Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement : étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale

Imad Aoudé

▶ **To cite this version:**

Imad Aoudé. Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement : étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS101 . tel-00935302

HAL Id: tel-00935302

https://theses.hal.science/tel-00935302

Submitted on 23 Jan 2014

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 DE BOURGOGNE

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

UMR UB-CNRS 6265-INRA 1324

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité : **Sciences de la vie**

Option : **Neurosciences**

Par

Imad Aoudé

Soutenue publiquement le 17 décembre 2012

Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement : étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale

Directeur de thèse : **Dr. Gilles Sicard**

Co-directeur de thèse et chef d'équipe : **Dr. Xavier Grosmaitre**

Composition du jury:

Pr. Yves Artur	Professeur des Universités, Université de Bourgogne	**Président**
Dr. Nicolas Meunier	Maitre de conférence-HDR, Université de Versailles	**Rapporteur**
Pr. Ivan Rodriguez	Professeur des Universités, Université de Genève	**Rapporteur**
Pr. François Féron	Professeur des Universités, Université de Marseille	**Examinateur**
Dr. Jean-Marie Heydel	Maitre de conférence-HDR, Université de Bourgogne	**Examinateur**
Dr. Emmanuelle Jacquin-Joly	Directeur de Recherche, INRA, Versailles	**Examinateur**

À Sarah et Eva

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens tout particulièrement à témoigner ma profonde gratitude à mon encadrant, Monsieur **Xavier Grosmaitre,** pour m'avoir accueilli dans son équipe et confié ces travaux. Je lui suis reconnaissant et redevable pour sa souplesse, la confiance et la marge de liberté qu'il m'a accordée dans mon travail. Il a été pour moi, non seulement un encadrant mais aussi un grand frère, auprès de qui j'ai toujours trouvé conseil dans les moments décisifs de ma vie. Mes amitiés vont également à sa chère famille : **Eva, Simon** et **Alma**.

Je témoigne également ma profonde gratitude à Monsieur **Gilles Sicard**, Chargé de Recherche au CNRS, pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse et pour m'avoir guidé dans ma réflexion. J'espère que l'occasion de prendre un café à Beyrouth se présentera de nouveau.

Je tiens à remercier Monsieur **Luc Pénicaud**, Directeur du laboratoire du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres du jury.

A Monsieur **Nicolas Meunier**, Maître de Conférences à l'Université de Versailles, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accordé, à de nombreuses reprises, la chance de réaliser les manips d'EOG.

A Monsieur **Ivan Rodriguez**, Professeur des Universités de Genève, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse.

A Monsieur **Jean-Marie Heydel**, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne, d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et pour avoir passé de bons moments durant les congrès internationaux (ECRO 2011 et ISOT 2012).

A Monsieur **François Féron**, Professeur des Universités de Marseille et à Madame **Emmanuelle Jacquin-Joly**, Directeur de Recherche à l'INRA de Versailles, d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Puis mes salutations vont à Monsieur **Peter Mombaerts**, Directeur du Département de Neurogénétiques moléculaire au Max Planck Institut de Frankfort, pour m'avoir permis de réaliser l'étude d'immunohistochimie et pour avoir pris en charge mon hébergement avec ma famille au *Guest House*. A Madame **Massayo Omura**, Chercheur Postodoctoral dans l'équipe du Pf. Peter Mombaerts, pour son optimisme (*it should be OK* !) et son implication dans l'étude de l'immunohistochimie.

A Madame **Nathalie Mandairon**, chargé de recherche au CNRS (LYON, Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, comportement et Cognition CNRS-UMR 5020) pour m'avoir permis de réaliser l'analyse comportementale, pour son aide et ses conseils précieux.

A Madame **Claire Fenech**, Ingénieur d'Etude au CNRS et remarquable biologiste moléculaire, qui a contribué au développement de la technologie de qPCR sur cellules isolées. Je salue sa gentillesse, ses conseils et son implication dans ce travail.

A Monsieur **Hervé Cadiou**, Maître de Conférences à l'Université de Strasbourg et anciennement post-doc dans l'équipe, pour sa bonne humeur, son enthousiasme et pour l'initiation de ce travail.

A Madame **Ingrid Jakob**, Ingénieur d'Etude au CNRS, pour avoir partagé son bureau la première année de thèse et pour avoir été « mon encyclopédie » de l'olfaction durant ma thèse. Je lui suis reconnaissant de son aide précieuse pour le développement d'une technique efficace de dissociation des neurones olfactifs.

A Monsieur **Jean Gascuel**, Chargé de Recherche au CNRS, pour son aide et sa disponibilité.

J'adresse aussi mes remerciements au **corps enseignant** du Département de Biochimie de la Faculté des Sciences Gabriel de l'Université de Bourgogne pour m'avoir permis d'effectuer 196 heures d'enseignement dans de bonnes conditions. C'était une expérience unique !

A mes amis, **Bassim Tazir**, Doctorant dans l'équipe du Pf. Peter Mombaerts, pour son amitié et les heures passées ensemble au cryostat du « mpi » et ce malgré la forte chaleur du mois de ramadan 2012 et **Adrien Molinas**, pour les sorties salutaires et les pauses déjeuner durant cette thèse.

Je remercie chaleureusement tous les étudiants avec qui j'ai partagé mon bureau durant les deux dernières années de thèse : **Alexandra Gouazé** pour avoir toujours su mettre de la bonne ambiance dans le bureau, Brenachot…oups **Xavier Brenachot** pour ses bonnes blagues (« *le nouvel IMAD en vente exclusive* »), **Camille Allard**, **Lionel Carneiro**, **Brandon Cline** et **Caroline Rigault.** Je salue également **Sébastien Rivière,** nouveau membre de l'équipe….bonne chance pour la suite !

Enfin, je remercie de tout cœur ma grande famille : ma chère **Maman Hosn**, mon cher **Papa Nabil**, mes frères et sœurs **(Youssef, Nader, Mona, Issam, Nourra, Abdallah et Jamil**), mes oncles, mes tantes (surtout mes préférées **Dina et Jamal**), mes cousines et cousins et ma grand-mère **Souraya,** pour leur présence et pour tout l'amour qu'ils m'ont apporté et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Mes pensées vont vers mes chers grands-pères (**Youssef** et **Tanios**) et ma chère grand-mère **Amina,** les premiers êtres chers qui nous ont très vite quittés.

Je salue mes **beaux-parents** et mes « **bofs** » surtout **Kassem** qui a su me changer les idées pendant les moments de détresse de la rédaction.

J'embrasse le plus beau cadeau de ma vie, ma chère fille **Eva.** Chaque jour est encore plus beau en sa présence.

Et finalement je remercie du fond du cœur, ma très chère épouse **Sarah,** pour m'avoir encouragé et soutenu depuis de longues années (7ans déjà !) et pour avoir porté et mis au monde notre bébé en dépit de sa thèse. Maintenant c'est à mon tour de te soutenir dans cette épreuve terrible de la rédaction de thèse. Je tiens à saluer tes collègues au laboratoire pour les beaux moments et les sorties qu'on a eus ensemble.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **AC3:** Adénylate cyclase-3
- **AMPc:** Adénosine monophosphate cyclique
- **ADN:** Acide désoxyribonucléique
- **ARN:** Acide ribonucléique
- **BDNF:** Brain derived neurotrophic factor
- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- **BOA:** Bulbe olfactif accessoire
- **Calb-2:** Calbindine-D28K
- **CBP:** CREB-binding protein
- **CCDS:** Consensus coding sequence
- **CCG:** Couche de cellules granulaires
- **CCM:** Couche de cellules mitrales
- **CM:** Cellule mitrale
- **CMR:** Courant de migration rostral
- **CNGA2:** Cylic nucleotide-gated channels-alpha2
- **CPE:** Couche plexiforme externe
- **CREB:** cAMP response-element binding protein
- **CT:** Cycle threshold
- **CYP:** Cytochromes P450
- **DAG:** DiAcylGycérol
- **dNTP:** désoxynucléotide tri-phosphate
- **DTT:** Dithiotreitol
- **EO:** Epithelium olfactif
- **EOG:** Electroolfactogramme
- **FGF:** Fibroblast growth factor
- **FPR:** formyl peptide receptor-like proteins
- **FSC:** forward scatter
- **GAP43:** Growth associated protein 43
- **GAPDH:** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- **GC-D:** Guanylyl-cyclace-D
- **GFP:** Green fluorescent protein
- **GG:** Ganglion de Grueneberg
- **HAT:** Histone acétylase
- **HM:** Huile minérale
- **HPRT:** Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
- **HSP90:** Heat shock protein 90
- **IGF:** Insulin growth factor
- **INP:** Immediate neuronal precursors
- **IP3:** Inositol tri-phosphate
- **LCR:** Locus control region
- **LIF:** Leukemia inhibitory factor
- **MDL:** Microdissection laser
- **MIQE:** Minimum Information for Publication of qPCR
- **MO:** Muqueuse olfactive
- **NCBI:** National center of Biotechnology Information
- **NPY:** Neuropeptide Y
- **NRO:** Neurone récepteur olfactif
- **NT3:** Neurotrophine-3
- **NVN:** Neurone voméronasal
- **OBP:** Odorant binding protein
- **OCT:** Optimal cutting temperature
- **OMP:** Olfactory marker protein
- **OS:** Organe septal
- **OVN:** Organe voméronasal
- **PDE1C:** Phosphodiestérase
- **PDGF:** Platelet-derived growth factor
- **PEI:** Polyéthylenimine
- **PKA:** Protéine kinase A
- **PLC:** Phospholipase C
- **RCPG:** Récepteur couplé aux protéines G
- **RQ:** Relative quantity
- **RT:** Reverse transcription
- **SSC:** Side Scatter
- **SUCLG:** Succinate–CoA ligase
- **TAARS:** Trace-amine-récepteurs
- **TGF:** Transforming growth factor
- **TNF-α:** Tumor necrosis factor
- **ZSV:** Zone sous-ventriculaire

RESUME

Dans le but d'évaluer l'impact d'une exposition postnatale sur une population spécifique de neurones olfactifs, nous avons exposé au Lyral des souris transgéniques dont les neurones récepteurs olfactifs MOR23 expriment la protéine fluorescente, GFP.

Nous avons évalué l'impact d'une exposition précoce sur la population des neurones MOR23, en utilisant plusieurs méthodes. Par des observations anatomiques, nous montrons que le nombre de neurones olfactifs exprimant MOR23 diminue chez les sujets traités. Cette baisse concerne principalement les neurones matures. Ensuite, des analyses en qPCR quantitatives sur de petits échantillons de cellules isolées indiquent que les neurones MOR23 des souris exposées expriment davantage de récepteurs, de canaux couplés aux nucléotides cycliques (CNGA2) et de phosphodiestérase (PDE1C). La surexpression du récepteur MOR23 par neurone est transitoire. Enfin, cette surexpression est corrélée avec les propriétés électriques des neurones en réponse au ligand du récepteur MOR23 étudiées en patch-clamp. Afin d'écarter tout effet aspécifique inhérent à une éventuelle toxicité du Lyral, nous avons réalisé des enregistrements d'électroolfactogramme (EOG), une étude « transcriptomique » (41 gènes) et une étude d'immunohistochimie sur la muqueuse olfactive montrant que l'EO reste intact après exposition de trois semaines au Lyral. Nous montrons également que l'effet est dépendant du couple ligand-récepteur. Enfin, par des observations comportementales, nous montrons que les souris exposées développent une préférence pour le Lyral et passent plus de temps à l'explorer.

Ensemble, ces résultats suggèrent que les neurones olfactifs font preuve d'une certaine plasticité et sont capables de s'adapter à l'environnement.

Mots-clés: Olfaction, récepteur, souris transgéniques, développement, plasticité, biologie moléculaire, électrophysiologie, comportement.

ABSTRACT

In order to investigate the consequences of postnatal odorant exposure on a specific population of olfactory sensory neurons (OSNs), we have taken the following experimental approach. MOR23-GFP mice were daily exposed to Lyral for 21 days starting at birth and three lines of investigations were carried out. Using anatomical analysis we observe that the density of OSNs expressing MOR23 decreases after odorant exposure. This decrease concerns primarily matures OSN (MOR23-OMP+). In order to study molecular changes within individual OSNs, mRNA levels for olfactory signaling pathway components were quantitatively analyzed using qPCR on GFP-labeled neurons (7 per mouse). mRNAs for CNGA2, PDE1C and MOR23 olfactory receptor were up-regulated in exposed mice, whereas ACIII transcript levels remained stable. This effect is not permanent: we observed an anatomical and a molecular recovery. Patch-clamp recordings on MOR23 dendritic knobs correlate with qPCR datas. To exclude any aspecific effect due to a possible Lyral toxicity we performed EOG, immunohistochemistry and qPCR on total olfactory epithelium (OE). These experiments show that 3 weeks of Lyral exposure does not damage the OE. Then qPCR on isolated cells reveals that the effect is couple ligand-receptor dependant: M71 neurons are not affected by acetophenone exposure. Finally, we performed behavioral experiments on mice from both groups. Exposed mice favored their exposure odor in olfactory preference test and spend more time exploring Lyral than non-exposed mice.

These observations suggest that the environment can induce plasticity in olfactory sensory neurons.

Keywords: Olfaction, receptor, transgenic mice, development, plasticity, molecular biology, electrophysiology, behavior.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**

TABLE DES MATIERES **8**

LISTE DES TABLEAUX **11**

LISTE DES FIGURES **12**

INTRODUCTION **16**

CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES **22**

Partie 1 : Le système olfactif (principal et accessoire) *23*

Les stimuli olfactifs 23

L'organe sensoriel primaire. 24

L'épithélium olfactif principal 25

Les différents types cellulaires de l'EO et les glandes de Bowman : 27

Les cellules de soutien 27

Les cellules basales (horizontales et globuleuses) 28

Les cellules microvillaires 28

Les neurones olfactifs 29

Voies de signalisation du signal olfactif 32

La voie de l'AMPc 32

La voie de l'Inositol tri-phosphate (IP3) 34

Les glandes de Bowman 36

L'organe accessoire de l'EO (l'organe voméronasal) 36

L'organe septal et le ganglion de Grueneberg 38

L'organe septal 38

Le ganglion de Grueneberg 39

Le centre olfactif primaire 42

Le bulbe olfactif principal 42

Les voies olfactives 44

Le bulbe olfactif accessoire 46

Partie 2 : Les récepteurs olfactifs *46*

A la découverte des récepteurs olfactifs 47

Structure et sites d'interactions des récepteurs olfactifs avec les molécules odorantes. 48

