- Le Magnen, J. (1999b). A role for caloric density of the diet in the mechanism of acquisition of appetites (first published in French in 1957). *Appetite*, 33(1), 17-20. doi:10.1006/appe.1999.0253
- Le Magnen, J. (1999c). Influence of hunger on the expression of discriminative appetite by the rat (first published in French in 1960). *Appetite*, 33(1), 52-4. doi:10.1006/appe.1999.0261
- Le Magnen, J. (2001). My scientific life: 40 years at the College de France. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(5), 375-94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566477>
- Le Magnen, J., & Julien, N. (1999a). Effects of postprandial administration of insulin on food intake by the white rat and the mechanism of appetite for energy (first published in French in 1956). *Appetite*, 33(1), 8-13. doi:10.1006/appe.1999.0251
- Le Magnen, J., & Julien, N. (1999b). Efficacy of olfactory, tactile and other food stimuli in the acquisition and manifestation of appetite in rats (first published in French in 1959). *Appetite*, 33(1), 43-51. doi:10.1006/appe.1999.0260
- Maher, B. J., Westbrook, G. L., & Benarroch, E. E. (2011). Co-Transmission of Dopamine and GABA in Periglomerular Cells Co-Transmission of Dopamine and GABA in Periglomerular Cells. *Journal of Neurophysiology*, (January 2008), 1559-1564. doi:10.1152/jn.00636.2007
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089886>
- Martin, B., Maudsley, S., White, C. M., & Egan, J. M. (2009). Hormones in the naso-oropharynx: endocrine modulation of taste and smell. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(4), 163-70. doi:10.1016/j.tem.2009.01.006
- Martin C, Grenier D, Thévenet M, et al. fMRI visualization of transient activations in the rat olfactory bulb using short odor stimulations. *NeuroImage*. (2007a);36(4):1288-1293. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512755>.
- Martin, C., Beshel, J., & Kay, Leslie M. (2007b). An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *Journal of Neurophysiology*, 98(4), 2196-2205. Retrieved from <http://jn.physiology.org/cgi/content/abstract/98/4/2196>

- Martin, C., Gervais, R., Hugues, E., Messaoudi, B., & Ravel, Nadine. (2004). Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: A correlate of odor recognition? *The Journal of neuroscience*, 24(2), 389. Soc Neuroscience. doi:10.1523/JNEUROSCI.3433-03.2004
- Martin, C., Gervais, Rémi, Messaoudi, B., & Ravel, Nadine. (2006). Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *The European journal of neuroscience*, 23(7), 1801-10. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04711.x
- Di Marzo, Vincenzo. (2009). The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological research the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 60(2), 77-84. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559360>
- Masse, N. Y., Turner, G. C., & Jefferis, G. S. X. E. (2009). Olfactory information processing in Drosophila. *Current biology : CB*, 19(16), R700-13. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.cub.2009.06.026
- Mattes, R. D. (1997). Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(4), 406-413. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822397001016>
- Mayer, J. (1996). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. 1953. *Obesity Research*, 4(5), 493-496.
- McGann, J. P., Pérez, N., Gainey, M. a, Muratore, C., Elias, A. S., & Wachowiak, Matt. (2005). Odorant representations are modulated by intra- but not interglomerular presynaptic inhibition of olfactory sensory neurons. *Neuron*, 48(6), 1039-53. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.031
- McLean, J. H., Shipley, M T, Nickell, W. T., Aston-Jones, G., & Reyher, C. K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 285(3), 339-349. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2547851](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2547851)
- Mclean, J. H., & Shipley, T. (1987). Serotonergic Afferents to the Rat Olfactory Bulb : I . Origins and Laminar Specificity of Serotonergic Inputs in the Adult Rat. *October*, 7(October).
- Meister, M, & Bonhoeffer, T. (2001). Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1351-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160406>
- Migrenne, S., Magnan, C., & Cruciani-Guglielmacci, C. (2007). Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes & metabolism*, 33(3), 177-82. doi:10.1016/j.diabet.2007.01.006
- Miro, J. L., Canguilhem, B., Schmitt, P., & Koch, A. (1982). Hyperphagia and obesity after olfactory bulbectomy performed at different times of the year in the European hamster. *Physiology & Behavior*, 29(4), 681-685.
- Mombaerts, P. (1999). Seven-Transmembrane Proteins as Odorant and Chemosensory Receptors. *Science*, 286(5440), 707-711. doi:10.1126/science.286.5440.707
- Mombaerts, P, Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., et al. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675-686. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929536>
- Mombaerts, Peter. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(4), 263-78. doi:10.1038/nrn1365

- Mongiati, L. a, & Schinder, A. F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *The European journal of neuroscience*, 33(6), 1055-61. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07603.x
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289-95. doi:10.1038/nature05026
- Morris RGM. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Research*. 1999;50(99):9230-9230. Mouret, A., Lepousez, G., Gras, J., Gabellec, M.-M., & Lledo, P.-M. (2009). Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(39), 12302-14. doi:10.1523/JNEUROSCI.3383-09.2009
- Mucignat-Caretta, C. (2010). The rodent accessory olfactory system. *Journal Of Comparative Physiology A Neuroethology Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 196(10), 767-777. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607541>
- Munakata, M., Kobayashi, Kaori, Niisato-Nezu, J., Tanaka, S., Kakisaka, Y., Ebihara, T., Ebihara, S., et al. (2008). Olfactory stimulation using black pepper oil facilitates oral feeding in pediatric patients receiving long-term enteral nutrition. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 214(4), 327-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441508>
- Neville, K. R., & Haberly, L. B. (2003). Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *Journal of neurophysiology*, 90(6), 3921-30. doi:10.1152/jn.00475.2003
- Nicoll, R. A. (1971). Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb. *Brain Research*, 35(1), 137-149.
- Niki M, Yoshida R, Takai S, Ninomiya Y. Gustatory signaling in the periphery: detection, transmission, and modulation of taste information. *Biological pharmaceutical bulletin*. 2010;33(11):1772-1777. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/33.1772?from=Google>.
- Nissant, A., & Pallotto, M. (2011). Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb--from synapses to function. *The European journal of neuroscience*, 33(6), 1069-77. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07605.x
- Nusser, Z., Kay, L M, Laurent, G, Homanics, G. E., & Mody, I. (2001). Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *Journal of neurophysiology*, 86(6), 2823-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731539>
- Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., & Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nature Medicine*, 9(6), 756-761.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., & Rossetti, L. (2002). Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake, 271-275.
- Oka Y, Takai Y, Touhara K. Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience. 2009;29(39):12070-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19793965> [Accessed June 22, 2011].
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., & Wayner, M. J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*, 222(5190), 282-284.
- O'Doherty, J., Rolls, E T, Francis, S., Bowtell, R., McGlone, F., Kopal, G., Renner, B., et al. (2000). Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport*, 11(4), 893-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757540>