Classification des récepteurs olfactifs 50

L'activation des récepteurs olfactifs 51

Organisation et distribution des gènes des récepteurs olfactifs 52

Le gène codant MOR23 53

Le gène codant M71 53

Régulation de l'expression des récepteurs olfactifs 54

Partie 3 : Régulation de la genèse olfactive *58*

Les facteurs intrinsèques 59

Facteurs extrinsèques 61

Facteurs environnementaux 63

Effets des composés toxiques sur l'épithélium olfactif 63

Effets de l'activité sur l'épithélium olfactif 64

Effets de l'activité sur le bulbe olfactif 66

Partie 4 Etude moléculaire sur une population homogène de cellules *68*

La micromanipulation (prélèvement par la pipette de patch) 69

La microdissection laser (MDL) 71

Tri par cytométrie en flux 73

CHAPITRE II : DONNEES EXPERIMENTALES **75**

Partie 1 : Matériels et méthodes *76*

Modèle d'étude ... 76
Deux souches de souris transgéniques (MOR23GFP et M71GFP) ... 76
Obtention de lignées transgéniques OR-IRES-tauGFP ... 77
Souris MOR23 transgéniques (MOR23-IREStauGFP) ... 77
Souris M71 transgéniques (M71-IrestauGFP) ... 78
Conditions d'élevage des souris ... 80
Exposition ... 80
Dissection de l'épithélium olfactif (explant) ... 83
Etude des ARN ... 84
Choix des amorces ... 84
Construction des amorces ... 84
Alignement des amorces ... 88
Séquençage et alignement des produits de PCR ... 90
Optimisation des amorces (Température d'hybridation) ... 92
Test d'efficacité des amorces ... 93
Choix de normalisation et choix des gènes de normalisation ... 95
Modèle de calcul ... 96
Extraction et dosage des ARNs ... 98
Contrôle de l'intégrité des ARNs ... 99
Transcription Inverse (Tissu entier) ... 102
qPCR : Quantitative polymérase Chain réaction (tissu entier) ... 103
qPCR sur plaque customisée Taqman. ... 103
Etudes des ARNs sur cellules isolées ... 104
Dissociation de l'épithélium olfactif et prélèvement par pipette de patch ... 104
Microdissection Laser. ... 109
Tri par cytométrie en flux ... 110
RT-qPCR : (cellules isolées) ... 111
Analyse d'un grand nombre de gènes à partir de quelques cellules (Pré-amplification) ... 115
Etude des protéines ... 116
Western Blot ... 116
Immunohistochimie ... 117
Thoracotomie ... 117
Perfusion et fixation ... 118
Inclusion en congélation (OCT) ... 118
Coupes des blocs ... 119
Immunomarquage ... 119
Montage des lames ... 120
Observation des coupes ... 120
Comptage ... 122
Epaisseur ... 122
Test fonctionnel : Electroolfactogramme (EOG) ... 124
Préparation de la muqueuse ... 124
Descriptif du poste d'enregistrement et système de stimulation ... 124
Test de comportement ... 127
Test d'exploration du Lyral ... 127
Test de préférence (discrimination) ... 129
Partie 2 : L'exposition postnatale au Lyral induit une modulation anatomique, moléculaire et physiologique des neurones MOR23. ... 130
Modifications anatomiques ... 130
Modifications moléculaires ... 133
Analyse moléculaire globale ... 134
Analyse moléculaire sur population pure de neurones olfactifs d'intérêt (MOR23) ... 137
Modifications physiologiques ... 141
Analyse électrophysiologique à l'échelle du neurone ... 141
Analyse électrophysiologique à l'échelle du tissu ... 143

Analyse d'amplitudes de réponses ... 144
Analyse de la cinétique de réponse : ... 145
Modifications comportementales ... 146
Partie 3 : L'exposition au Lyral n'affecte pas l'état général du tissu olfactif ... 148
Analyse fonctionnelle (Electroolfactogramme) ... 149
Analyse de l'amplitude de réponses ... 149
Analyse de la cinétique de réponse. ... 150
Analyse moléculaire (RT-qPCR) ... 150
Augmentation du temps de repolarisation par exposition postnatale au Lyral ... 156
Analyse histologique ... 157
Analyse globale ... 158
Analyse zonale ... 159
Partie 4 : La plasticité induite par l'exposition est transitoire ... 161
Partie 5 : La plasticité des neurones olfactifs induite par l'exposition postnatale est couple odorant/ligand dépendant ... 163
Analyse moléculaire ... 164
Analyse globale ... 164
Analyse sur population de neurones olfactifs d'intérêts (M71) ... 167
Récapitulatif des conséquences moléculaires et anatomiques des expositions des souris MOR23GFP et M71GFP aux odorants. ... 167
Analyse fonctionnelle (Electroolfactogramme) ... 168
Analyse de l'amplitude de réponse ... 169
Analyse de la cinétique de réponse ... 169
Partie 6 : L'exposition au Lyral induit une baisse du nombre de neurones MOR23 matures ... 170
Comptage du nombre de neurones MOR23 matures et immatures de l'épithélium olfactif ... 171
Mesure Histologique Globale ... 171
Récapitulatif des résultats d'analyse histologique globale de l'épithélium olfactif de souris exposées ou non au Lyral pendant 21 jours ... 174
Mesure histologique par zone de l'épithélium olfactif. ... 175
Récapitulatif des résultats d'analyse histologique par zone de l'épithélium olfactif de souris exposées ou non au Lyral pendant 21 jours ... 176
CHAPITRE III : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE ... 178
BIBLIOGRAPHIE ... 194
ANNEXE ... 205

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. TABLEAU RECAPITULATIF DES PRODUITS AJOUTES POUR OBTENIR 1L DE SOLUTION RINGER. 83
TABLEAU 2. SEQUENCES DES AMORCES “FORWARD” ET “REVERSE” SPECIFIQUES AUX ADNC D’INTERETS. 90
TABLEAU 3. SEQUENCE DES PRODUITS DE PCR DES GENES D’INTERET (OBTENUS PAR SEQUENÇAGE). 92
TABLEAU 4. TEMPERATURE D’HYBRIDATION OPTIMUM D’AMORCES DETERMINEES PAR GRADIENT DE PCR. .. 93
TABLEAU 5. VALEURS OBTENUES (EFFICACITES, CORRELATIONS ET PENTES). 94
TABLEAU 6. PROGRAMME ETIREUSE POUR PIPETTE DE PRELEVEMENT. 106
TABLEAU 7. RECAPITULATIF DES DIFFERENTS PROTOCOLES DE LYSE CELLULAIRE ET DE RT A PARTIR DE CELLULES UNIQUES. 113
TABLEAU 8. TABLEAU RECAPITULATIF DES ANTICORPS UTILISES POUR LE WESTERN-BOT. 117
TABLEAU 9. TABLEAU RECAPITULATIF DES ANTICORPS UTILISES POUR LE COMPTAGE DES NEURONES MATURES ET IMMATURES PAR IMMUNOHISTOCHIMIE. 120
TABLEAU 10. TABLEAU INDIQUANT LES « RQ » ET LES « P-VALUE » DES 19 GENES ETUDIES. 136
TABLEAU 11. TABLEAU INDIQUANT LES FACTEURS DE REGULATION ET LES VALEURS DES TESTS STATISTIQUES DE CHAQUE GENE. 155
TABLEAU 12. TABLEAU INDIQUANT LES FACTEURS DE REGULATION DE L’EXPRESSION DES GENES DONT L’EXPRESSION CHANGE DE MANIERE SIGNIFICATIVE ET NON SIGNIFICATIVE. ( ) INDIQUE UNE DIMINUTION DE L’EXPRESSION ET UNE TENDANCE A DIMINUER LORSQUE LES VARIATIONS D’EXPRESSIONS NE SONT PAS SIGNIFICATIVES TANDIS QUE ( ) INDIQUE UNE TENDANCE DE SUREXPRESSION DU NIVEAU D’ARNM. 155
TABLEAU 13. TABLEAU RECAPITULATIF DES CONSEQUENCES ANATOMIQUES ET MOLECULAIRES DES EXPOSITIONS DES SOURIS MOR23GFP ET M71GFP AUX ODORANTS. 168
TABLEAU 14. RECAPITULATIF DES RESULTATS D’ANALYSE HISTOLOGIQUE GLOBALE D’EPITHELIUMS OLFACTIFS. 174
TABLEAU 15. RECAPITULATIF DES RESULTATS D’ANALYSE HISTOLOGIQUE PAR ZONE D’EPITHELIUM OLFACTIF. 176

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION DES SOUS-SYSTEMES OLFACTIFS, DU BULBE OLFACTIF ET DE LEURS ORGANES ACCESSOIRES (OVN ET BOA)..... 24
FIGURE 2. COUPE SCHEMATIQUE TRANSVERSALE DE LA CAVITE NASALE HUMAINE 25
FIGURE 3. LES TROIS COMPARTIMENTS MAJEURS DE L'EPITHELIUM OLFACTIF ET LA POSITION RELATIVE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES DANS CES COMPARTIMENTS. 26
FIGURE 4. REPRESENTATION D'UN NRO ET D'UN BOUTON DENDRITIQUE OBSERVES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE..... 30
FIGURE 5.TOPOLOGIE DES RECEPTEURS OLFACTIFS ET VOIE DE SIGNALISATION DANS LES NEURONES GC-D.... 32
FIGURE 6. REPRESENTATION DE LA CASCADE DE SIGNALISATION METTANT EN JEU L'AMPC ET DES SOUS-UNITES DES CANAUX CYCLIQUES-NUCLEOTIDES DEPENDANTS 33
FIGURE 7. SCHEMA DE SIGNALISATION DE L'INOSITOL TRIPHOSHATE (IP3). 35
FIGURE 8. REPRESENTATION DES PRINCIPALES VOIES D'ENTREES D'INFORMATIONS AUX CENTRES OLFACTIFS EN PROVENANCE DE L'ORGANE VOMERONASAL. 37
FIGURE 9. POSITION ANATOMIQUE DE L'ORGANE SEPTAL ET ENREGISTREMENT DE COURANTS (PATCH-CLAMP PERFORE) SUR DES NEURONES SR1. 39
FIGURE 10. CELLULES DU GANGLION DE GRUENEBERG REGROUPEES EN GRAPPE DE RAISIN ET RECOUVERTES PAR UN EPITHELIUM KERATINISE..... 41
FIGURE 11. DIAGRAMME SCHEMATIQUE ILLUSTRANT LE PROFIL DE CONNECTIVITE ENTRE L'EPITHELIUM OLFACTIF ET LE BULBE OLFACTIF..... 43
FIGURE 12. SCHEMA RESUMANT L'ORGANISATION SYNAPTIQUE DU BOP DE MAMMIFERES..... 44
FIGURE 13. PROJECTIONS BULBAIRES AUX CENTRES SUPERIEURS..... 45
FIGURE 14. STRUCTURE TYPIQUE D'UN RECEPTEUR OLFACTIF ET STRUCTURE EN HAUTE RESOLUTION (RAYON-X). 49
FIGURE 15. ARBRE PHYLOGENETIQUE CLASSANT 1107 RECEPTEURS OLFACTIFS DE SOURIS. 51
FIGURE 16. STRUCTURE DES GENES MOR23 ET M71 COMMUNEMENT ADMISES..... 54
FIGURE 17. STRUCTURE DU LOCUS DU GENE M71..... 56
FIGURE 18. MODELE PROPOSE POUR LA SELECTION DU GENE RO. 57
FIGURE 19. SCHEMA DE LA VOIE DE DIFFERENCIATION NEURONALE. 61
FIGURE 20. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DU NRO SOUS LE CONTROLE DE FACTEURS EXTRINSEQUES. 63
FIGURE 21. HETEROGENEITE CELLULAIRE DES NIVEAUX DE TRANSCRIPTION..... 69
FIGURE 22. PRELEVEMENT PAR LA PIPETTE DE PATCH..... 71
FIGURE 23. SCHEMA DE LA PROCEDURE D'ISOLATION DE CELLULES CIBLES PAR LA MICRODISSECTION LASER. 73
FIGURE 24. CONSTRUCTION DES TRANSGENES OR-IRESTAUGFP. 79
FIGURE 25. PROCEDURE D'EXPOSITION..... 82
FIGURE 26. DIAGRAMME MONTRANT LES DEUX TYPES DE TRAITEMENTS..... 82
TABLEAU 1. TABLEAU RECAPITULATIF DES PRODUITS AJOUTES POUR OBTENIR 1L DE SOLUTION RINGER..... 83
FIGURE 27. SCHEMA RECAPITULATIF DES ETAPES DE LA DISSECTION (DESSINE PAR HERVE CADIOU)..... 83
FIGURE 28. DIAGRAMME RECAPITULATIF DES ETAPES A SUIVRE POUR CHOISIR DES AMORCES DE QPCR..... 84
FIGURE 29. PRESENCE DE TRANSCRITS ALTERNATIFS POUR UN GENE D'INTERET..... 86
FIGURE 30. CONSTRUCTION D'UNE PAIRE D'AMORCES (GAPDH – GENE DE MENAGE UTILISE) VIA PRIMER EXPRESS 3.0..... 87
FIGURE 31. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DES AMORCES..... 87

FIGURE 32. PARAMETRES DE PCR PRIS EN COMPTE PAR PRIMER EXPRESS 3.0. 88
FIGURE 33. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DES AMORCES PAR INTERROGATION DE LA BASE DE DONNEES D'ADNC DE SOURIS VIA LE PROGRAMME PRIMER BLAST. 89
TABLEAU 2. SEQUENCES DES AMORCES "FORWARD" ET "REVERSE" SPECIFIQUES AUX ADNC D'INTERETS. 90
FIGURE 34. REPRESENTATION D'UN ELECTROPHOREGRAMME DE PRODUITS DE SEQUENÇAGE ET DE LA SEQUENCE OBTENUE. 91
FIGURE 35. EXEMPLE DE PRODUITS DE SEQUENÇAGE « BLASTE » SUR *NUCLEOTIDE BLAST*: MOR23. 91
TABLEAU 3. SEQUENCE DES PRODUITS DE PCR DES GENES D'INTERET (OBTENUS PAR SEQUENÇAGE). 92
FIGURE 36. OPTIMISATION DE LA TM DES AMORCES. 93
FIGURE 37. COURBES D'EFFICACITE DE PCR DE TOUTES LES AMORCES. 94
FIGURE 38. VALIDATION DES GENES DE NORMALISATION. 96
FIGURE 39. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'ARNM DE MOR23 PAR DIFFERENTES METHODES DE CALCUL. 97
FIGURE 40. PUCE DE BIORAD POUR ELECTROPHORESE MICRO-CAPILLAIRE. 100
FIGURE 41. CHROMATOGRAMME D'UNE ELECTROPHORESE MICRO-CAPILLAIRE. 101
FIGURE 42. ELECTROPHOREGRAMME OBTENU PAR PUCE MICRO-CAPILLAIRE MONTRANT LES BANDES 28S (~ 4000 PB), 18S (~ 1700PB) ET 5S (~ 50PB). 101
FIGURE 43. DIAGRAMME MONTRANT LA METHODE DE PRELEVEMENT PAR LA PIPETTE DE PATCH. 106
TABLEAU 6. PROGRAMME ETIREUSE POUR PIPETTE DE PRELEVEMENT. 106
FIGURE 44. ELABORATION D'UN PROTOCOLE EFFICACE DE DISSOCIATION DE L'EPITHELIUM OLFACTIF. 107
FIGURE 45. LES CELLULES PRELEVEES ONT UNE MORPHOLOGIE INTACTE ET SONT FONCTIONNELLES. 108
FIGURE 46. PHOTO D'UN POSTE D'ELECTROPHYSIOLOGIE EMPLOYE ICI POUR PRELEVER LES NEURONES MOR23 GFP DISSOCIES. 108
FIGURE 47. MICROGRAPHIE PRISE SUR UN POSTE DE MICRODISSECTION LASER. 109
FIGURE 48. REPRESENTATION DES PARAMETRES CELLULAIRES MESURES PAR CYTOMETRIE SUR DES NEURONES OLFACTIFS DISSOCIES. 111
FIGURE 49. AMPLIFICATION D'ADNC A PARTIR D'UNE SEULE CELLULE. 114
FIGURE 50. OPTIMISATION DE LA DIGESTION DE L'ADNG DE CELLULES ISOLEES. 114
FIGURE 51. DIAGRAMME RECAPITULATIF DES ETAPES A SUIVRE POUR ANALYSER PAR QPCR LES GENES D'INTERETS ISSUS DE CELLULES DISSOCIEES. 116
FIGURE 52. PRESENTATION DES LAMES SELECTIONNEES POUR L'ANALYSE HISTOLOGIQUE DE L'EPITHELIUM OLFACTIF. 121
FIGURE 53. COUPE SAGITTALE DE LA CAVITE NASALE DE MURIN PRESENTANT LES DIFFERENTES ZONES ETUDIEES DE L'EPITHELIUM OLFACTIF. 122
FIGURE 54. RECAPITULATIF DU PROTOCOLE DE COMPTAGE DE NEURONES MATURES ET IMMATURES PAR IMMUNOHISTOCHIMIE. 123
FIGURE 55. DEROULEMENT TEMPOREL DU PROTOCOLE D'ENREGISTREMENT DES EOG. 125
FIGURE 56. PHOTO D'UNE PREPARATION PLACEE SOUS LE MICROSCOPE DU POSTE D'EOG. 126
FIGURE 57. VARIABLES MESUREES DE CINETIQUES DE REPONSES EOG. 127
FIGURE 58. PLANCHE A TROU UTILISEE POUR LES MESURES COMPORTEMENTALES. 128
A- CONFIGURATION PLANCHE A DEUX TROUS (TEST DE CHOIX). B- CONFIGURATION PLANCHE A UN TROU (TEST D'EXPLORATION). C- RECIPIENT EN VERRE CONTENANT L'ODORANT. D- SCHEMA DU CIRCUIT INTEGRE (QT110) CONNECTE AUX ELECTRODES DU TROU (BUSTO, ELIE ET AL. 2009). E- PLANCHE A UN TROU AVEC « CARRE ». 128
FIGURE 59. L'EXPOSITION AU LYRAL PROVOQUE UNE CHUTE DE LA DENSITE DES NEURONES MOR23 GFP DANS LA PARTIE SEPTALE DE L'EO. 131
FIGURE 60. L'EXPOSITION AU LYRAL PROVOQUE UNE CHUTE DU NOMBRE DE NEURONES MOR23 GFP DANS L'EPITHELIUM OLFACTIF. 131
FIGURE 61. L'EXPOSITION AU LYRAL PROVOQUE UNE CHUTE DU NOMBRE DE NEURONE MOR23 GFP DANS LA PARTIE MEDIANE DE L'EPITHELIUM OLFACTIF. 132