- Pager, J., & Royet, J. P. (1976). Some effects of conditioned aversion on food intake and olfactory bulb electrical responses in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 90(1), 67-77.
- 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. *Physiology & Behavior*, 9(4), 573-579.
- Pain, F., L'heureux, B., & Gurden, H. (2011). Visualizing odor representation in the brain: a review of imaging techniques for the mapping of sensory activity in the olfactory glomeruli. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. doi:10.1007/s00018-011-0708-4
- Pautler, R. G., Silva, A. C., & Koretsky, A P. (1998). In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 40(5), 740-748.
- Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., & Laurent, Gilles. (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 359-65. doi:10.1126/science.1070502
- Petzold GC, Hagiwara A, Murthy VN. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature neuroscience*. 2009;12(6):784-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430472> [Accessed July 18, 2011].
- Petzold, Gabor C, Albeanu, Dinu F, Sato, Tomokazu F, & Murthy, Venkatesh N. (2008). Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron*, 58(6), 897-910. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579080>
- Powis, J. E., Bains, J. S., & Ferguson, a V. (1998). Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *The American journal of physiology*, 274(5 Pt 2), R1468-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9644047>
- Powley, T. L., & Berthoud, H. R. (1985). Diet and cephalic phase insulin responses. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42(5 Suppl), 991-1002. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=3933326](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=3933326)
- Price, J. L., & Powell, T. P. (1970a). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *Journal of cell science*, 7(1), 91-123. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5476864>
- Price, J. L., & Powell, T. P. (1970b). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *Journal of cell science*, 7(3), 631-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5492279>
- Primeaux, S. D., Barnes, M. J., & Bray, G. A. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behavioural Brain Research*, 180(2), 190-196.
- Prud'homme, M. J., Lacroix, M. C., 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(4), 1287-98. IBRO. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.05.043
- Pírez, N., & Wachowiak, Matt. (2008). In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(25), 6360-71. doi:10.1523/JNEUROSCI.0793-08.2008
- Raineki, C, Pickenhagen, A., Roth, T. L., Babstock, D. M., McLean, J. H., Harley, C. W., Lucion, A. B., et al. (2010). The neurobiology of infant maternal odor learning. *Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas Sociedade Brasileira de Biofisica et al*, 43(10), 914-919.

- Rasmussen, E. B., & Huskinson, S. L. (2008). Effects of rimonabant on behavior maintained by progressive ratio schedules of sucrose reinforcement in obese Zucker (fa/fa) rats. *Behavioural Pharmacology*, *19*(7), 735-742.
- Ravel N, Elaagouby A, Gervais R. Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behavioral Neuroscience*. 1994;108(2):317-324. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037875>.
- Ravel, Nadine, Chabaud, Pascal, Martin, C., Gaveau, V., Hugues, E., Tallon-Baudry, Catherine, Bertrand, Olivier, et al. (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. *European Journal of Neuroscience*, *17*(2), 350-358. Wiley Online Library. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02445.x
- Reisert, J., Lai, J., Yau, K., & Bradley, J. (2005). Mechanism of the excitatory Cl<sup>-</sup> response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron*, *45*(4), 553-61. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.012
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, *79*(7), 1245-55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528109>
- Rinberg, D., Koulakov, Alex, & Gelperin, A. (2006). Sparse odor coding in awake behaving mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(34), 8857-65. doi:10.1523/JNEUROSCI.0884-06.2006
- Rodriguez, I. (2004). Pheromone receptors in mammals. *Hormones and behavior*, *46*(3), 219-30. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.03.014
- Rojas-Líbano, D., & Kay, Leslie M. (2008). Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cognitive neurodynamics*, *2*(3), 179-94. doi:10.1007/s11571-008-9053-1
- Rolls, B. J., Fedoroff, I. C., Guthrie, J. F., & Laster, L. J. (1990). Foods with different satiating effects in humans. *Appetite*, *15*(2), 115-126. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WB2-4FBRDH2-8W/2/51dc9c14769556dd68d4993a3ab17b47>
- Rolls, Edmund T. (2005). Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiology & behavior*, *85*(1), 45-56. doi:10.1016/j.physbeh.2005.04.012
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5907), 1551-5. doi:10.1126/science.1164022
- Roux, S. G., Garcia, S., Bertrand, B., Cenier, T., Vigouroux, Michel, Buonviso, Nathalie, & Litaudon, P. (2006). Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *Journal of neuroscience methods*, *152*(1-2), 173-8. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.09.004
- Rubin, B. D., & Katz, L C. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, *23*(3), 499-511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433262>
- Ruijschop, R. M. A. J., Boelrijk, A. E. M., De Graaf, Cees, & Westerterp-Plantenga, Margriet S. (2009). Retronasal aroma release and satiation: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(21), 9888-9894. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19817424>
- Savigner, A., Duchamp-Viret, Patricia, Grosmaître, X., Chaput, Michel, 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. *Journal of neurophysiology*, *101*(6), 2898-906. doi:10.1152/jn.91169.2008

- Schild, D., & Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiological reviews*, 78(2), 429-66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562035>
- Schulz, C., Paulus, K., & Lehnert, H. (2004). Central nervous and metabolic effects of intranasally applied leptin. *Endocrinology*, 145(6), 2696-2701. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016717>
- Schwartz, M. W., Woods, S C, Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671. Nature Publishing Group. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10766253](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766253)
- Scott, K., Brady, R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., & Axel, R. (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 104(5), 661-673. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257221>
- Shadlen, M. N., & Movshon, J. A. (1999). Synchrony unbound: a critical evaluation of the temporal binding hypothesis. *Neuron*, 24(1), 67-77, 111-125. Citeseer.
- Sharp, F. R., Kauer, J S, & Shepherd, Gordon M. (1977). Laminar Analysis of 2-Deoxyglucose Uptake in Olfactory-Bulb and Olfactory Cortex of Rabbit and Rat. *Journal of Neurophysiology*, 40(4), 800-813.
- Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer C a. The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain research reviews*. 2007;55(2):373-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434592> [Accessed July 5, 2011].
- Shipley, M T, Halloran, F. J., & De La Torre, J. (1985). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 329(1-2), 294-299. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3978450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3978450)
- Shiraishi, T., Sasaki, K., Nijjima, A., & Oomura, Y. (1999). Leptin effects on feeding-related hypothalamic and peripheral neuronal activities in normal and obese rats. *Nutrition Burbank Los Angeles County Calif*, 15(7-8), 576-579. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422089>
- Shusterman, R., Smear, M. C., Koulakov, Alexei a, & Rinberg, D. (2011). Precise olfactory responses tile the sniff cycle. *Nature neuroscience*, 14(8), 1039-1044. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nn.2877
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 53(2), 120-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466203>
- Singer, W. (1993). Neuronal representations, assemblies and temporal coherence. *Progress in Brain Research*, 95(0079-6123 (Print) LA - eng PT - Journal Article PT - Review SB - IM SB - S), 461-474. Retrieved from [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B7CV6-4RY60J1-1G&\\_user=10&\\_coverDate=12/31/1993&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=9969ff6290e29455e729862d934cd68e](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CV6-4RY60J1-1G&_user=10&_coverDate=12/31/1993&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=9969ff6290e29455e729862d934cd68e)
- Small, D. M., Gerber, J. C., Mak, Y. E., & Hummel, T. (2005). Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron*, 47(4), 593-605. doi:10.1016/j.neuron.2005.07.022
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al. The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry*. 1977;28(5):897-916. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/864466>.