FIGURE 62. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARNM DU RECEPTEUR MOR23 ET DE LA PROTEINE GFP A L'ECHELLE DU TISSU. 134
FIGURE 63. GROUPEMENT HIERARCHIQUE DE 19 TRANSCRITS EXPRIME DANS LE NEURONE OLFACTIF DIFFERENTIELLEMENT EXPRIME LORS DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL..... 135
FIGURE 64. EVALUATION DES CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE DES SOURIS AU NIVEAU CELLULAIRE PAR RT-QPCR 138
FIGURE 65. « BOXPLOT » PRESENTANT LES CT DES GENES DE NORMALISATION (SUCLG ET B-ACTINE) A PARTIR DE NEURONES MOR23 UNIQUES. 139
LES DEUX BOITES DE GAUCHE MONTRENT LA DISTRIBUTION DES CT DU GENE SUCLG ENTRE LES DEUX GROUPES. LES DEUX BOITES DE DROITE, PRESENTENT LA DISTRIBUTION DES CT DE LA B-ACTINE. 139
FIGURE 66. DIAGRAMMES « BOXPLOT » PRESENTANT LES ΔCT DES GENES ANALYSES DES NEURONES MOR23 ENTRE LES GROUPES DE SOURIS EXPOSEES ET CONTROLES. 140
FIGURE 67. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION SUR LES PROPRIETES ELECTRIQUES DES NEURONES MOR23. . 142
EXEMPLES D'ENREGISTREMENTS DE COURANTS DE NEURONES MOR23 ISSUS DE SOURIS EXPOSEES (A) OU NON (B) AU LYRAL. C- COURBES DOSE-REPONSE DES COURANTS NORMALISES A L'AMPLITUDE DU COURANT MAXIMAL. LES HISTOGRAMMES INDIQUENT LES CHANGEMENTS DU TEMPS D'ATTAQUE (RISE TIME), DU TEMPS DE REPOLARISATION (TIME AT 50%) ET DE LA SURFACE TOTALE DE COURANT (TOTAL CURRENT) EN REPONSE A UNE STIMULATION DE 10µM DE LYRAL OBSERVEE CHEZ LES NEURONES DE SOURIS EXPOSEES AU LYRAL. L'AMPLITUDE DE REPONSE AU LYRAL NE VARIE PAS ENTRE LES DEUX GROUPES. . 142
FIGURE 68. ILLUSTRATION INDIQUANT LES ENREGISTREMENTS EXTRACELLULAIRES EN POTENTIEL DE CHAMP. 143
FIGURE 69. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION SUR L'AMPLITUDE DE REPONSE AU LYRAL. 144
FIGURE 70. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LES PARAMETRES DE CINETIQUE DE REPONSE AU LYRAL. 145
FIGURE 72. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LE TEMPS PASSE DANS LE CARRE (DILUE AU 1000EME). 146
FIGURE 73. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LA PREFERENCE ENTRE DEUX ODEURS. 147
FIGURE 74. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR L'AMPLITUDE DE REPONSES AU MELANGE D'ODORANTS. 149
FIGURE 76. GROUPEMENT HIERARCHIQUE DE 41 TRANSCRITS EXPRIME DANS L'EPITHELIUM OLFACTIF. 152
FIGURE 77. « VOLCANO PLOT » MONTRANT QU'UN SEUL ARNM EST SIGNIFICATIVEMENT EXPRIME PARMI 41 TRANSCRITS ETUDIES. 153
FIGURE 78. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LES PENTES DE REPOLARISATION DES REPONSES AUX ODORANTS. 156
FIGURE 79. IMAGES MONTRANT LES DIFFERENTES MESURES REALISEES SUR LA PARTIE SEPTALE ET DORSALE DE L'EPITHELIUM OLFACTIF. 158
FIGURE 80. MESURE D'EPAISSEUR DES COUCHES DE NEURONES MATURES ET IMMATURES. 158
FIGURE 81. MESURE D'EPAISSEUR ZONALE. 159
FIGURE 82. ASPECT HISTOLOGIQUE DE L'EPITHELIUM OLFACTIF DE SOURIS EXPOSEES (EXPO) ET DE SOURIS NON EXPOSEES (CTRL).DANS CETTE ILLUSTRATION, ON PEUT VOIR LA COUCHE DES NEURONES MATURES MARQUEE PAR L'OMP (COULEUR BLEUE) ET LA COUCHE DES NEURONES IMMATURES MARQUEE PAR GAP43 (COULEUR ROUGE). CES DEUX COUCHES SONT SEPAREES PAR UNE LIGNE BLANCHE POINTILLEE ET LA LAME BASALE EST INDIQUEE PAR UNE LIGNE BLANCHE CONTINUE. 160
FIGURE 83. CONSEQUENCES DE L'ARRET DE L'EXPOSITION AU LYRAL SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARNM DU RECEPTEUR MOR23 PAR NEURONE MOR23. 162
FIGURE 84. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL ET A L'ACETOPHENONE SUR LA DENSITE DE NEURONES M71. 164
FIGURE 85. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL ET A L'ACETOPHENONE SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARNM DU RECEPTEUR M71 A L'ECHELLE DU TISSU. 165

FIGURE 86. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL ET A L'ACETOPHENONE SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARNM DES CANAUX CATIONIQUES NUCLEOTIDES CYCLIQUES DEPENDANTS (CNGA2) A L'ECHELLE DU TISSU. 166
FIGURE 87. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE A L'ACETOPHENONE SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARNM DE CNGA2 ET D'AC3 PAR NEURONE M71. 167
FIGURE 88. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR L'AMPLITUDE DE REPONSE A L'ACETOPHENONE. HISTOGRAMMES INDIQUANT LES AMPLITUDES DE REPONSES AUX DEUX CONCENTRATIONS D'ACETOPHENONE (DILUE 100X ET 1000X) SUR DES SOURIS EXPOSEES OU PAS AU LYRAL. (NS= DIFFERENCE NON SIGNIFICATIVE). 169
FIGURE 89. CONSEQUENCE DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LES PARAMETRES DE CINETIQUE DE REPONSE A L'ACETOPHENONE. 169
FIGURE 90. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION POSTNATALE AU LYRAL SUR LE TAUX D'EXPRESSION DE LA PROTEINE CASPASE-3 CLIVEE A L'ECHELLE DU TISSU OLFACTIF. 171
FIGURE 91. MICROGRAPHIES DE COUPES CORONALES D'EPITHELIUMS OLFACTIFS DE SOURIS MOR23 GFP MARQUEES A L'OMP ET A LA GAP43. 172
FIGURE 92. QUANTIFICATION DES NEURONES MOR23 MATURES ET IMMATURES. 173
FIGURE 93. QUANTIFICATION ZONALE DES NEURONES MOR23 MATURES ET IMMATURES. 175
FIGURE 94. SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME DE COMPENSATION MIS EN PLACE DURANT L'EXPOSITION POSTNATALE. 182
FIGURE 95. DECOURS TEMPOREL DE LA PRODUCTION DE P-CREB EN REPONSE AU LYRAL. 183
FIGURE 96. SCHEMA DU MECANISME MOLECULAIRE PROPOSE DANS LA STIMULATION DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR MOR23 ET DES ELEMENTS DE LA CASCADE DE TRANSDUCTION. 184
FIGURE 97. SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME DE RECUPERATION DU SYSTEME OLFACTIF MIS EN PLACE PENDANT LA PERIODE DE RECUPERATION. 188
FIGURE 98. ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DE LA CASPASE-3 DURANT LE DEVELOPPEMENT. 191
FIGURE 99. MODELE EXPLIQUANT LE DEROULEMENT DE LA PLASTICITE DES NEURONES MOR23. 192

INTRODUCTION

L'olfaction correspond à la perception par le système olfactif d'un mélange de composés chimiques (souvent volatils), qualifiés de molécules odorantes. Le système olfactif constitue l'un des sens chimiques les plus anciens, et les plus primitifs dans l'évolution des espèces. Dominant dans le monde animal, il semble être chez l'homme un sens marginal, en comparaison à la vision et l'audition. Ceci s'explique par le fait que l'homme communique d'abord par les gestes et la parole.

En outre, chez l'animal, l'odorat contribue à ses fonctions vitales. L'olfaction joue un rôle important dans la reproduction (recherche de partenaires sexuels), l'alimentation et la détection de prédateurs.

Au cours des deux dernières décennies, une récolte importante de faits expérimentaux ont permis de caractériser les différents stades de la genèse olfactive ainsi que les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui les régulent.

Le turnover des neurones olfactifs étant tributaire des facteurs environnementaux (qui interagissent continuellement avec les cils olfactifs), il n'existe cependant que très peu de connaissances actuelles sur le rôle de l'environnement dans la neurogénèse de la muqueuse olfactive.

S'il est acquis aujourd'hui que la stimulation olfactive d'un individu provoque des changements physiologiques, anatomiques et fonctionnels au niveau périphérique et central, les conséquences d'une exposition olfactive durant la période post-natale à l'échelle du neurone restent mal connues.

Par ailleurs, au cours de récentes analyses anatomiques du système olfactif de souris, il a été montré dans l'équipe que les modifications environnementales (par exposition postnatale de souris au Lyral) provoquent une chute de la densité de neurones olfactifs spécifiques à l'odeur. Le neurone olfactif représente le constituant majeur du système olfactif dans la transduction du signal olfactif.

Dès lors, il convient de se demander si l'animal est capable de trouver un moyen de compenser la perturbation du système olfactif qui lui est vital.

Autrement-dit, est-ce que cette modulation anatomique implique une adaptation moléculaire et fonctionnelle des neurones olfactifs aussi bien à court terme qu'à long terme ?

La première hypothèse de ce travail de thèse sera donc de conduire une analyse moléculaire ciblée sur une population de neurones MOR23 pure.

Ainsi, une importante partie de mes travaux de thèse sera consacrée au développement d'une stratégie d'isolement et d'analyse d'une population pure de neurones olfactifs.

A cette analyse, sera ajoutée une étude fonctionnelle des neurones MOR23 et d'une population de neurones sensibles au Lyral.

Récemment des travaux ont rapporté que l'exposition d'individus comme les saumons argentés (Sandahl, Baldwin et al. 2005; Little, Calfee et al. 2012) ou la souris (Genter 2006) à un composé toxique (ex : le cuivre ou le naphtalène), provoque une neurotoxicité de la muqueuse olfactive. Cette toxicité est accompagnée de troubles de la muqueuse olfactive qui se traduisent par : une perte fonctionnelle (observée en EOG : électro-olfactogramme) (Tierney, Sampson et al. 2008), une induction d'enzymes de détoxification (Genter, Marlowe et al. 2006; Baldwin, Tatara et al. 2011) et à une modification de l'aspect histologique (Brenneman, James et al. 2000).

Sachant que le Lyral (hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde), auxquelles mes souris sont exposées, a des propriétés toxiques (Adriana Polańska 2010), la **deuxième hypothèse** de ce travail est donc de vérifier que notre condition d'exposition n'induit pas une toxicité dans l'épithélium olfactif.

Pour répondre à cette question, l'aspect fonctionnel (EOG), « transcriptomique » et anatomique de la muqueuse sera analysé. Ainsi, cette étude nous donnera une indication sur l'état général du tissu.

La **troisième hypothèse** de ce travail de thèse repose sur l'idée que la plasticité du système olfactif lui permet de s'adapter transitoirement à son environnement (comme peuvent l'attester les travaux de (Rochefort and Lledo 2005). Dans ce cas, les souris soumises à une exposition au Lyral devraient récupérer après l'arrêt d'exposition. Nous verrons si tel est le cas, tant sur plan anatomique que moléculaire.

L'outil d'analyse de populations spécifiques de neurones servira aussi à la **quatrième hypothèse** de travail qui postule que l'atteinte anatomique de la muqueuse olfactive est dépendante de l'odorant.

En effet cette hypothèse s'appuie sur des faits expérimentaux décrits dans la littérature. Parmi ces faits, il y a ceux rapportés par Wang et Wysocki (Wang, Wysocki et al. 1993) qui ont montré que la sensibilisation physiologique de souris à une odeur par odorisation répétée est dépendante de la nature de l'odorant. Ces travaux suggèrent que cette sensibilisation par exposition à l'odeur est associée à deux hypothèses : i) une augmentation du nombre de neurones récepteurs spécifiques à l'odeur et/ou ii) une augmentation du nombre de récepteurs par neurone.

C'est pourquoi, j'évaluerai les conséquences moléculaires de l'exposition postnatale de souris à l'acétophénone. L'acétophénone est le ligand spécifique du récepteur M71 que nous pouvons également suivre à l'aide de marquages génétiques. De la même manière que pour l'étude sur le Lyral, ces travaux se dérouleront bien évidemment à la suite d'analyses histologiques de la muqueuse olfactive afin de déterminer si l'acétophénone affecte la population de M71. Une analyse fonctionnelle par étude comparative des amplitudes de réponse à l'acétophénone en EOG a été effectuée sur des souris exposées ou non au Lyral. Cette étude permettra de savoir si le Lyral affecte des populations de neurones insensibles au Lyral.

La densité des neurones olfactifs est sous le contrôle de l'équilibre entre la neurogénèse et l'apoptose des neurones matures. Il a été montré récemment que le processus apoptotique des neurones olfactifs est accéléré par une sur-stimulation de la muqueuse olfactive (Brauchi, Cea et al. 2006). Ainsi, on peut se demander si l'exposition post-natale va affecter la population des neurones matures. La **cinquième hypothèse** de travail sera donc de vérifier l'éventuelle baisse des neurones matures par quantification de neurones MOR23 exprimant aussi l'OMP (marqueur de neurones olfactifs matures).

Afin de préciser le contexte scientifique de mes travaux, je proposerai dans un premier chapitre composé de quatre parties (**Chapitre 1**) de faire une synthèse des connaissances scientifiques relatives à notre problématique de recherche.

Pour cela, dans un premier temps (**partie 1**), je décrirai l'organisation particulière de l'organe sensoriel primaire, la muqueuse olfactive, ainsi que celle du centre olfactif primaire, appelé bulbe olfactif. Dans cette première partie sera détaillée le neurone de premier ordre, le neurone récepteur olfactif (sa structure, sa fonction de récepteur de composés chimiques, ainsi que les voies de transduction). Puis dans une deuxième partie (**partie 2**), j'exposerai les aspects génétiques et structuraux du récepteur olfactif et j'en profiterai pour décrire les récepteurs (MOR23 et M71), objets d'étude de ma thèse.

Ensuite, dans une troisième partie (**partie 3**) je ferai l'état des lieux des connaissances en matière de neurogenèse olfactive et des facteurs - intrinsèques et extrinsèques - qui y sont associés. J'en profiterai pour décrire les quelques études portées sur la neurogenèse et l'environnement qui tendent à montrer l'impact et le rôle de l'environnement sur le développement du système olfactif. Et finalement, au vu de la première problématique posée (connaître les conséquences moléculaires et physiologiques d'une adaptation périphérique induite par une odorisation post-natale), il sera consacré une quatrième partie (**partie 4**) abordant les différentes possibilités techniques d'étude de populations homogènes de cellules.

A la suite de ce compte rendu des données disponibles dans la littérature, un second chapitre (**chapitre II**) composé de six parties sera consacré aux données expérimentales. La première partie (**partie 1**) concerne les protocoles expérimentaux mis en œuvre tout au long de cette thèse afin de répondre à nos questions. Cette partie inclura, le protocole d'odorisation, les analyses de biologie moléculaire tant à l'échelle tissulaire que cellulaire, les mesures et marquages histologiques ainsi que les analyses fonctionnelles (électrophysiologiques) sur la muqueuse olfactive.

Les parties suivantes présenteront les différentes études menées au cours de ma thèse. Celles-ci correspondent aux questions de recherches posées.

La deuxième partie (**partie 2**) aborde les résultats : l'exposition post-natale au Lyral induit des changements du système olfactif tant sur le plan anatomique, moléculaire que physiologique.

La troisième partie (**partie 3**) exposera les résultats des tests fonctionnels, transcriptomiques, anatomiques et comportementaux. Les résultats montrent que l'exposition au Lyral ne

perturbe pas respectivement : les propriétés électriques, le statut transcriptomique, le nombre de cellules et les performances de l'épithélium olfactif.

Dans une quatrième partie (**partie 4**), à travers des résultats d'analyse de densité de neurone et de PCR en temps réel sur neurones isolés, je montrerai que l'adaptation aux modifications environnementales est transitoire, tant sur le plan anatomique que moléculaire.

La cinquième partie (**partie 5**) exposera les résultats d'analyse de biologie moléculaire sur une échelle cellulaire permettant de répondre à la deuxième problématique de recherche qui est de savoir si l'effet d'adaptation observée est spécifique du couple ligand-récepteur. Pour cela une analyse de biologie-moléculaire sera faite sur une population de neurones M71 à partir de souris exposées à l'acétophénone.

Dans une dernière partie de ce chapitre (**partie 6**), je montrerai, à travers des données d'immuno-marquages sur tranches d'épithélium olfactif, que la réduction du nombre de neurones à la suite de l'expérience olfactive post-natale ne concerne que les neurones matures.

Pour conclure cette thèse, une discussion générale (**chapitre III**) offrira une synthèse des résultats obtenus. Cette discussion dresse le bilan des résultats obtenus par les différentes études menées dans cette thèse en les confrontant aux données de la littérature. Des perspectives de recherche liées à nos travaux seront ensuite exposées, proposant par exemple, l'étude du mécanisme moléculaire impliqué dans la plasticité du neurone olfactif.

Chapitre I : Données bibliographiques

Partie 1 : Le système olfactif (principal et accessoire)

Depuis un peu plus d'une vingtaine d'années, les travaux sur l'olfaction connaissent un nouvel essor. C'est à Linda Buck et Richard Axel (Buck and Axel 1991) que l'on doit d'avoir repris le flambeau d'une recherche bien conduite sur le fonctionnement du système olfactif, grâce à la publication de la famille des gènes qui codent pour les récepteurs olfactifs. L'ensemble de leurs contributions, qui a ouvert la voie à de nombreuses études abordant l'olfaction par des approches diversifiées, a été récompensé par le prix Nobel en 2004.

Le système olfactif comprend à la périphérie, l'organe sensoriel primaire et au niveau central, le centre olfactif primaire et les centres olfactifs supérieurs. L'organe sensoriel primaire a pour sites majeurs d'entrée d'information olfactive dans l'organisme, l'épithélium olfactif principal et l'organe voméronasal. Le centre olfactif primaire comprend les bulbes olfactifs principaux et accessoires.

Cette première partie est consacrée à l'aspect anatomique et fonctionnel du système olfactif périphérique et du centre olfactif primaire chez les Rongeurs.

Les stimuli olfactifs

Le système olfactif possède une grande capacité à discriminer un grand nombre de molécules odorantes. Le nombre d'odeurs différentes que l'on peut distinguer est toujours sujet à discussions. Il peut atteindre plus de 10 000 pour un professionnel entraîné, et ceci, à des concentrations qui peuvent être extrêmement faibles. L'odeur est une sensation résultant de la reconnaissance d'un seul composé ou d'un mélange de plusieurs molécules chimiques: les odorants.

Pour qu'une substance possède des propriétés odorantes, il faut qu'elle respecte plusieurs paramètres physico-chimiques. Avant tout, afin d'être volatile et de pouvoir atteindre les fosses nasales, elle doit avoir une pression de vapeur élevée et un poids moléculaire modéré, inférieur à 350 Da. Puis, elle doit avoir une faible polarité et une certaine solubilité dans l'eau pour se dissoudre dans le mucus. Et finalement, elle doit avoir un caractère lipophile élevé (Ohloff 1986; Chastrette 1997). Le système olfactif peut également détecter des molécules non volatiles comme les phéromones. Les phéromones sont détectées par un organe spécialisé dans la détection des phéromones: l'organe voméronasal. Certaines phéromones peuvent

cependant être reconnues par l'EO (Buck 2000). L'étude des relations structure/odeur montre que la plupart des molécules de structure similaire ont des odeurs voisines. Cependant cette observation n'est pas générale, des composés à structures très éloignées peuvent présenter des notes similaires, et vice versa. C'est le cas par exemple du n-nonanal et de l'acétophénone, deux composés à structures très différentes ayant une même note florale.

L'organe sensoriel primaire.

Aux points principaux d'entrée de l'information olfactive à l'organisme (EO et OVN) s'ajoutent deux autres sous-systèmes olfactifs : l'organe septal (OS) et le ganglion de Grueneberg (GG). Cette partie est consacrée à la description de l'organisation anatomique et fonctionnelle de l'ensemble de ces sous-systèmes olfactifs (**figure 1**).

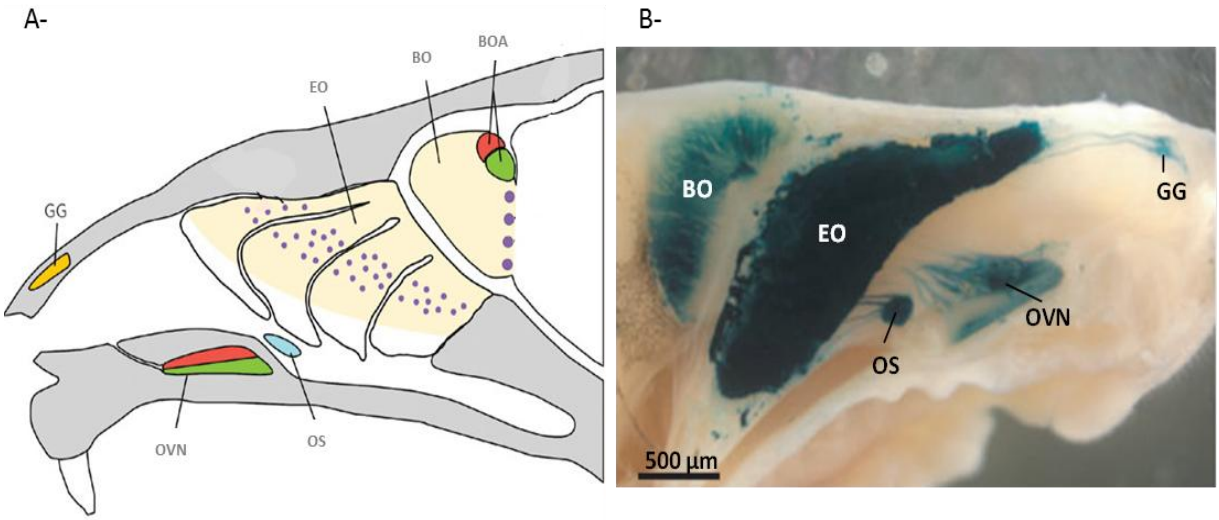


Figure 1. Représentation des sous-systèmes olfactifs, du bulbe olfactif et de leurs organes accessoires (OVN et BOA).

A-Schéma d'une coupe sagittale de cavité nasale de rat mettant en évidence l'organisation du système olfactif (périphérique et central (D'après (Brennan and Zufall 2006)).**B-** Coupe sagittale de la cavité nasale et de la partie antérieure du cerveau de souris (Omp-IRES-tau:LacZ). Cette illustration indique les neurones olfactifs matures (en bleu), identifiés grâce au marquage de l'OMP, protéine exprimée exclusivement dans les neurones olfactifs matures. (Image adaptée de (Munger, Leinders-Zufall et al. 2009)). Le système olfactif périphérique est constitué de l'épithélium olfactif principal (EO), le système olfactif accessoire, l'organe voméronasal (OVN) et les sous-systèmes : le ganglion de Grüneberg (GG) et l'organe septal (OS). Le système olfactif central contient le bulbe olfactif principal (BO) et le bulbe olfactif accessoire (BOA).

L'épithélium olfactif principal

Cette partie fera l'objet de la description de l'organisation de l'épithélium olfactif principal chez le rongeur, c'est-à-dire sa composition cellulaire. De plus j'aborderai très brièvement la fonction de chaque type cellulaire constituant l'EO.

Chez les Vertébrés, les molécules odorantes empruntent deux voies pour atteindre l'épithélium olfactif. La première est la voie orthonasale (par inhalation) et la seconde est dite rétronasale. La seconde voie est appelée ainsi car les molécules odorantes remontent de la bouche (après mastication des aliments qui libèrent des molécules odorantes), en passant par les choanes derrière le pharynx (**figure2).**

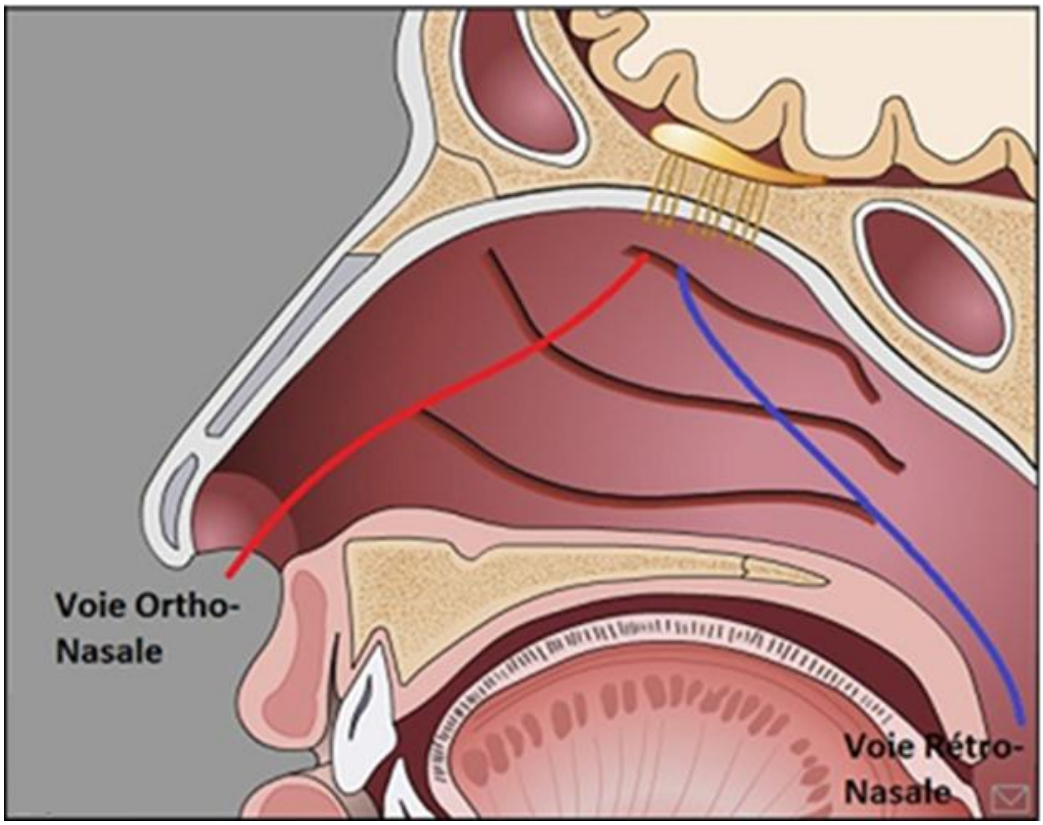


Figure 2. Coupe schématique transversale de la cavité nasale humaine

Les flèches rouges et bleues indiquent les voies olfactives respectivement orthonasale et rétronasale (illustration reprise de www.biologieenflash.net)

L'épithélium olfactif principal est un neuroépithélium pseudostratifié qui tapisse une grande partie de la cavité nasale chez les rongeurs. Sa fonction principale est la détection des odeurs. Il est le siège de la transduction olfactive. Cet épithélium est dit pseudostratifié car bien qu'il

soit constitué d'une seule couche, ses noyaux cellulaires sont localisés à différents niveaux de l'épithélium, donnant l'impression que les cellules sont stratifiées (**figure 3**).

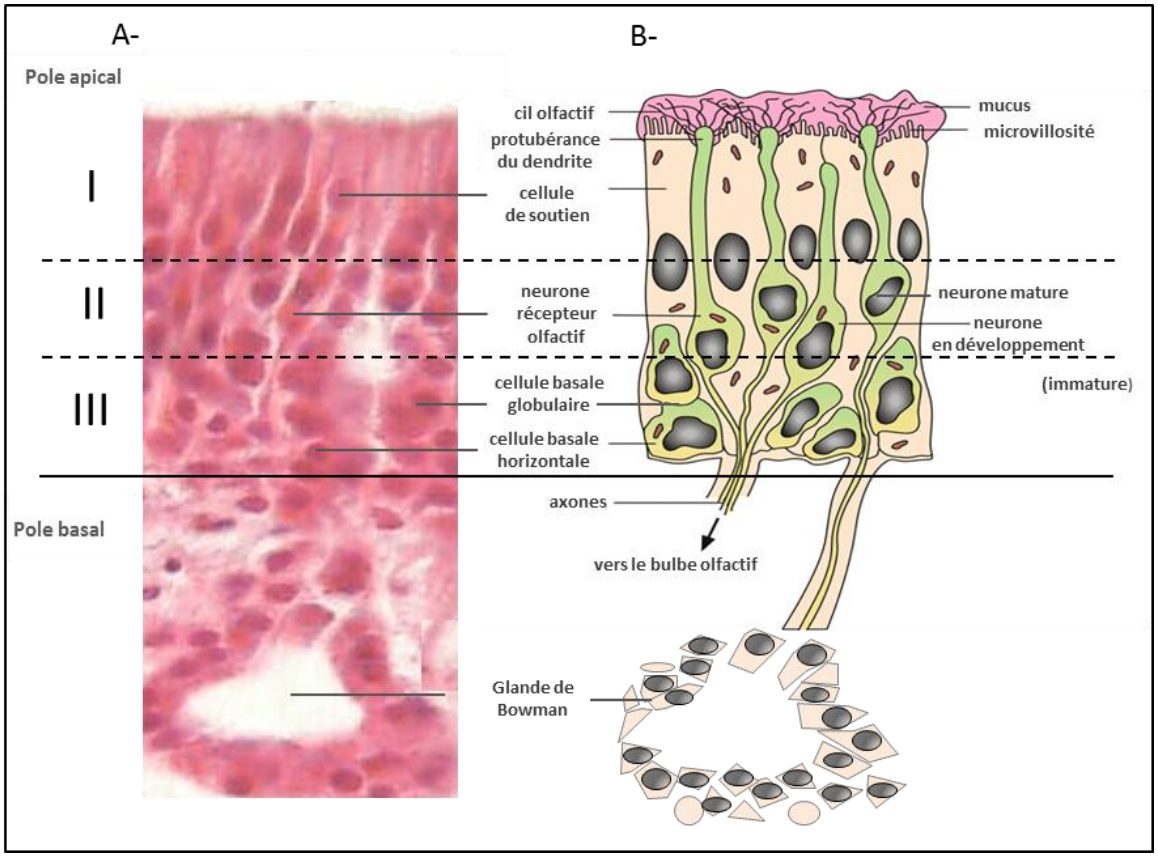


Figure 3. Les trois compartiments majeurs de l'épithélium olfactif et la position relative des différents types cellulaires dans ces compartiments.