- Solinas, M., & Goldberg, S. R. (2005). Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. *Neuropsychopharmacology*, *30*(11), 2035-2045. doi:10.1038/sj.npp.1300720
- Soucy, E. R., Albeanu, Dinu F, Fantana, A. L., Murthy, Venkatesh N, & Meister, Markus. (2009). Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nature neuroscience*, *12*(2), 210-20. doi:10.1038/nn.2262
- Spanswick, D., Smith, M. a, Groppi, V. E., Logan, S. D., & Ashford, M. L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, *390*(6659), 521-5. doi:10.1038/37379
- Spors, Hartwig, & Grinvald, Amiram. (2002). Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, *34*(2), 301-15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11970871>
- Spors, Hartwig, Wachowiak, Matt, Cohen, Lawrence B, & Friedrich, R. W. (2006). Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, *26*(4), 1247-1259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436612>
- Stewart, W. B., Kauer, J S, & Shepherd, G M. (1979). Functional-Organization of Rat Olfactory-Bulb Analyzed by the 2-Deoxyglucose Method. *Journal of Comparative Neurology*, *185*(4), 715-734.
- Stopfer, M, Bhagavan, S., Smith, B. H., & Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, *390*(6655), 70-4. doi:10.1038/36335
- Sullivan, R M, Stackenwalt, G., Nasr, F., Lemon, C., & Wilson, D A. (2000). Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behavioral Neuroscience*, *114*(5), 957-962. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short>
- Suzuki, K., Simpson, K. a, Minnion, J. S., Shillito, J. C., & Bloom, S. R. (2010). The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocrine journal*, *57*(5), 359-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424341>
- Suárez, J., Ortíz, O., Puente, N, Bermúdez-Silva, F. J., Blanco, E., Fernández-Llebrez, P., Grandes, P, et al. (2011). Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience*. IBRO. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.062
- Szollosi, A., Nenquin, M., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., & Henquin, J.-C. (2007). Glucose stimulates Ca<sup>2+</sup> influx and insulin secretion in 2-week-old beta-cells lacking ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry*, *282*(3), 1747-56. doi:10.1074/jbc.M609875200
- Tallon-Baudry, C, & Bertrand, O. (1999). Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(4), 151-162. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S1364-6613(99)01299-1
- Thomsen, K., Offenhauser, N., & Lauritzen, M. (2004). Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *The Journal of physiology*, *560*(Pt 1), 181-9. doi:10.1113/jphysiol.2004.068072
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V., & Frey, W H. (2004). Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, *127*(2), 481-96. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.029
- Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2010). Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15258-63. doi:10.1073/pnas.1003501107

- Tschöp, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, *407*(6806), 908-913. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057670>
- Uchida, N, Takahashi, Y. K., Tanifuji, M., & Mori, K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nature neuroscience*, *3*(10), 1035-43. doi:10.1038/79857
- Uchida, Naoshige, & Mainen, Z. F. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nature neuroscience*, *6*(11), 1224-9. doi:10.1038/nm1142
- Van Den Pol AN. Presynaptic metabotropic glutamate receptors in adult and developing neurons: autoexcitation in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 1995;359(2):253-271. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499528>.
- Varela, F. J. (1995). Resonant cell assemblies: a new approach to cognitive functions and neuronal synchrony. *Biological Research*, *28*(1), 81-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728823>
- Varela, F., Lachaux, J.-P., Rodriguez, E., & Martinerie, J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Neuroscience*, *2*(April), 229-239. Nature Publishing Group. doi:10.1038/35067550
- Vassar, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, *79*(6), 981-991. Elsevier. doi:10.1016/0092-8674(94)90029-9
- Verhagen, J. V., Wesson, D. W., Netoff, T. I., White, J. a, & Wachowiak, Matt. (2007). Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nature neuroscience*, *10*(5), 631-9. doi:10.1038/nm1892
- Vucinić, D., Cohen, Lawrence B, & Kosmidis, E. K. (2006). Interglomerular center-surround inhibition shapes odorant-evoked input to the mouse olfactory bulb in vivo. *Journal of neurophysiology*, *95*(3), 1881-7. doi:10.1152/jn.00918.2005
- Wachowiak, M, & Cohen, L B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*, *32*(4), 723-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719211>
- Wachowiak, M, & Cohen, L B. (1999). Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *Journal of Neuroscience*, *19*(20), 8808-8817. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516300>
- Wachowiak, Matt, & Cohen, Lawrence B. (2003). Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, *89*(3), 1623-39. doi:10.1152/jn.00747.2002
- Wachowiak, Matt, & Shipley, Michael T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in cell developmental biology*, *17*(4), 411-423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765614>
- Wachowiak, Matt, McGann, J. P., Heyward, Philip M, Shao, Z., Puche, Adam C, & Shipley, Michael T. (2005). Inhibition [corrected] of olfactory receptor neuron input to olfactory bulb glomeruli mediated by suppression of presynaptic calcium influx. *Journal of neurophysiology*, *94*(4), 2700-12. doi:10.1152/jn.00286.2005
- Wang, L., Saint-Pierre, D. H., & Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, *325*(1), 47-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023064>

- Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotero, V. E., & Routh, V. H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *Journal of neurophysiology*, *95*(3), 1491-8. doi:10.1152/jn.00697.2005
- Wetzler S, Dumaz V, Goubern M, Tomé D, Larue-Achagiotis C. Intraperitoneal leptin modifies macronutrient choice in self-selecting rats. *Physiology & Behavior*. 2004;83(1):65-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501492>.
- Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in neurobiology*. 2009;89(2):162–175. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008209000999> [Accessed August 5, 2011].
- Whittaker, J., Sørensen, H., Gadsbøll, V. L., & Hinrichsen, J. (2002). Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry*, *277*(49), 47380-4. doi:10.1074/jbc.M208371200
- Williams, C M, Rogers, P. J., & Kirkham, T C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiology & Behavior*, *65*(2), 343-346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855485>
- Williams, Claire M, & Kirkham, Tim C. (2002). Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiology & Behavior*, *76*(2), 241-250.
- Wilson, Donald A, Raineki, Charlis, Shionoya, K., Sander, K., & Sullivan, Regina M. (2000). Comparison of Odor Receptive Field Plasticity in the Rat Olfactory Bulb and Anterior Piriform Cortex Comparison of Odor Receptive Field Plasticity in the Rat Olfactory Bulb and Anterior Piriform Cortex. *Journal of Neurophysiology*, 3036-3042.
- Woods, Stephen C, & D'Alessio, D. a. (2008). Central control of body weight and appetite. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *93*(11 Suppl 1), S37-50. doi:10.1210/jc.2008-1630
- Xu, F., Greer, C A, & Shepherd, Gordon M. (2000). Odor maps in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, *422*(4), 489-495. doi:10.1002/1096-9861(20000710)422:4<489::AID-CNE1>3.0.CO;2-
- Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., Klemenhagen, K. C., et al. (2009). A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*, *138*(5), 976-89. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.cell.2009.06.051
- Yadav, V. K., Oury, F., Tanaka, K. F., Tanaka, K., Thomas, T., Wang, Y., Cremers, S., et al. (2011). Leptin-dependent serotonin control of appetite: temporal specificity, transcriptional regulation, and therapeutic implications. *The Journal of experimental medicine*, *208*(1), 41-52. doi:10.1084/jem.20101940
- Yang, X., Renken, R., Hyder, F., Siddeek, M., Greer, Charles A, Shepherd, Gordon M, & Shulman, R. G. (1998). Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7715-7720. The National Academy of Sciences. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yeomans, M. R. (2006). Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiology & behavior*, *89*(1), 10–14. Elsevier. Retrieved from [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031-9384\(06\)00170-3](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031-9384(06)00170-3)
- Yokoi, M., Mori, K, & Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(8), 3371-3375. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., et al. (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 935-9. doi:10.1073/pnas.0912048107
- Zac-Varghese, S. (2011). Hormonal Interactions Between Gut and Brain. *Brain*, 1-7.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236>
- Zibrowski, E. M., & Vanderwolf, C. H. (1997). Oscillatory fast wave activity in the rat pyriform cortex: relations to olfaction and behavior. *Brain Research*, 766(1-2), 39-49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9359585>
- Zijlstra, N, Mars, M, De Wijk, R A, Westtererp-Plantenga, M S, & De Graaf, C. (2008). The effect of viscosity on ad libitum food intake. *International journal of obesity 2005*, 32(4), 676-683. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18071342](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18071342)
- Zijlstra, Nicolien, De Wijk, René A, Mars, Monica, Stafleu, A., & De Graaf, Cees. (2009). Effect of bite size and oral processing time of a semisolid food on satiation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(2), 269-275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515731>