A- Coupe de l'épithélium olfactif colorée à l'H/E Van Gieson *(adaptée de neuromedia.neurobio.ucla.edu*).**B-** Illustration schématique de l'épithélium olfactif de vertébrés montrant les trois compartiments majeurs (adaptée de (Andres 1966)). Le premier compartiment (I) contient le corps cellulaire des cellules de soutien. Le compartiment du milieu (II) contient le corps cellulaire des neurones récepteurs olfactifs (matures et immatures). Le dernier compartiment (III) contient le corps cellulaire cellules basales (Calof, Bonnin et al. 2002; Schwob 2002). L'EO repose sur la lamina propria dans laquelle se trouve des cellules glandulaires organisées en glande de Bowman. (La ligne pointillée délimite les trois compartiments ; la ligne continue indique la lame basale).

Chez la souris, l'EO, contient entre 2 et 3 millions de NRO. La principale fonction des NRO est de détecter les odeurs et de transmettre l'information olfactive aux centres olfactifs (Ma 2007). Plusieurs autres types de cellules résident dans l'EO en plus des NRO : les cellules de soutien, les cellules basales et les cellules microvillaires.

Les cellules sustentaculaires, appelées cellules de soutien s'étendent sur toute la hauteur de l'épithélium de la lame basale à la lumière nasale. En plus d'assurer un rôle de protection du tissu olfactif vis-à-vis des xénobiotiques et d'assurer son maintien mécanique, elles contrôlent l'environnement ionique de l'EO. La majorité des cellules basales repose sur la lame basale et permet le renouvellement de tous les types cellulaires de l'EO. Les cellules microvillaires (CM) dont les fonctions ne sont toujours pas élucidées ont une structure morphologique assez proche des NRO. En revanche certaines CM sont dépourvues d'axone (Hegg, Jia et al. 2010).

Sous l'épithélium se situe une sous-muqueuse, appelée encore *lamina propria mucosae*, séparée de l'EO par la lame basale. L'ensemble constitue la muqueuse olfactive.

Au niveau de la sous-muqueuse se situent des cellules glandulaires qui, en s'associant, forment les glandes de Bowman, GB. Les GB sécrètent un mucus qui est transporté vers la lumière nasale à travers des conduits de type tubulaire.

Après cette brève description des différentes cellules qui constituent l'épithélium neurosensoriel olfactif, je poursuivrai cette synthèse bibliographique de l'EO par la description détaillée de l'ensemble de ces cellules.

Les différents types cellulaires de l'EO et les glandes de Bowman :

Les cellules de soutien

Les cellules de soutien, appelées aussi cellules sus-tentaculaires, représentent environ 15 à 25% de la population totale de l'épithélium olfactif. Elles se juxtaposent entre les neurones olfactifs. Les cellules de soutien sont des cellules de grande taille comportant de longues et irrégulières microvillosités qui s'entremêlent avec les cils des NRO (Graziadei and Graziadei 1979). Leurs noyaux sont plus apicaux que ceux des autres cellules épithéliales olfactives.

Ces cellules ont plusieurs fonctions. i) Elles stabilisent mécaniquement l'épithélium (Getchell, Rafols et al. 1984). ii) Elles expriment des cytochromeP-450, ce qui leur permet de métaboliser des agents toxiques et de dégrader des substances organiques (Dahl, Hadley et al. 1982; Voigt, Guengerich et al. 1985; Petridou-Fischer and Dahl 1988; Nef, Heldman et al. 1989). iii) Elles phagocytent les NRO morts (Suzuki, Takeda et al. 1996). iiii) Elles séparent et isolent électriquement les NRO de telle sorte que leurs dendrites ne se rencontrent jamais (Getchell, Rafols et al. 1984). iiiii) Finalement elles participent au maintien de la composition

ionique du mucus (Getchell, Rafols et al. 1984) et seraient capable de proliférer (Weiler and Farbman 1998).

Les cellules basales (horizontales et globuleuses)

Au cours de la vie de l'animal, la neurogénèse est continuellement active dans l'EO. La neurogénèse, qui est assurée par des cellules progénitrices, permet de renouveler et de remplacer des NRO morts ou mourants. Ces cellules progénitrices sont les cellules basales qui occupent la partie profonde de l'EO. Comme celles-ci se trouvent en contact physique direct avec les NRO, elles seraient capables de détecter la baisse de densité de neurones olfactifs matures et donc de produire de nouveaux NRO en cas de nécessité (Calof, Mumm et al. 1998).

Il existe deux types de cellules basales : les cellules basales horizontales et globulaires. Les cellules basales horizontales sont des cellules souches. Elles peuvent proliférer et se différencier en n'importe quelle autre cellule de l'épithélium olfactif, y compris en cellules basales globulaires (Carter, MacDonald et al. 2004) qui sont des précurseurs immédiats des neurones olfactifs (Newman, Feron et al. 2000).

Les cellules basales ne sont pas, à priori, les seules cellules impliquées dans la régénération des NRO. Les cellules engainantes de la muqueuse olfactive joueraient aussi un rôle important dans la régénération des NRO (Chehrehasa, Ekberg et al. 2012). La genèse des NRO à partir des précurseurs (les cellules basales) sera abordée dans la deuxième partie de l'introduction.

Les cellules microvillaires

Elles ont été identifiées dans l'EO vers la fin des années 60 par Okano et Andres (Asan and Drenckhahn 2005). Elles ont été décrites comme ayant des microvillosités à la surface de leur membrane, de la même manière que les cellules sus-tentaculaires. Toutefois, certaines d'entre elles se distinguent de ces dernières cellules, par la présence d'un axone dans leur partie basale. Ces cellules, nommées cellules microvillaires (CM) représentent plus de 1/20ème de la population de NRO.

Les CM ont des caractéristiques morphologiques particulières. Elles possèdent un corps cellulaire localisé dans le compartiment apical, au niveau des cellules de soutien, et émettent

vers le mucus une dendrite assez épaisse, tapissée à son extrémité par des microvillosités (Hegg, Jia et al. 2010). Un axone s'étend de son pôle basal et traverse la lamina propria. La fonction des cellules microvillaires de mammifères n'est toujours pas bien élucidée. La possibilité que les CM soit des neurones fait toujours l'objet de controverses. Les plus récentes découvertes laissent penser que ce type cellulaire jouerait un rôle dans la perception olfactive. Des éléments de la cascade de l'inositol triphosphate, IP3, auraient été localisés dans les CM (Elsaesser and Paysan 2007; Lin, Margolskee et al. 2007).

Plus récemment, il a été montré que les CM auraient une implication dans le renouvellement des NRO. Elles seraient capables de détecter les NRO morts et d'induire une neurogenèse en transmettant un signal de type neuroendocrinien (neuropeptide Y, NPY) aux cellules basales (Hegg, Jia et al. 2010).

Les neurones olfactifs

Les NRO constituent le type cellulaire le plus important représenté dans l'épithélium olfactif. Ce dernier en contient entre 2 à 3 millions chez le rongeur (Firestein 2001). Les NRO transmettent l'information perçue dans l'environnement vers le cerveau. Les NRO sont des neurones bipolaires, de forme (Hegg, Jia et al. 2010) fusiforme, intercalés entre les cellules de soutien et basales : ils présentent un prolongement dendritique qui atteint la surface du tissu et qui se termine par une dilatation (bouton dendritique) où s'insèrent des cils (**figure 4**).

Dans les cils, sont majoritairement exprimés des récepteurs aux molécules odorantes (Getchell 1986). Ceux-ci appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Chaque NRO n'exprime qu'un seul type de récepteur olfactif parmi un répertoire composé de 1200 gènes (Mombaerts 1999).

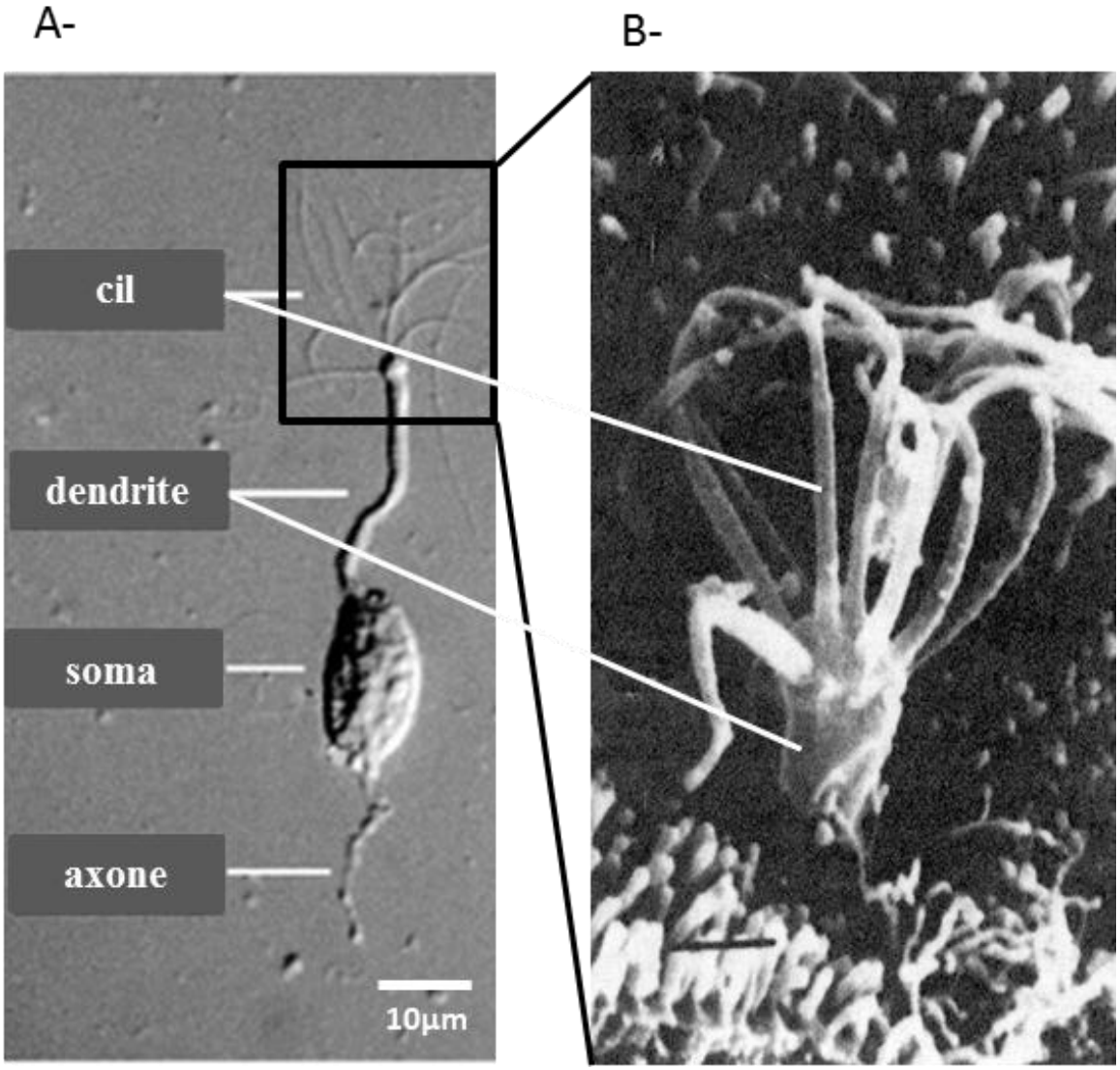


Figure 4. Représentation d'un NRO et d'un bouton dendritique observés par microscopie électronique.

A-Sur cette micrographie prise sous microscope inversée, sont indiqués les éléments caractéristiques d'un NRO : cil, dendrite, soma et axone. (D'après (Kleene and Gesteland 1981)) **B-**Micrographie d'un bouton dendritique montrant les cils olfactifs (D'après Morrisson & Constanzo).

Ainsi, les cils qui baignent dans le mucus recouvrant le tissu olfactif sont le site de la transduction sensorielle. Ils assurent la réception de signaux de nature chimique (les stimuli odorants), et leur transduction en un message de nature électrique (en potentiel récepteur puis en potentiels d'actions) pour ensuite le transmettre vers le système nerveux central (transmission centripète) (Firestein 2001; Zou, Feinstein et al. 2004). Les potentiels d'actions

se propagent le long de l'axone qui se projettent dans des structures du bulbe olfactif, appelées glomérules.

La majorité des neurones olfactifs de l'EO expriment des récepteurs olfactifs standards. Un nombre plus limité de neurones expriment une autre famille de gènes des récepteurs, les **TAARS** (trace-amine-récepteurs). Les TAARS sont sensibles aux amines volatiles (Liberles and Buck 2006; Hashiguchi and Nishida 2007; Zhang, Pacifico et al. 2013). Des données plus récentes ont classé certaines amines (excrétées dans les urines de souris mâles) telle la triméthylamine ou encore l'isoamylamine dans la liste des phéromones murines. En effet, telles les phéromones (voir description dans la partie : OVN) ces amines sont excrétées exceptionnellement dans les urines de souris mâles et provoquent des changements physiologiques chez les femelles qui les reçoivent (accélération de la puberté). Ainsi, ces données suggèrent que l'EO possède des récepteurs sensibles aux phéromones distincts, de la classe des récepteurs de l'OVN, renforçant le rôle de l'EO dans la détection de phéromones (Liberles SD, 2009). La cascade de transduction des neurones exprimant les récepteurs TAARs est la voie de l'AMPc. En effet, il a été montré récemment que ces neurones co-expriment certains éléments de la cascade tels, Golf, CNGA2, AC3, PDE1C et PDEA4 (Zhang, Pacifico et al. 2013). De plus, ces mêmes auteurs montrent à travers une expérience de patch-clamp sur NRO exprimant le récepteur TAAR 4 que l'inhibition de certains éléments de la cascade de l'AMPC (AC3 et PDE1C) module le courant de transduction. Enfin, une autre sous-population de neurones de l'EO exprime des récepteurs de type **GC-D** (guanylyl-cyclace-D). Ces cellules sont dépourvues des éléments de transduction associés à la cascade de signalisation de l'AMPc. Les éléments caractéristiques de leur cascade de transduction sont : GMPc, CNGA3, PDE2. (**figure 5B**). Certaines études ont montré que ces récepteurs sont impliqués dans la détection du dioxyde de carbone, CO_2, du monoxyde d'azote, NO, ((Hashiguchi and Nishida 2007; Munger, Leinders-Zufall et al. 2010) et du sulfure de carbone, CS_2 (Munger, Leinders-Zufall et al. 2010). Alors que les TAARS et les RO standards sont constitués de 7 domaines transmembranaires (TM), les récepteurs GC-D ne possèdent qu'un seul TM (**figure 5**).

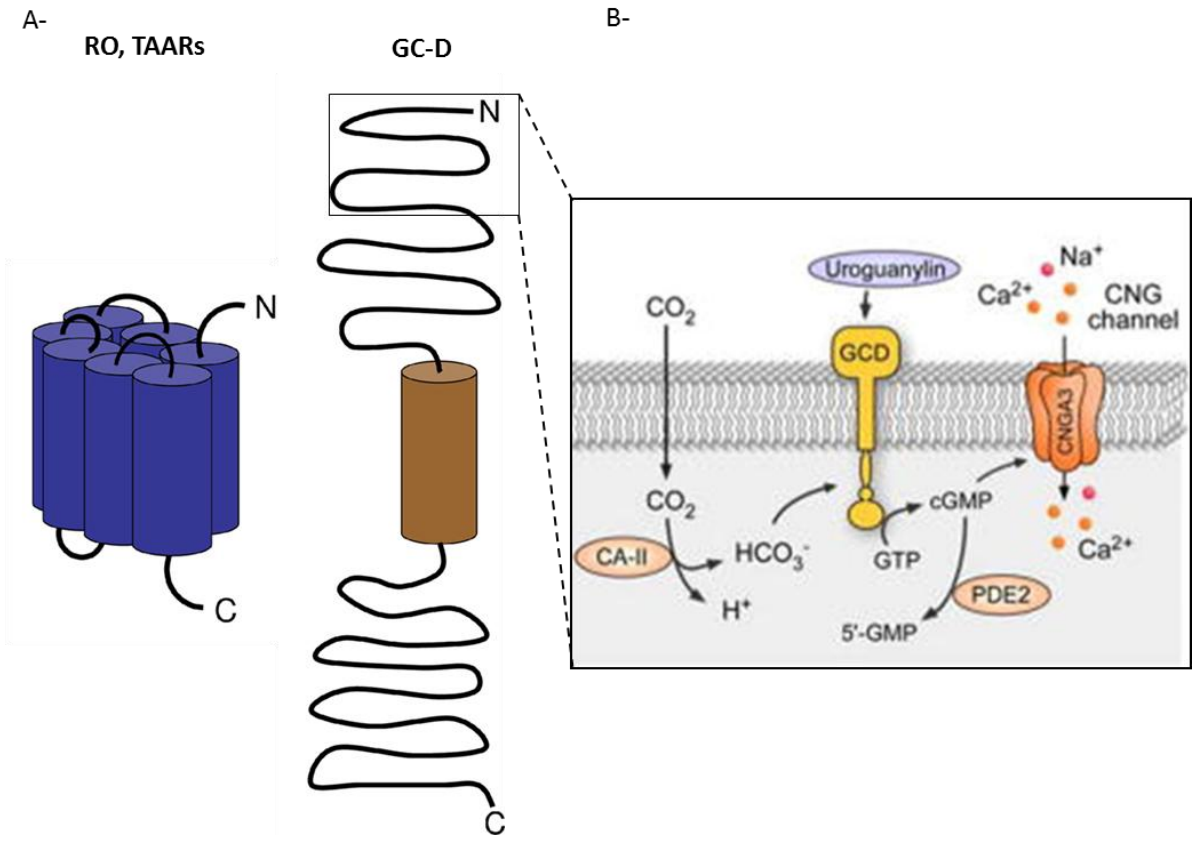


Figure 5.Topologie des récepteurs olfactifs et voie de signalisation dans les neurones GC-D.

A-Les RO et TAAR appartiennent aux RCPG à 7 domaines transmembranaires (indiqués par des cylindres). En revanche, la guanylate cyclase GC-D ne possède qu'un seul domaine transmembranaire. Tous ces types de récepteurs possèdent un domaine N-terminal localisé dans la face extérieure de la cellule et C-terminal intracellulaire. Les GC-D possèdent une longue extrémité N-terminal (D'après (Fleischer, Breer et al. 2009)). **B-**Voies de transduction du CO_2 et de l'uroguaniline dans les neurones exprimant le récepteur GC-D (D'après (Munger, Leinders-Zufall et al. 2010)).

Voies de signalisation du signal olfactif

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'olfaction. Les deux voies les plus étudiées sont celles de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et celle de l'inositol triphosphate (IP3), qui sont décrites ci-dessous.

La voie de l'AMPc

L'interaction odorant/récepteur au niveau des cils déclenche une cascade enzymatique (Getchell 1986) qui provoque une augmentation intra-ciliaire en AMP cyclique (**figure 6**), AMPc. L'AMPc induit l'ouverture des canaux couplés aux nucléotides cycliques, lequel permet l'influx de Na^+ et Ca^{2+} à l'intérieur du cil. Les canaux chlore dépendants du calcium

sont à leur tour activés, ce qui va permettre l'efflux de chlore vers l'extérieur; le chlore se trouvant très concentré dans le compartiment intérieur. Ceci va permettre d'obtenir un courant entrant (Frings, Hackos et al. 2000). En conséquence à la fixation de l'odorant, les NRO se dépolarisent (**figure 6A**). Cette dépolarisation se propage passivement vers la dendrite et le corps cellulaire du neurone pour enfin augmenter la fréquence de potentiels d'actions qui seront conduits le long de l'axone vers le BO ((Schild and Restrepo 1998; Firestein 2001; Menini, Lagostena et al. 2004). Les CNG permettent l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone pour l'activation du signal (Matthews and Reisert 2003).

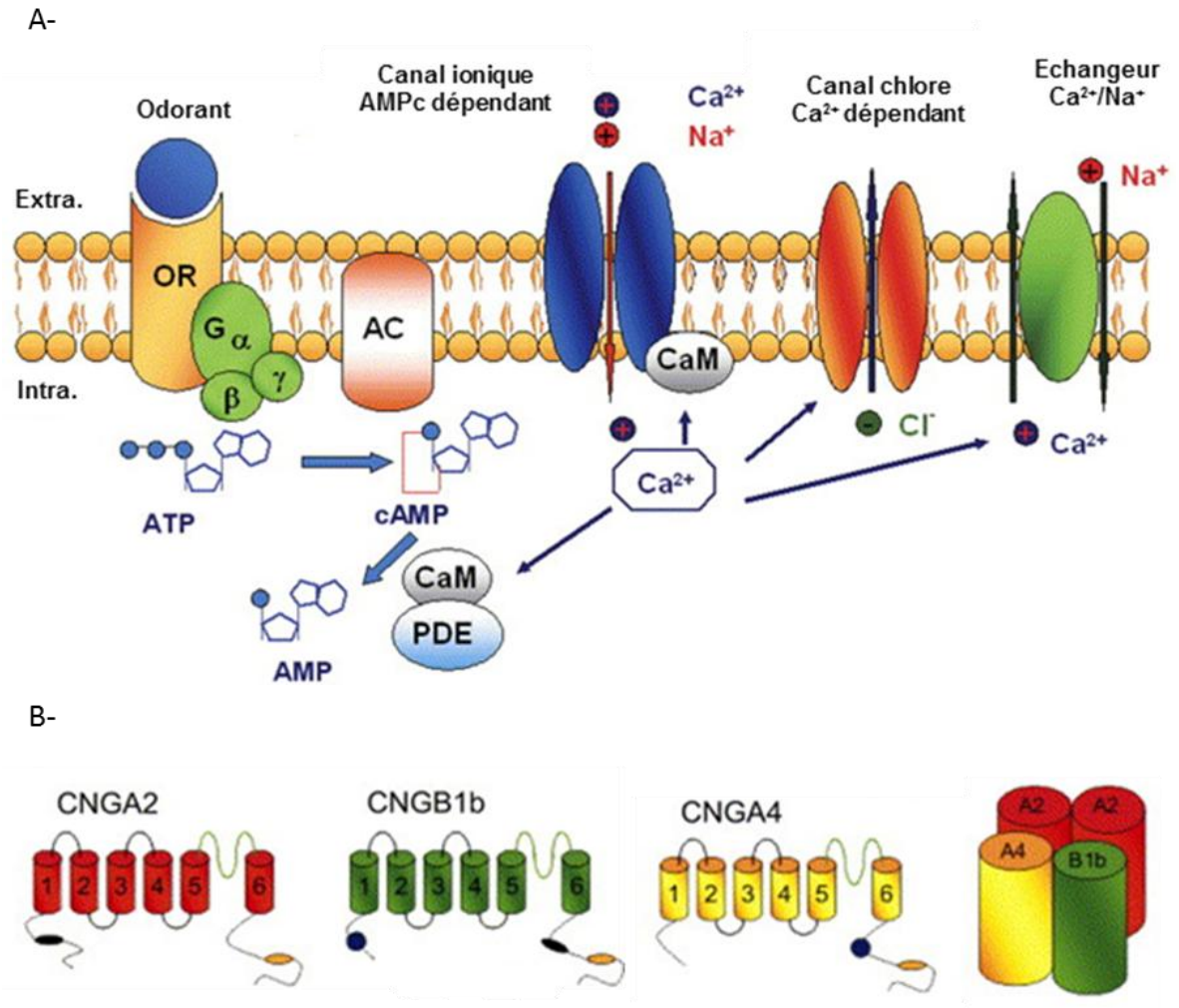


Figure 6. Représentation de la cascade de signalisation mettant en jeu l'AMPc et des sous-unités des canaux cycliques-nucléotides dépendants

A- Représentation schématique de la cascade de transduction du signal du neurone olfactif impliquant la voie AMPc. **B-** Modèle topologique et représentation des sous-unités des canaux couplés aux nuclétides cycliques olfactifs. AC: adénylate cyclase / caM : calmoduline / PDE : phosphodiestérase / CNGA2, A4 et B1b : sous-unités du canal ionique AMPc dépendant **(D'après (Pifferi, Pascarella et al. 2006)).**

Le complexe Ca^{2+}/calmoduline, active d'une part les phosphodiestérases (PDE1C et PDE4A) qui hydrolysent l'AMPC (Borisy, Ronnett et al. 1992) et d'autre part, inhibe les canaux CNG par feedback négatif (Kurahashi and Menini 1997) , jouant un rôle dans l'adaptation (Galizia and Sachse 2010).

En effet, les NRO s'adaptent rapidement au stimulus olfactif, suite à de courtes expositions répétées à l'odorant. Cette adaptation se manifeste par une baisse de la réponse calcium-dépendante (Kawai, Kurahashi et al. 1997).

Kurahashi et Menini en 1997 démontrèrent par une élégante approche que la baisse du niveau d'AMPc est impliquée dans le mécanisme d'adaptation du signal olfactif. En activant les CNG donc la transduction olfactive par photolyse de l'AMPc en cage, introduit dans le neurone par pipette de patch, ils déterminèrent le rôle crucial du calcium dans l'adaptation du signal par réduction du taux d'AMPc intracellulaire et par inhibition des canaux CNG.

Le canal CNG est un tétramère composé de 4 sous-unités (**figure 6 B**). Celles-ci sont regroupées en deux classes: Alpha et Beta. La composition du tétramère se décide selon sa localisation. Dans les neurones olfactifs, il est composé de deux sous-unités Alpha2 (CNGA2), d'une sous-unité Alpha4 (CNGA4) et d'une sous-unité Beta 1b (CNGB1b) (Pifferi, Pascarella et al. 2006).

Dans ce projet, je me focaliserai sur l'étude de l'expression de la sous-unité CNGA2, compte tenu de sa spécificité pour les neurones olfactifs, de sa stœchiométrie (2 CNGA2/tétramère) et de son rôle crucial pour la réponse olfactive. En effet, une récente étude a montré que les souris déficientes en CNGA4 présentent une altération de la réponse et de l'adaptation olfactive, tandis que les déficientes en CNGA2 ne répondent plus à l'odeur (Biel and Michalakis 2009) .

La voie de l'Inositol tri-phosphate (IP3)

Alors que la majeure voie de transduction du signal olfactif dans l'EO a pour second messager l'AMPc, une seconde voie ayant pour second messager l'inositol triphosphate (IP3) a été découverte. Le mécanisme moléculaire est le suivant : après fixation de l'odorant sur le récepteur, une protéine G s'active et permet la production d'IP3. Tandis que la protéine G impliquée dans la voie de l'AMPc est de nature Golf, celle impliquée dans la voie de l'IP3 est une protéine Gq (Boekhoff, Tareilus et al. 1990). La protéine Gq active une phospholipase C

qui clive le PIP2 en IP3 (Barry 2003; Ko and Park 2006). La production d'IP3 entraîne l'ouverture des canaux calciques. L'augmentation de calcium intracellulaire (par la libération des stocks de calcium du réticulum endoplasmique) génère une dépolarisation, puis la création au niveau des corps cellulaires des neurones récepteurs olfactifs de potentiels d'action qui se propagent le long des axones jusqu'au bulbe olfactif (Ache and Young 2005) (**figure 7**).

Il a été montré que le choix d'une voie de transduction plutôt qu'une autre dépend de la nature de la molécule odorante (Benbernou, Robin et al. 2011). A titre d'exemple, un composé à odeur citronné comme le citralva (3,7-diméthyl-2-6-octadiene-nitrile) stimule la voie AMPc, tandisque la pyrazine stimule la voie IP3 (Boekhoff, Tareilus et al. 1990; Cunningham, Ryugo et al. 1993).

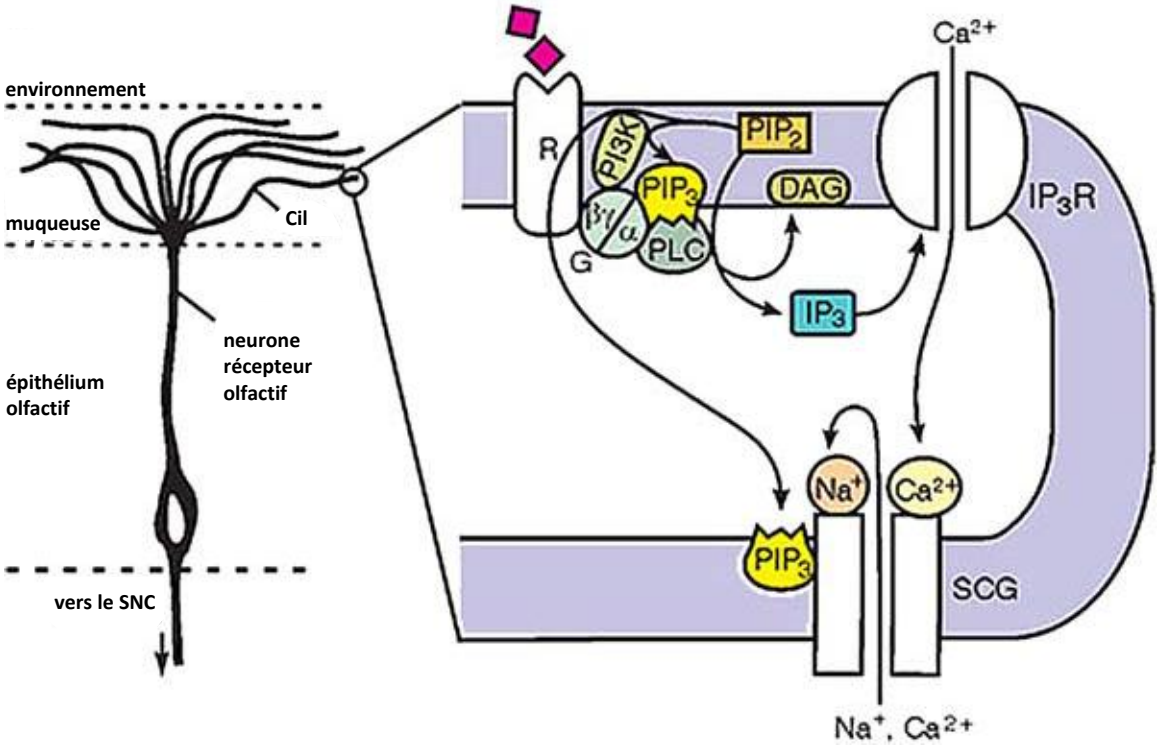


Figure 7. Schéma de signalisation de l'inositol triphoshate (IP3).

Les molécules odorantes se lient à une protéine récepteur (R) couplée à une protéine Gq qui active la phospholipase-C (PLC). La PLC va cliver le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) pour générer le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 entraîne l'entrée de calcium extracellulaire et la libération des stocks de calcium du réticulum endoplasmique par ouverture des canaux calciques. SNC : système nerveux central. D'après (Ache and Young 2005).

Les glandes de Bowman

L'épithélium olfactif repose sur une membrane basale qui la sépare de la lamina propria (ou chorion). Le chorion contient des glandes séreuses (glandes de Bowman) qui produisent une sécrétion (mucus) acheminée vers la surface par des canaux. Cette sécrétion contient des protéines telles que le lysozyme, l'amylase les IgA et des protéines de liaison à l'odorant, OBP (Mellert, Getchell et al. 1992). La composition exacte des sécrétions est toujours sujette à controverse.

L'organe accessoire de l'EO (l'organe voméronasal)

Découvert par Ludvig Jacobson, l'OVN est une structure dite accessoire du système olfactif mais qui joue un rôle fondamental dans les interactions sociales (recherche de partenaire sexuel, comportement de défense etc...). Plusieurs Vertébrés, incluant la majorité des mammifères, possèdent un OVN, appelé aussi «organe de Jacobson ». Chez les rongeurs l'OVN est une petite structure tubulaire localisée à la base du septum (**figure 8B**) possédant de nombreuses fonctions. Chez les Rongeurs, il a été montré qu'ils sont capables de détecter les phéromones (contenues dans la sueur, l'urine et les larmes) jouant un rôle dans le comportement social. Une phéromone est une substance (ou un mélange de substance) émise par un individu qui déclenche une réponse physiologique (Novotny, Schwende et al. 1984) ou comportementale chez un autre individu appartenant à la même espèce. Chez les souris, les phéromones qui sont sécrétées dans les urines de mâles provoquent des perturbations hormonales chez les souris femelles qui les réceptionnent.