# Index des figures

## Chapitre I.

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure I.1.</b> Description anatomique du système olfactif.   | 13 |
| <b>Figure I.2.</b> Vue anatomique de la MO et des ses connexions au BO.  | 15 |
| <b>Figure I.3.</b> Organisation anatomique et types cellulaires dans le BO.  | 22 |
| <b>Figure I.4.</b> Cartes d'activation spatiale du BO visualisées avec différentes techniques se basant sur des signaux endogènes liés au métabolisme énergétique. | 31 |
| <b>Figure I.5.</b> Cartes d'activation spatiale du BO visualisées par des techniques d'imagerie optique utilisant des sondes exogènes de l'activité neuronale.     | 35 |
| <b>Figure I.6.</b> Caractéristiques de la représentation spatiale des odeurs visualisées par imagerie optique du signal intrinsèque.                               | 38 |
| <b>Figure I.7.</b> Dynamique temporelle des cartes d'activation visualisée par imagerie calcique.  | 42 |
| <b>Figure I.8.</b> Les oscillations du LFP dans le BO.   | 46 |
| <b>Figure I.9.</b> Les différentes oscillations du LFP dans le BO chez un rat anesthésié à l'uréthane.   | 47 |
| <b>Figure I.10.</b> Différentes réponses oscillatoires pour différents odorants chez le rat anesthésié.  | 50 |
| <b>Figure I.11.</b> Exemples de M/TC S+ et S-.   | 56 |
| <b>Figure I.12.</b> Réponses oscillatoires à une stimulation odorante (geraniol) chez un animal naïf et un animal expert dans une tâche go/nogo.                   | 59 |

## Chapitre II.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure II.1.</b> Représentation schématique illustrant les variations de glucose, d'insuline et de leptine en fonction des repas.  | 68 |
| <b>Figure II.2.</b> Interactions entre les différents noyaux et les différents systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus.  | 72 |
| <b>Figure II.3.</b> Interactions entre signaux périphériques et centraux régulant la prise alimentaire : l'exemple de la balance de l'effet de la leptine sur l'activité des noyaux ARC et HLA de l'hypothalamus. | 74 |
| <b>Figure II.4.</b> Schéma récapitulatif des signaux périphériques et des structures cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.  | 75 |
| <b>Figure II.5.</b> Les endocannabinoïdes : des messagers rétrogrades synthétisés sur le versant postsynaptique et agissant sur le compartiment présynaptique sur leurs récepteurs CB1.                           | 76 |
| <b>Figure II.6.</b> Effets centraux et périphériques des agents pharmacologiques (agonistes versus antagonistes) CB1 sur la régulation de la prise alimentaire.   | 78 |
| <b>Figure II.7.</b> Schéma des voies olfactives et gustatives montrant leurs convergences centrales au niveau de l'amygdale et le striatum.   | 81 |

## Chapitre IV.

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure IV.1.</b> Dispositif expérimental pour l'imagerie optique du signal intrinsèque.                                  | 94  |
| <b>Figure IV.2.</b> Schéma présentant le protocole de stimulation et l'obtention des cartes olfactives en imagerie optique. | 97  |
| <b>Figure IV.3.</b> Schéma du protocole de stimulation olfactive dans les expériences électrophysiologiques.                | 100 |
| <b>Figure IV.4.</b> Analyse des données et traitement graphique du signal LFP.  | 103 |

## Chapitre V.

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure V.1.</b> Histogrammes représentant les taux plasmatiques d'insuline et de leptine chez des rats nourris ad libitum (barres blanches) et des rats mis à jeun pendant 17 h (barres noires). | 114 |
| <b>Figure V.2.</b> Effet du jeûne sur l'activation spatiale du BO visualisée en imagerie optique pour une odeur alimentaire et une odeur non alimentaire.   | 116 |
| <b>Figure V.3.</b> Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur alimentaire d'amande 2%.  | 120 |
| <b>Figure V.4.</b> Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur alimentaire d'amande 5%.  | 122 |
| <b>Figure V.5.</b> Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 0,1%.   | 124 |
| <b>Figure V.6.</b> Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 0,5%.   | 126 |
| <b>Figure V.7.</b> Effets du jeûne sur la réponse oscillatoire en réponse à l'odeur non alimentaire d'hexanal 1 %.  | 128 |
| <b>Figure V.8.</b> Effets du jeûne sur les quantités d'ARNm des récepteurs à la leptine et l'insuline dans le BO.   | 131 |
| <b>Figure V.9.</b> La leptine n'affecte pas les réponses oscillatoires en réponse à une odeur alimentaire d'amande 5%.  | 133 |
| <b>Figure V.10.</b> Etude de l'expression des protéines astrocytaires connexine 30 et GFAP.   | 136 |
| <b>Figure V.11.</b> Effets de l'injection d'une solution d'alcool sur les réponses à des stimulations répétées.   | 139 |
| <b>Figure V.12.</b> Effets de l'injection d'une solution de THC à 1 mg/kg sur les réponses à des stimulations répétées.   | 141 |

## Chapitre VI.

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure VI.1.</b> Représentation schématique des différentes voies capables d'induire une plasticité des représentations spatiales (au niveau glomérulaire) et temporelles (au niveau des interactions des M/TC/GC) chez les rats à jeun. | 147 |
|---|-----|

# Index des tableaux

## Chapitre IV.

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau IV.1.</b> Liste des anticorps pour les différentes protéines cibles. | 104 |
| <b>Tableau IV.2.</b> Séquences des amorces utilisées pour la PCRq.              | 109 |

## Chapitre V.

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau V.1.</b> Récapitulatif des variations de réponses oscillatoires aux stimulations odorantes pour les deux odeurs aux différentes concentrations utilisées. | 130 |
|--|-----|

# Annexe 1 : Publications, formations et enseignements

## Articles

### **Imaging odor-evoked activities in the mouse olfactory bulb using optical reflectance and autofluorescence signals.**

Chery R, L'Heureux B, [Bendahmane M](#), Renaud R, Martin C, Pain F & Gurden H. Journal of Visualized Experiments. in press.  
(Parution programmée début septembre 2011).

### **The nutritional state modulates the spatiotemporal coding of food and novel odors in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Martin C, Durieux D, Baly C, Pain F, Caillol M & Gurden H.  
Soumission prochaine au Journal of Neuroscience.

**Cannabinergic modulation of food intake involves CB1 activation in the olfactory bulb.** En préparation pour soumission Nature Neuroscience.