L'OVN contient les mêmes types cellulaires que l'EO, à savoir : des neurorécepteurs voméronasaux (NVN), des cellules de soutien, des cellules microvillaires et des cellules basales.

Trois classes de récepteurs de type RCPG sont exprimées dans les neurorécepteurs spatialement distincts : V1R et V2R et FPR (**figure 8**).

Les NVN exprimant les V1R (plus de 187 gènes fonctionnels chez la souris) se trouvent dans la couche apicale de l'épithélium de l'OVN. Les NVN (V1R+) expriment la protéine G alpha i2 et projettent leurs axones vers le BOA antérieur (**figure 8**).

Les NVN exprimant les V2R sont localisés dans la couche basale de l'épithélium de l'OVN. Il existe deux familles de gènes codant pour les récepteurs V2R : la famille ABD composée de 115 gènes et la famille C composée de 7 gènes. Les NVN (V2R+) coexpriment la protéine G αo et projettent leurs axones vers le BOA postérieur. Une autre famille de gène est coexprimée dans les NVN de la couche basale de l'OVN, les H2-Mv. Il a été suggéré que les H2-Mv pourraient participer à l'accompagnement des V2Rs à la surface (Chamero, Leinders-Zufall et al. 2012).

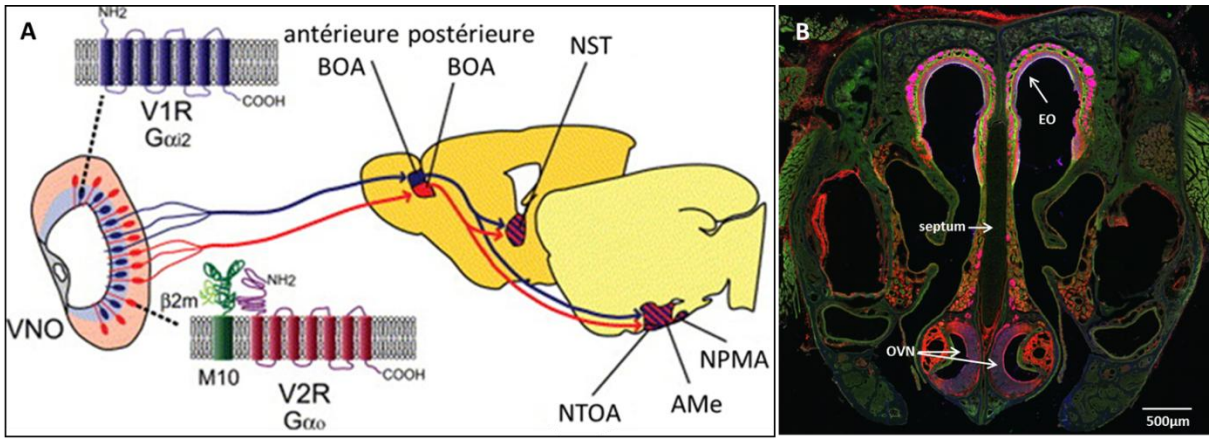


Figure 8. Représentation des principales voies d'entrées d'informations aux centres olfactifs en provenance de l'organe voméronasal.

A- V1R/V2R : récepteurs voméronasaux de type 1 et 2 ; Gαi2/Gα0 : protéines G couplées aux récepteurs voméronasaux ; β2m : Beta 2-microglobuline ; BOA : bulbe olfactif accessoire ; NST : noyaux de la strie terminale ; NPMA : noyaux postéro-médian de l'amygdale ; AMe : amygdale médiane ; NTOA : Noyaux du tractus olfactif accessoire. (D'après (Brennan and Keverne 2004)). **B-** Coupe coronale (14µm) de la cavité nasale d'une souris marquée à l'OMP (marqueur spécifique des NRO matures : couleur bleue) et au GAP43 (marqueur spécifique des NRO immatures couleur rouge). Cette micrographie montre la localisation et la structure tubulaire de l'OVN.

Parmi les NVN exprimant les FPR (les « formyl peptide receptor-like proteins »), 4 sont localisés dans la couche apicale de l'épithélium de l'OVN et le dernier dans la couche basale (Riviere, Challet et al. 2009). Cette population de neurone ne colocalise ni avec les V1R ni les V2R. Quatre des 5 FPR sont coexprimés avec G αi2 et un seul avec α0 (Chamero, Leinders-Zufall et al. 2012).

L’organe séptal et le ganglion de Grueneberg

Bien que le rôle de l’organe septal et du ganglion de Grueneberg ne soit pas totalement élucidé, de nombreuses études montrent que ce sont des sous-systèmes olfactifs impliqués dans l’olfaction.

L’organe séptal

L’organe septal de Masera décrit en détail par Rodolfo-Masera en 1943 est un ilot de l’épithélium olfactif situé à la base ventrale de la cloison nasale chez les mammifères. L’OS a une ressemblance avec l’EO dans sa composition cellulaire, d’ailleurs il est composé de NRO ciliés (plus de 20000 neurorécepteurs fonctionnels exprimant 120 RO différents (Kaluza, Gussing et al. 2004), des cellules microvillaires, de cellules de soutien, et de glandes de Bowman (Menini 2010). Parmi ces 20000 NRO, 50% expriment un seul type de RO, le RO256-3 (SR1) et plus de 93% expriment 8 autres RO différents (Tian and Ma 2004; Zhang, Rogers et al. 2004). Non seulement l’OS présente des similarités de structure avec l’EO, mais également des similarités moléculaires. En effet, il a été montré au moyen d’études électrophysiologiques (patch-clamp perforé) que la majorité des neurorécepteurs présents dans cet organe expriment des élements de la cascade de transduction de l’AMPc (Grosmaitre, Santarelli et al. 2007).

Faute de techniques expérimentales appropriées à l’époque, la compréhension du rôle de cet organe à part entière reposait bien davantage sur des conjectures que sur des faits bien établis. Durant des décennies, suite à sa description et à sa position anatomique particulière, cet organe a été suggéré comme étant impliqué dans la détection d’odeurs et de phéromones d’alarmes. Il a fallu attendre les travaux d’électrophysiologie (EOG) de Marshall et Maruniak (Marshall and Maruniak 1986) pour apprendre que l’organe septal est sensible aux odeurs. De plus, il est intéressant de noter que cet organe répond à de très faibles concentrations d’odeurs, ce qui renforce l’idée d’un détecteur de signaux d’alarmes. Plus tard, il a été montré par des études d’électrophysiologie plus poussées (patch-clamp perforé-enregistrement unitaire) que les NRO de cet organe, notamment ceux exprimant le récepteur olfactif SR1, ont la particularité de répondre à un large panel d’odorants (Grosmaitre, Santarelli et al. 2007).

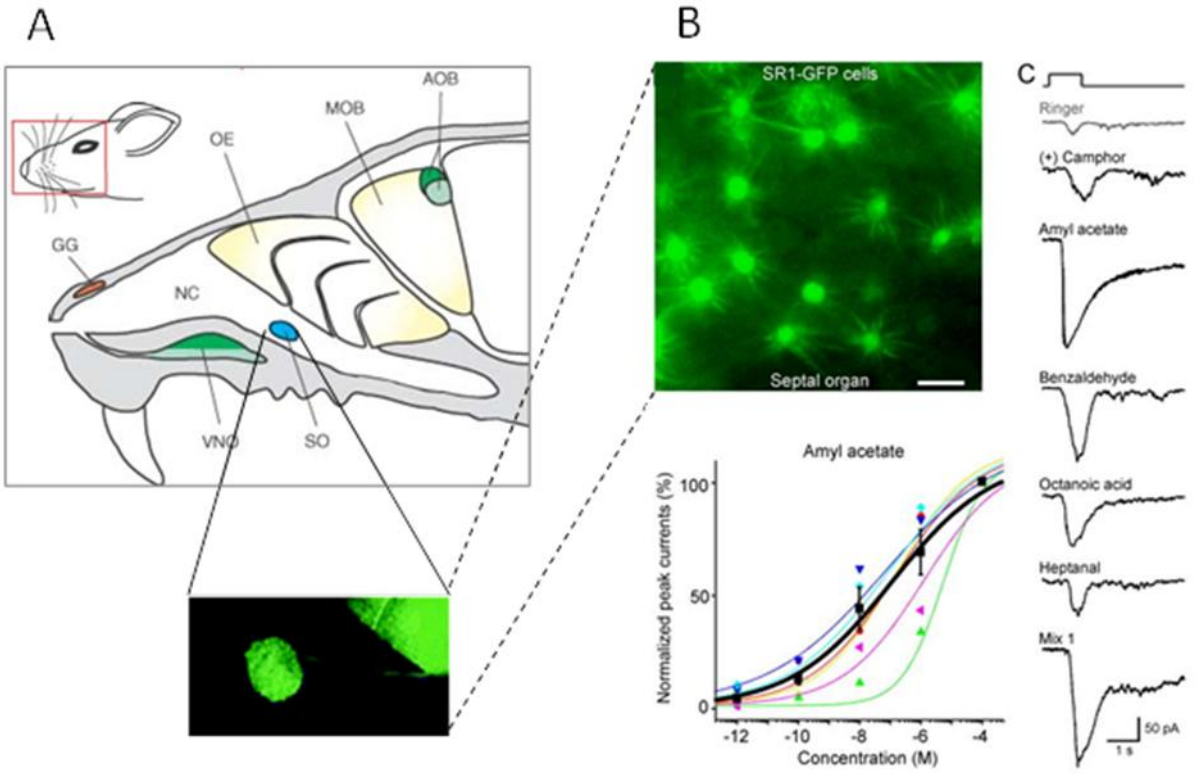


Figure 9. Position anatomique de l'organe septal et enregistrement de courants (patch-clamp perforé) sur des neurones SR1.

A- Coupe sagittale de la cavité nasale d'un rongeur indiquant la position anatomique de l'organe septal (adapté de (Brennan and Zufall 2006)). Dans la micrographie située en dessous on peut visualiser l'organe septal grâce au marquage spécifique des neurones olfactifs de cet organe (Levai and Strotmann 2003). B- Enregistrement de courant de transduction sur des neurones SR1 suite à l'application de différents odorants. Les enregistrements sont effectués en approchant une électrode d'enregistrement sur les boutons denditiques que l'on peut apercevoir sur la micrographie de l'EO observé sous microscope fluorescent. Les enregistrements de réponse indiquent que les neurones SR1 répondent à différents odorants. Les courbes dose-réponses représentées sous la micrographie indiquent que les neurones SR1 commencent à répondre à de très faibles concentrations d'amyl acétate (10^{-10}M) et saturent à 10^{-6}M) (Grosmaitre, Fuss et al. 2009).

Le ganglion de Grueneberg

Le ganglion de Grueneberg découvert en 1973 par Hans Grüneberg est localisé au bout de la cavité nasale, à proximité de l'ouverture des narines.

Il a longtemps été considéré comme une structure « non-olfactive ». Il a fallu attendre les progrès de la transgénèse pour découvrir que des souris OMP-GFP ont un ganglion de Grueneberg fluorescent. En effet, le fait que l'OMP « olfactory marker protein » soit un

marqueur spécifique des neurones olfactifs matures, sous-entendait que les GG possèdent des neurorécepteurs.

En revanche, même si les cellules du GG semblent, à l'image des NRO, projeter des axones vers le BO, leur structure est différente. En effet les NRO de l'EO possèdent des dendrites. Ces neurones sont dépourvus de prolongement dendritique. De longs cils sont profondément invaginés dans leurs cytoplasmes. Alors que les NRO de l'EO sont en contact direct avec la lumière nasale, les cellules sensorielles du GG en sont isolées. En effet, d'une part les cellules sont regroupées en grappe de raisin et enveloppées par des cellules gliales et d'autre part, elles sont recouvertes par une couche épithéliale kératinisée (**figure 10**). Des récepteurs, de type V2R (V2R83), TAAR (trace-amine associated receptor) et mOR (mOR256-17), ainsi que certains éléments de la cascade de transduction ont été identifiés par RT-PCR dans les neurones des GG (Brechbuhl, Klaey et al. 2008; Salesse 2012). Ceci laisse penser que le GG est un sous-système olfactif chimiosensoriel. Le rôle du GG n'étant toujours pas totalement élucidé, certaines données tendent à montrer qu'il est impliqué dans la détection du froid (Mamasuew, Breer et al. 2008), de phéromones d'alarmes (Brechbuhl, Klaey et al. 2008) et de molécules chimiques contenant un noyau pyrazine (Mamasuew, Hofmann et al. 2011).

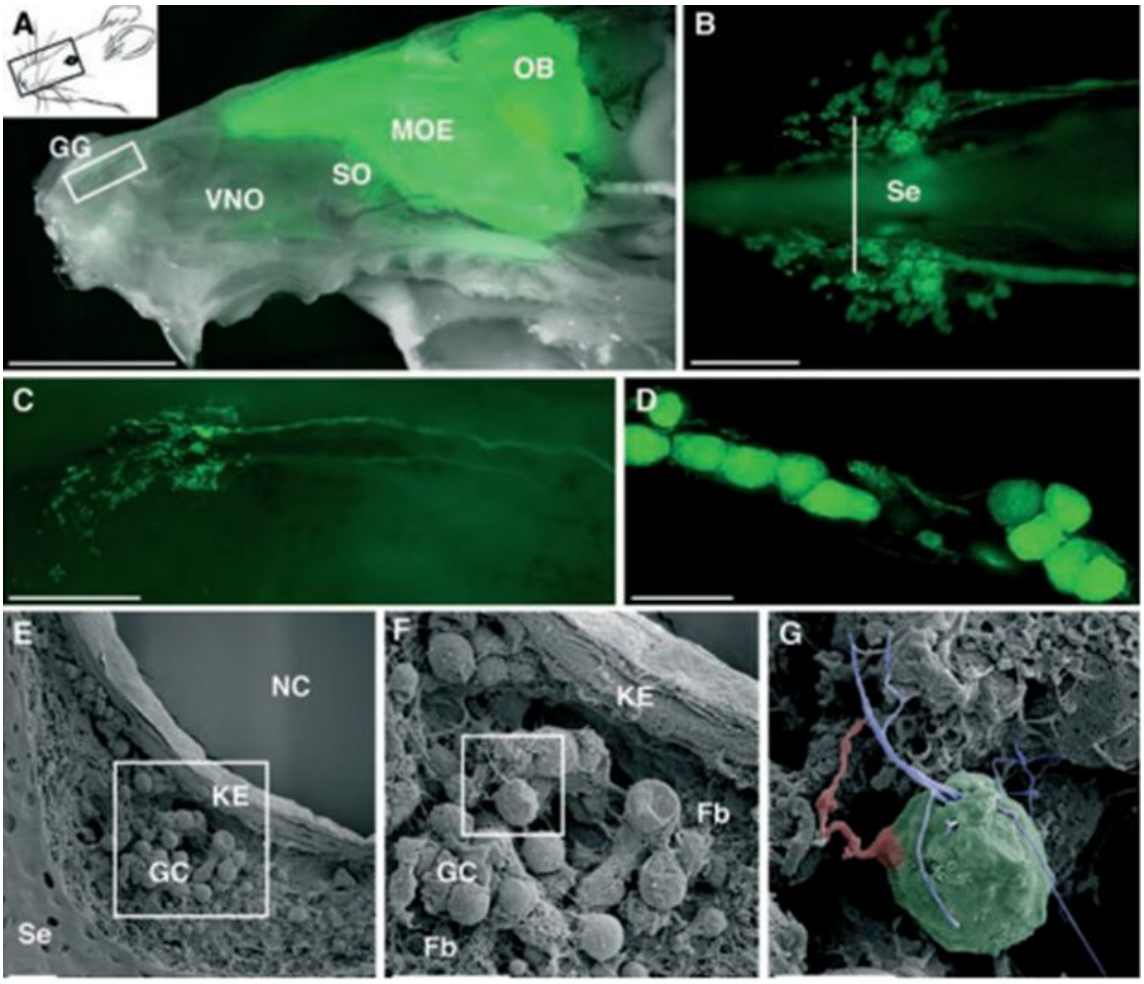


Figure 10. Cellules du ganglion de Grueneberg regroupées en grappe de raisin et recouvertes par un épithélium kératinisé.