### **Influence of the choice of anesthetic on the spontaneous and odor induced olfactory bulb activation of the mouse.**

En préparation.

## Communications affichées

Mai 2011 : Société Française des Neurosciences: 10ème colloque : **The nutritional state modulates the spatiotemporal coding of nutritive and novel odors in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#) , Martin C., Durieux D., Baly C, Caillol M & Gurden H.

Novembre 2010 : 40 th annual meeting of the Society for Neuroscience, Sand Diego, USA : **Effects of nutritional status in the spatiotemporal coding of the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Martin C, Baly C, Durieux D, Caillol M and Gurden H.

Septembre 2010 : ENP days 2010 : **Impacts of fasting on the spatiotemporal coding in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Martin C, Baly C, Monnerie R, Pain F, Durieux D, Caillol M and Gurden H.

Mai 2010 : Journée de l'École Doctorale BioSigne : **Nutrition's impact on brain: the nutritive state modifies the spatiotemporal coding in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Martin C, L'Heureux B , Pain F, Baly C, Caillol M and Gurden H.

Decembre 2009: Keystone Symposia on cellular and molecular biology : Neuronal Control of appetite, Metabolism and Weight. Keystone Resort, Keystone, USA.

### **Nutrition's impact on brain: the nutritive state modifies the spatiotemporal coding in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Martin C, L'Heureux B , Pain F, Baly C, Caillol M and Gurden H.

Septembre 2009: 9<sup>th</sup> European meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, France.

### **Neuro-astrocytic modulation by the nutritional state in the olfactory bulb.**

[Bendahmane M](#), Prud'Homme M.J, Monnerie R, Martin C, Pain F, Baly C, Caillol M and Gurden H.

Mai 2009: Société Française des Neurosciences: 9ème colloque, Bordeaux, France.

**Nutritional impact on odor-induced activities in the olfactory bulb.**

Bendahmane M, Prud'Homme M. J, Martin C, Pain F, Caillol M and Gurden H.

## **Communications Orales**

Mai 2011 : Colloque DocJ, Jouy en Josas, France, : **The nutritional status modulates the spatiotemporal coding for food and neutral odorants in the olfactory bulb of rat.**

Mai 2011 : Journée de l'IFR Neurosud, Orsay, France : **Le statut nutritionnel module le codage spatiotemporel pour une odeur nutritive et une odeur neutre dans le bulbe olfactif chez le rat.**

Avril 2009 : Colloque DocJ, Jouy en Josas, France : **Modulation des cartes d'activation glomérulaire par le statut nutritionnel dans le bulbe olfactif de rat : quel rôle pour les astrocytes ?**

## **Enseignements**

**TP de Neurosimulations : L2 de biologie, Université Versailles St Quentin.**

Année 2009-2010 : 20 heures

Année 2010-2011 : 25 heures

**TD de physiologie sensorielle : L3 de biologie, Université Versailles St Quentin.**

Année 2009-2010 : 13,5 heures

Année 2010-2011 : 37 heures

## **Formations**

**Atelier d'écriture scientifique** : 17-18 février 2009.

**Formation statistique de l'ED 419** : 25 et 26 mars 2010.

**Formation professionnelle** : CV et lettre de motivation 16-17 mars 2010.

Les doctorants dans l'entreprise 30-31 mars 2010.

**Habilitation à l'expérimentation animale niveau 1** : 20 septembre – 01 octobre 2010.

**Journée Biotechno Paris-2011**

# **Annexe 2 : Articles**

## Video Article

## Imaging Idor-Evoked Activities in the Mouse Olfactory Bulb using Optical Reflectance and Autofluorescence Signals

Barbara L'Heureux, Mounir Bendahmane, Rémi Renaud, Claire Martin, Frédéric Pain, Hirc Gurden  
UMR8165 Université Paris Sud Orsay, Paris 7 - CNRS

Correspondence to: Hirc Gurden at [gurden@imnc.in2p3.fr](mailto:gurden@imnc.in2p3.fr)

URL: <http://www.jove.com/details.php?id=3336>

DOI: 10.3791/3336

Citation: L'Heureux B., Bendahmane M., Renaud R., Martin C., Pain F., Gurden H. (). Imaging Idor-Evoked Activities in the Mouse Olfactory Bulb using Optical Reflectance and Autofluorescence Signals. JoVE. . <http://www.jove.com/details.php?id=3336>, doi: 10.3791/3336

## Abstract

In the brain, sensory stimulation activates distributed populations of neurons among functional modules which participate to the coding of the stimulus. Functional optical imaging techniques are advantageous to visualize the activation of these modules in sensory cortices with high spatial resolution. In this context, endogenous optical signals that arise from molecular mechanisms linked to neuroenergetics are valuable sources of contrast to record spatial maps of sensory stimuli over wide fields in the rodent brain.

Here, we present two techniques based on changes of endogenous optical properties of the brain tissue during activation. First the intrinsic optical signals (IOS) are produced by a local alteration in red light reflectance due to: (i) absorption by changes in blood oxygenation level and blood volume (ii) photon scattering. The use of *in vivo* IOS to record spatial maps started in the mid 80's with the observation of optical maps of whisker barrels in the rat and the orientation columns in the cat visual cortex<sup>1</sup>. IOS imaging of the surface of the rodent main olfactory bulb (OB) in response to odorants was later demonstrated by Larry Katz's group<sup>2</sup>. The second approach relies on flavoprotein autofluorescence signals (FAS) due to changes in the redox state of these mitochondrial metabolic intermediates. More precisely, the technique is based on the green fluorescence due to oxidized state of flavoproteins when the tissue is excited with blue light. Although such signals were probably among the first fluorescent molecules recorded for the study of brain activity by the pioneer studies of Britton Chances and colleagues<sup>3</sup>, it was not until recently that they have been used for mapping of brain activation *in vivo*. FAS imaging was first applied to the somatosensory cortex in rodents in response to hindpaw stimulation by Katsuei Shibuki's group<sup>4</sup>.

The olfactory system is of central importance for the survival of the vast majority of living species because it allows efficient detection and identification of chemical substances in the environment (food, predators). The OB is the first relay of olfactory information processing in the brain. It receives afferent projections from the olfactory primary sensory neurons that detect volatile odorant molecules. Each sensory neuron expresses only one type of odorant receptor and neurons carrying the same type of receptor send their nerve processes to the same well-defined microregions of ~100µm<sup>3</sup> constituted of discrete neuropil, the olfactory glomerulus (Fig. 1). In the last decade, IOS imaging has fostered the functional exploration of the OB<sup>5,6,7</sup> which has become one of the most studied sensory structures. The mapping of OB activity with FAS imaging has not been performed yet.

Here, we show the successive steps of an efficient protocol for IOS and FAS imaging to map odor-evoked activities in the mouse OB.

## Protocol

## 1. Preparing the animal for imaging (in accordance with European recommendations for care and use of laboratory animals)

1. 6 to 8 weeks old C57BL6 male mice are anesthetized with a cocktail of ketamine (10mg/kg) and xylazine (100mg/kg) injected intraperitoneally. Surgery begins when the mouse no longer responds to hindpaw pinch. During the entire experiment the animal is placed on a heating pad. Body temperature is continuously monitored and maintained at 37°C. Depth of anesthesia is maintained throughout surgery and imaging session by checking out the absence of limb withdraw. A subcutaneous injection of 20% of the initial anesthetic cocktail is otherwise administered.
2. Using clippers, remove the hair from the scalp. Clean the exposed skin from residual hair by using sterile gauze soaked with saline.
3. Place the mouse in the stereotaxic frame. The snout has to be in the same plane as the back of the head, in order to set the surface of the olfactory bulb to the horizontal. Secure firmly the ear and nose bars in order to prevent movements during imaging.
4. Apply ophthalmic ointment on the animal's eyes to prevent drying and pain.
5. Disinfect all surgical instruments with 70° ethanol and the scalp area with successive sweeps of betadine.
6. To remove the skin covering the skull, start by making an incision in the skin with scissors at the back of the head between the ears. Then cut in both sides towards the base of the ear and in the anteroposterior direction towards the forehead along the eyelids. Finish removing the scalp by cutting the skin on top of the snout close to the nose bar.
7. Under binocular observation, use a cotton swab soaked with saline to gently detach the periosteum on the top of the skull. Use a pair of forceps to remove the remaining tissue and scrape the surface of the skull with a scalpel to have a clean preparation.
8. The OB is a symmetric structure composed of two hemibulbs which are located between the eyelids. They are limited in the rostral and in the caudal direction by a venous sinus, and separated by the sagittal suture. Place a piece of absorbable gelatin sponge soaked with distilled water on the bone above the OB. It is important to keep this bone area moist throughout the experiment.

## 2. Preparing the cranial window

1. Remove the gelatin sponge and start by gently scraping the bone with n°10 scalpel blade. Keep a constant angle of 45° between the blade and the bone, and move the blade from the eyelids to the sagittal side of the bulb area. Don't apply vertical pressure on the bone or scratch the bone above the venous sinus.
2. During the thinning process, stop every 5min and place a hydrated gelatin sponge on the bone to cool down the preparation. Swab the skull with the sponge to remove bone dust.
3. Keep sweeping and cooling alternatively until visualizing the trabeculae, the spongy bone layer. The fine vasculature of the OB must be visible at this stage. Stop scratching the bone, and start using the scalpel's tip perpendicularly to "draw" a rectangular area enclosing the OB. At this stage n°11 scalpel blade can be used. Keep the surgery within the limits of the venous sinuses that should be safe of any scalpel stroke.
4. Dig gradually the formed rectangular trench by using successive motions of the scalpel. Wipe the tip of the scalpel periodically to clean it and keep it sharp. Be extra cautious of the depth of the tip to avoid touching the dura surface.
5. In order to get a sense of the thickness of the remaining bone, push it gently with the tip of a pair of forceps. If the bone flap folds under pressure, move to the next step.
6. Under a drop of saline, use the tip of the scalpel oriented horizontally to lift up the bone flap. The removal of the flap has to be done carefully to avoid tearing off the remaining bone.
7. Once the OB's surface is exposed, check for the absence of any bleeding or blood vessels anastomosis. Injuring the dura or the tissue surface will reduce the chances of obtaining optical signals. Wipe the area with a gelatin sponge soaked in saline in order to keep the bulb moist.
8. Apply polyacrylate dental cement to form a well on the bone around the window.
9. Place a drop of low melting point agarose (1.2%) over the dura, and put a sterile cover glass at the dimensions of the window. During the imaging session, a small quantity of agarose can be added in order to compensate the desiccation. Agarose will prevent the OB from moving with respiration and will provide a flat surface for optical imaging.

### 3. Optical imaging setup for olfactory activity mapping

1. The olfactory stimulation must be precisely defined in time and intensity by the use of an olfactometer. We use a custom modified version of multival perfusion system Valvebank 8II from Automate Scientific associated with a basic air compressor (compressed breathable air would be suited as well). This system allows for accurate and fast external valve control. Solutions of pure odorant are diluted in mineral oil at the chosen concentration. To activate the dorsal OB aldehydes such as hexanal are commonly used. A precise volume of the diluted odorant (20 to 50µl) is loaded on a filter paper and placed in a syringe reservoir. Through the perfusion system, pressure controlled air is delivered to the system, ensuring a constant rate of odorized air flux delivery to the animal nose during valve opening. Odorant is delivered through a Tygon R-3603 Vacuum Tubing (Saint-Gobain Corporation) carrying air at a flow rate of ~1000ml/min. Avoid contamination between odorants and residual quantities of odorant in the tubing. If available, reproducibility of the odorant stimulus can be controlled through the use of a flame ionization detector (microFID 2020 Photovac).
2. The optical setup is turned on. It consists of a cooled interlaced 12 bits CCD camera (ORCA AG Hamamatsu) associated with a fluorescence stereomicroscope (Leica MZ16), a computer controlled olfactometer and stabilized excitation lamps with appropriate bandpass interference filters. A scheme describing our setup is provided in figure 2. For Intrinsic Optical Signals Imaging (IOSI), a 200W tungsten halogen lamp (Oriol QTH) coupled with a fiber ring light (Schott) plugged around the microscope objective are used to provide stable and even illumination. For Flavoprotein Autofluorescence Signals Imaging (FASI), a 150W metal Halide lamp (Leica) with a 5mm core liquid light guide provide even localized excitation of the fluorescence through the epi-illumination port of the stereomicroscope.  
Image acquisition and hardware synchronization are realized by custom software. The open source software Micromanager<sup>2</sup> can also be used to control the optical setup and acquisition.

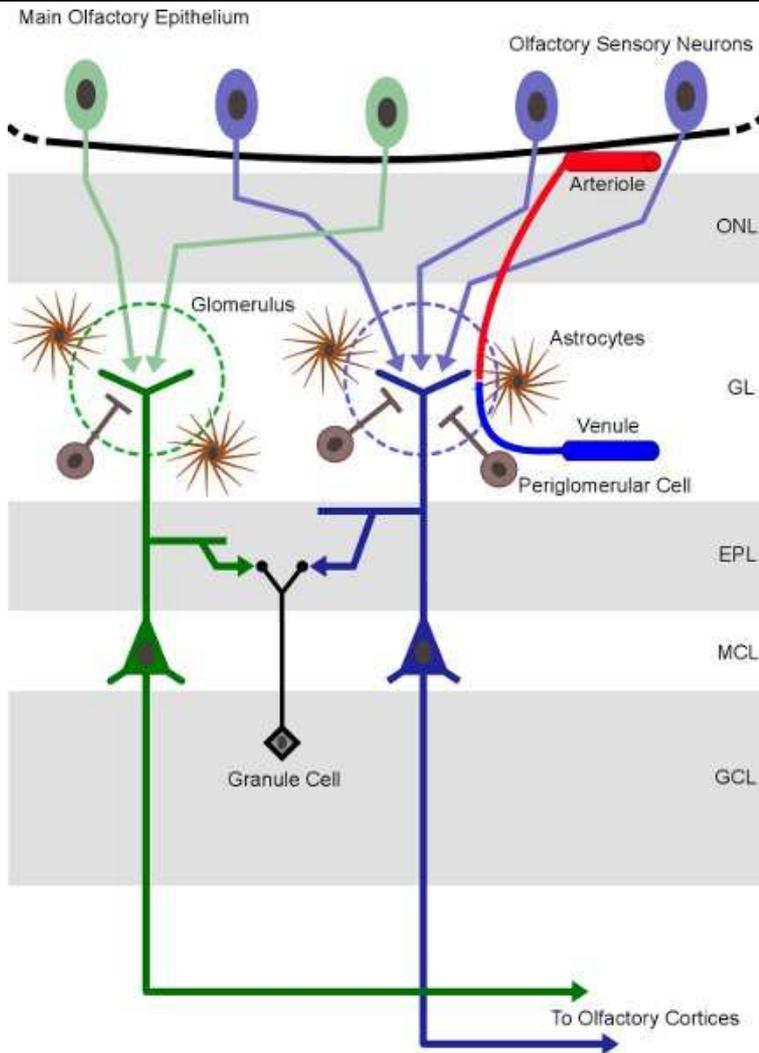
### 4. Optical imaging

1. Place the stereotaxic frame under the stereomicroscope, the cranial window centered in the field of view (see **Fig. 1A** for a schematic of the optical setup).
2. Tune the microscope to focus on the capillaries. Prior to stimulation trials (see description in 5) an image of the bulb is taken under 560nm (green) light (fiber ring) which provides a good contrast for blood vessels imaging. This picture is used as an anatomic control to check the state of the preparation and is acquired several times during the experiment.
3. For IOS imaging, reflected light intensity is recorded by the CCD camera under 630+/-10 nm (red) illumination. Images are acquired at full frame (no binning) at 5 frames per second which correspond to an exposure time of about 150ms. Power of the light source is adjusted to reach gray levels of at least ~3000 on the OB area, close to the saturation of the CCD pixels wells. Doing so makes it possible to take advantage of the 12bits dynamics of the CCD to capture faint intensity changes during activation. Maximum IOS amplitudes reach ~1%.
4. For FAS imaging fluorescence is acquired under excitation of 480nm+/-20nm (blue) epifluorescence light. A high-pass filter at 515nm is set up to capture light. Images are acquired at 5 frames per second with a binning of 4 by 4 to maximize sensitivity. Excitation light power is adjusted similarly to IOS with gray levels of 3000 on the OB area. Maximum FAS amplitudes reach ~3%.  
For both imaging modalities, the depth of field in the subject plane is the same and was measured at 0.5 mm for a magnification of about 4 times.
5. Light should be turned off between imaging trials to avoid heating and photobleaching of the preparation.

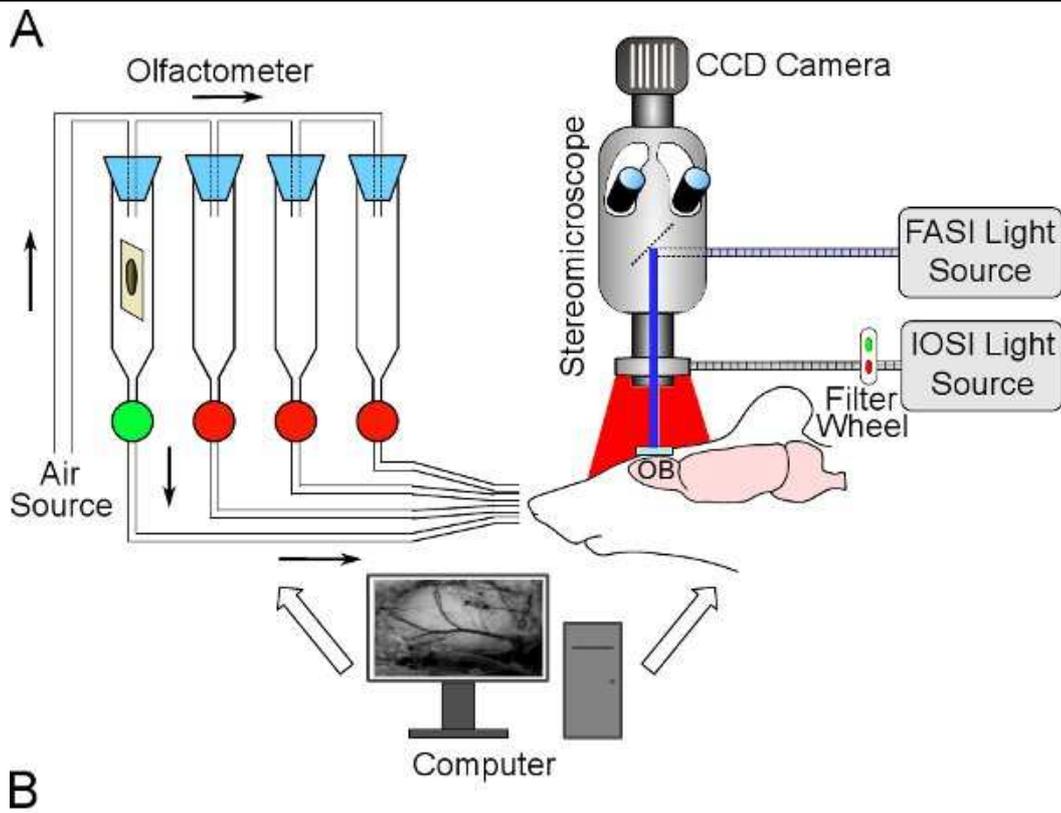
### 5. Imaging trials

1. Standard imaging session included a baseline of 5 to 10s where only air is delivered, followed by the odor stimulation for 3 to 10s depending on the chosen odor concentration, and 70 to 82s are further recorded with a constant air flow for baseline recovery (**Fig. 1B**). At the end of the trial, light is turned off and pure air is delivered for the inter trial interval duration (1 to 3 minutes) to wash out residual odor molecules and avoid sensory habituation. Odor trials were interleaved with blank trials (air delivery).
2. Odor-evoked activated zones are visualized as roughly spherical areas on the maps and correspond to the size of individual glomeruli (80 to 200µm in diameter<sup>9</sup>). Image processing is explained in Figure 2B. Olfactory maps are presented in Figure 3. Contrary to any other sensory system, the signal-to-noise ratio in the OB was sufficient to resolve odor-evoked responses in single trials (**Fig. 3B** for IOS and **Fig. 3D** for FAS).

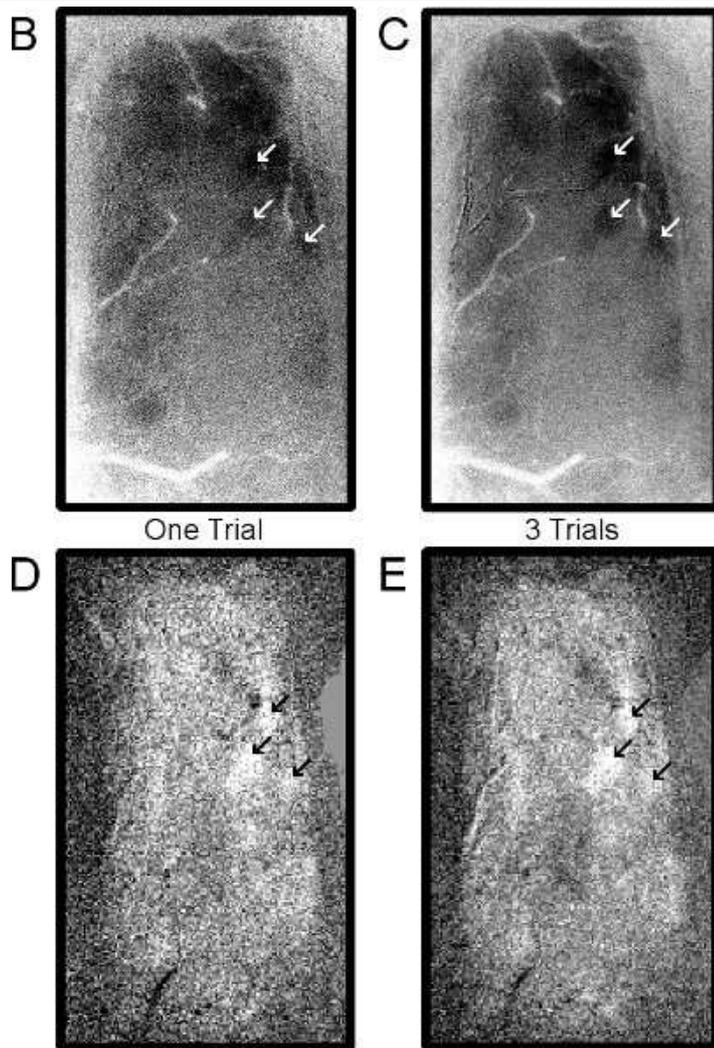
### 6. Representative Results:



**Figure 1** Structural organization of the main olfactory bulb in rodents. Olfactory sensory neurons, primary sensory cells located in the main olfactory epithelium, express the same odorant receptor and converge onto the same glomeruli in the OB. Olfactory glomeruli, the round-shaped neuropils (dashed circles), are located at the surface of the OB. Note that a very dense and complex vascular network is present at the glomerular level. Abbreviations (top/down): ONL: olfactory nerve layer; GL: glomerular layer, EPL: external plexiform layer; MCL: mitral cell layer; GCL: granule cell layer.



**Figure 2** Reflectance and fluorescence signals recording *in vivo*. **A.** Wide-field optical imaging setup. The brain of an anesthetized mouse is exposed to either red (IOS) or blue (FAS) light through either an annular fiber ring attached to the optics lens or an epi-illumination port of a microscope. Odors are loaded into sealed vials and odorized air is delivered to the animal nose (green light: open valve). **B.** Recording protocol and data processing. IOS and FAS are recorded as series of individual trials (90s of duration). The diagram shows the timeline of a single trial: baseline varies from 5 to 10s, stimulation from 3 to 10s, and return to baseline from 70 to 82s. Image processing requires pixel-by-pixel subtraction of intensity values during the baseline to intensity values during periods of stimulation (for FAS) or stimulation plus return to baseline (for IOS). This difference is then divided by baseline values to obtain a variation in % (see resulting images in **Fig. 3**).



**Figure 3** Odor-evoked activity maps in the OB using IOS and FAS imaging. A. Vasculature of the dorsal OB visualized under green light. B-C. IOS imaged (single trial versus three averaged trials respectively) for a 10s presentation of 20% hexanal. White arrows indicate the spherical regions of interest activated by this odor. These activation maps were obtained using the frames averaged during the first second after the end of odor stimulation (maximum of reflectance variation  $-0.63\%$  in A and  $-0.52\%$  in B). Note the black zones of absorbance where odor activation has occurred. C-D. FAS acquired sequentially in the same mouse for the same odorant (single trial versus three averaged trials respectively). These activation maps were obtained using the frames averaged during the first second after the beginning of odor stimulation (maximum of fluorescence variation  $+0.72\%$  in D and  $+0.66\%$  in E). Note that the white zones of autofluorescence emission indicated by black arrows correspond to the black zones in IOS. The grainy aspect seen in the FAS map is due to the 4 by 4 binning required for the improvement of the sensitivity. FAS images were not corrected from autofluorescence bleaching.

## Discussion

In this article we present IOS and FAS imaging techniques for *in vivo* recordings of odor-evoked activities in the mouse OB. To achieve this goal a relatively simple and affordable wide-field optical imaging setup is necessary. The acquisition of imaging data requires training to perform the fine surgical procedures and avoid any injury to the dura or brain tissue. In particular, major bleeding will absorb photons recorded for imaging and end up the experiment.

One benefit of IOS and FAS imaging is to avoid the injection of fluorescent tracers that could result in cellular toxicity or undesired side effects. They make it possible to tackle issues about olfactory maps thus spatial coding of sensory stimuli. Contrary to 2-DeoxyGlucose imaging, they provide the possibility to image several odors in a single animal. However, since photon penetration is limited in the tissue, IOS and FAS are restricted to the dorsal part of the OB and can not be recorded from ventral regions.

Endogenous optical signal imaging offers excellent spatial resolution for *in vivo* imaging. Technical improvements concern quantitative calculations of vascular components in the reflectance signals<sup>8,9</sup> as well as dynamics of blood oxygenation and volume during sensory activation<sup>10</sup>. Multiwavelength imaging of IOS imaging approaches are currently developed in our laboratory to fully quantify total hemoglobin concentration and oxygenation in the OB during sensory activation. These spectroscopic optical measurements added to FAS imaging will give the opportunity to answer the unsolved relationship between vascular and intracellular dynamics during sensory activation<sup>11,12</sup>.

## Disclosures

We have nothing to disclose.

## Acknowledgements

This work was supported by the "Agence Nationale de la Recherche" grant ANR-09-JCJC-0117-01 and "Neuropôle de Recherche Francilien-NERF" grant for Romain Chery. We thank Françoise Lefebvre for the software development in C++/Qt, and Laurent Pinot and Batiste Janvier for help in the development of the optical imaging setup.

## References

1. Grinvald A., Lieke E., Frostig R.D., Gilbert C.D., Wiesel T.N. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*. **324**, 361-364 (1986).
2. Rubin B.D. & Katz L.C. Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23:499-511 (1999).
3. Chance B., Cohen P., Jöbsis F., Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137, 499-508 (1962).
4. Shibuki K., Hishida R., Murakami H., Kudoh M., Kawaguchi T., Watanabe M., Watanabe S., Kouuchi T., & Tanaka R. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol*. **549**(Pt 3), 919-27 (2003).
5. Uchida N., Takahashi Y.K., Tanifuji M., & Mori K. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci*. **3**, 1035-1043 (2000).
6. Gurden H., Uchida N., & Mainen Z.F. Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* **52**, 335-345 (2006).
7. Soucy E.R., Albeanu D.F., Fantana A.L., Murthy V.N., & Meister M. Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci* **12**, 210-220 (2009).
8. Frostig R.D., Lieke E.E., Ts'o D.Y., & Grinvald A.. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 6082-6086 (1990).
9. Meister M., & Bonhoeffer T. Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *J Neurosci* **21**, 1351-1360 (2001).
10. Dunn AK, Devor A, Bolay H, Andermann ML, Moskowitz MA, Dale AM. Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation. *Opt Lett* **28**, 28-30 (2003).
11. L'Heureux B, Gurden H, Pain F. Autofluorescence imaging of NADH and flavoproteins in the rat brain: insights from Monte Carlo simulations. *Optics Express*. **17**(12):9477-90 (2009).
12. Renaud R, Gurden H, Chery R, Bendhamane M, Martin C, Pain F. Multispectral imaging of the olfactory bulb activation: influence of realistic differential pathlength correction factors on the derivation of oxygenation and total hemoglobin concentration maps (Proceedings Paper) Photonics West Conference. Volume: 7902 (2011).