A- Coupe sagittale de la cavité nasale d'une souris OMP-GFP dont les neurones matures sont visualisables grâce à leur marquage spécifique. Les neurones de l'épithélium olfactif principal (MEO), organe du septum (SO), VNO, et GG (rectangle blanc) projettent vers le bulbe olfactif (OB). **B**- Vue dorsale du GG. Le GG se présente comme une structure paire en forme de flèche réparti de part et d'autre de la cloison nasale (Se). **C**- Grossissement du GG [rectangle dans (A)]. **D**- Une grappe de cellules GG observée au grossissement maximal en microscopie confocale. **E**- Micrographie d'une coupe coronale de GG observée par microscopie électronique à balayage [ligne blanche en (B). Dans cette micrographie est indiquée une grappe de cellules (dans le carré blanc) localisée le long du septum (Se) sous une paroi kératinisée (KE) de la cavité nasale (NC). **F**- Grossissement d'une région du GG (carré blanc de E) montrant que les cellules du GG sont entourées par un réseau de fibroblaste (Fb). **G**- Grossissement d'une cellule du GG (fausse couleur verte) (carré blanc de F) montrant des prolongements ciliaires (fausse couleur bleue) et axonales (fausse couleur rouge) de la cellule de GG. Barres d'échelle : 1 mm en (A); 0,1 mm en (B); 0,25 mm en (C); 25 µm en (D) ; 20 µm en (E) et (F), et 5 µm en (G) (Brechbuhl, Klaey et al. 2008).

Le centre olfactif primaire

Dans cette partie il sera décrit l'organisation anatomique et fonctionnelle du centre olfactif primaire ainsi que les voies olfactives centrales.

Le bulbe olfactif principal

Alors que certaines études montrent que les neurones (exprimant le même RO) sont répartis de façon aléatoire dans une des quatre zones de l'épithélium olfactif, d'autres affirment le contraire. Chez la plupart des mammifères, un NRO qui exprime un même récepteur converge vers un module de traitement du signal (appelé glomérule) localisé au sein du bulbe olfactif (**figure 11**). Les bulbes olfactifs sont de forme allongée et ovale et sont couchés sur la lame criblée de l'os ethmoïde. Un bulbe olfactif est une structure organisée en couches: couche du nerf olfactif, couche glomérulaire, couche pléxiforme externe, couche des cellules mitrales, couche plexiforme interne et couche granulaire (Mori, Nagao et al. 1999).

Plusieurs milliers de NRO (plus de 2500 chez la souris) convergent vers un même glomérule. Ceci s'explique par le ratio du nombre de NRO en million (environ 3 millions) sur le nombre de glomérule en millier (3000 environ chez la souris). Cette convergence est compatible avec l'idée d'une amplification du signal olfactif (Ennis, Zimmer et al. 1996). Les projections axonales olfactives sur le bulbe olfactif sont régies par deux principes de bases : « la projection zone à zone » et « la convergence glomérulaire ». En effet l'information odorante reçue par un NRO d'une zone donnée de l'EO sera transmise à un glomérule, puis transférée aux neurones bulbaires dans la zone correspondante du bulbe olfactif. Dans les glomérules, les axones terminaux des neurorécepteurs font synapses avec les dendrites de certains neurones du bulbe, à savoir : les cellules mitrales (CM) et les cellules à panache. Ces deux types cellulaires constituent les cellules relais du bulbe olfactif.

Le bulbe olfactif est également caractérisé par un circuit d'interneurones inhibiteurs GABAergiques. Il y a deux types d'interneurones répartis sur deux couches différentes. Les périglomérulaires localisés dans la couche glomérulaire et les granulaires localisés dans la couche plexiforme interne (**figure 12**). Ces interneurones, créant des inhibitions et des boucles de rétroaction, synchronisent l'activité des cellules relais du bulbe olfactif. Les interneurones sont remplacés continuellement grâce aux neuroblastes produits dans la zone sous-ventriculaire (ZSV). En effet, la ZSV produit en permanence des cellules souches qui se

différencient en neuroblastes. Ces derniers migrent vers le BO en empruntant un couloir de migration rostral « CMR » (Rousselot, Lois et al. 1995).

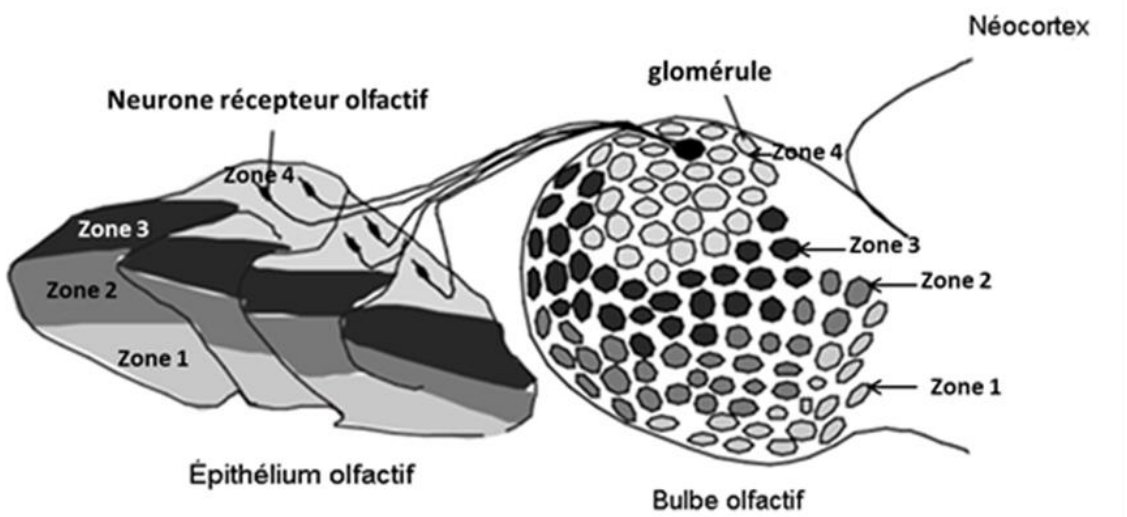


Figure 11. Diagramme schématique illustrant le profil de connectivité entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif.

L'EO des souris est divisé en 4 zones (zones 1 à 4). Les NRO exprimant un RO donné sont distribués sur une même zone et projettent leurs axones vers le BO dans un nombre restreint de glomérules. Chaque glomérule est localisé dans la zone correspondante au RO (image tirée du site créé par Zhuang et Matsunami :http://www.cyberounds.com/cmecontent/art444.html?pf=yes).

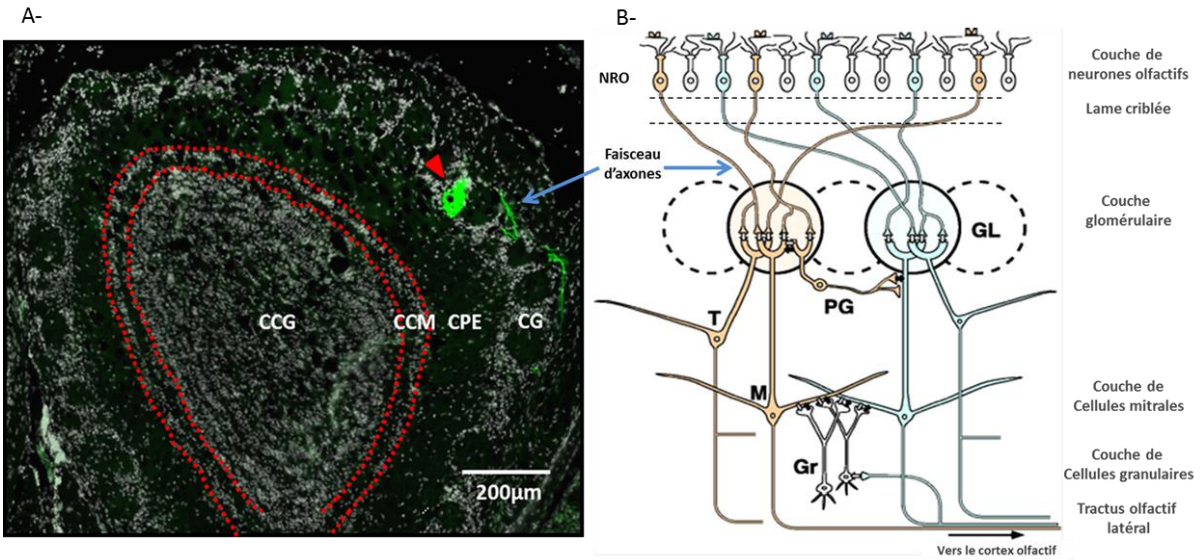


Figure 12. Schéma résumant l'organisation synaptique du BOP de mammifères.

A- Coupe coronale d'un bulbe olfactif d'une souris MOR23IREStauGFP. Cette image montre les différentes couches cellulaires du BO. Le glomérule où se projette le faisceau d'axones des NRO MOR23 est indiqué par une flèche rouge. **B-** Schéma présentant l'organisation des interconnexions des neurones du bulbe olfactif. Deux modules glomérulaires (marron et bleu) représentent deux populations différentes de neurones récepteurs olfactifs qui font synapses avec des cellules mitrales **(M)**, des cellules à panache **(T)**, et des cellules périglomérulaires **(PG).** Les **PG** et les cellules granulaires **(Gr)** sont des interneurones locaux. **NRO**, neurone récepteur olfactif; **GL**, glomérule. Les petites flèches blanches désignent des synapses excitatrices, et les petites flèches noires indiquent les synapses inhibitrices (D'après (Mori, Nagao et al. 1999)). **CCG** : couche de cellules granulaires ; **CCM** : couche de cellules mitrales ; **CPE** : couche plexiforme externe ; CG : couche glomérulaire.

Les voies olfactives

Les neurones relais des bulbes olfactifs se projettent, soit directement sur le noyau olfactif antérieur, soit dans le cortex olfactif primaire via, un faisceau d'axones appelé tractus olfactif latéral. Le cortex olfactif primaire rassemble plusieurs régions corticales différentes : le noyau olfactif antérieur, *la tenia tecta*, le tubercule olfactif, le cortex piriforme, le noyau cortical antérieur de l'amygdale, le cortex périamygdalien et le cortex enthorhinal. Chacune de ces aires corticales achemine l'information à différentes structures sous-corticales : le cortex entorhinal à l'hippocampe, le cortex périamygdalien à l'hypothalamus, le tubercule olfactif et le cortex piriforme (la région qui reçoit le plus d'entrées bulbaire) au thalamus et au cortex orbito-frontal (Haberly 2001).

Deux voies de transmission nerveuse du signal olfactif naissent au travers du cortex olfactif primaire. D'une part, nous avons une voie nerveuse qui se projette dans le néocortex à travers le thalamus. Cette voie est impliquée dans le processus de discrimination olfactive (Tanabe, Iino et al. 1975). D'autre part, une deuxième voie se projette dans le système limbique. Celle-ci implique le cortex entorhinal et l'hippocampe qui interviennent dans le processus de mémorisation et également l'hypothalamus via l'amygdale (Zald and Pardo 2000) (**figure 13**).

.

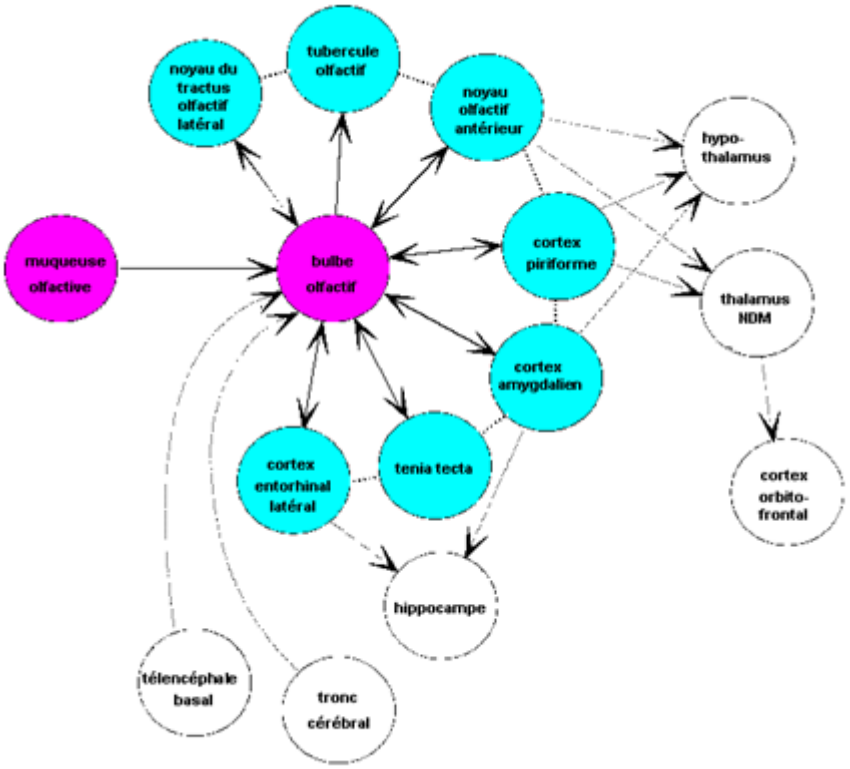


Figure 13. Projections bulbaires aux centres supérieurs.

Le message olfactif est initié par les neurones olfactifs localisés dans la muqueuse olfactive, modulé au niveau du bulbe olfactif par les cellules mitrales, puis transmis depuis le bulbe olfactif vers différentes régions corticales par des voies centrifuges. (Sicard et al 1997).

Dans le paragraphe suivant nous allons décrire l'organisation cellulaire du centre intégrateur de l'information olfactive en provenance de l'organe voméronasal : le bulbe olfactif accessoire

Le bulbe olfactif accessoire

Le bulbe olfactif accessoire, BOA, reçoit les influx nerveux issus de l'organe voméronasal et les transmet vers le système limbique incluant les structures suivantes : l'amygdale, le noyau de la strie terminale et l'accessoire du tract olfactif. Ces structures sont à leurs tours connectées avec des structures hypothalamiques (Ma 2007). Chez les rongeurs, le BOA traite principalement les signaux phéromonaux. Des études récentes indiquent qu'il est également activé par les peptides antigéniques du complexe majeur d'histocompatibilité (Leinders-Zufall, Brennan et al. 2004).

Conclusion

Les souris possèdent deux sites d'entrées principaux de l'information olfactive (l'EO et l'OVN) et deux sous-systèmes (l'OS et le GG) dont le rôle n'est toujours pas complétement éclairci. Les neurones olfactifs sont les sites de transduction du signal. Ils permettent de détecter les odorants et de convertir cette information chimique en un signal électrique qui est ensuite transmis à un premier centre relai de l'information: le bulbe olfactif (principal et accessoire). Les bulbes olfactifs, à travers leurs neurones, mettent en forme le message olfactif grâce à une convergence fonctionnelle vers le cortex olfactif primaire puis, à diverses structures cérébrales telles que l'hypothalamus ou le néocortex permettant ainsi la perception des odeurs.

Partie 2 : Les récepteurs olfactifs

Les RO « standards » sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme, on les trouve exprimés dans les tissus non olfactifs comme le foie, le cœur, les poumons et principalement dans les testicules (Mombaerts 1999; Feldmesser, Olender et al. 2006). Cependant la grande majorité des gènes est exprimée dans l'épithélium olfactif (Araneda, Peterlin et al. 2004). Bien que plusieurs types de récepteurs (VR, TAARs, FPR et GC-D) aient été décelés depuis la découverte des récepteurs olfactif, (Buck and Axel 1991) je me concentrerai dans cette partie uniquement sur les récepteurs « standards ».

A la découverte des récepteurs olfactifs

Les récepteurs responsables de la discrimination d'un large spectre d'odorants, les récepteurs olfactifs, ont été découverts en 1991 par Linda Buck et Richard Axel (Buck and Axel 1991). Leur stratégie d'étude était basée sur trois considérations de l'époque. Il faut toutefois noter que cette découverte n'aurait pas eu lieu sans l'apparition de nouvelles techniques de biologie moléculaire, notamment celle de la PCR (*polymerase chain reaction*).

Leur première hypothèse de travail était fondée sur des données de biochimie et de biologie moléculaire qui montraient de toute évidence que le signal de transduction olfactive passait par l'intermédiaire d'un récepteur de type RCPG. En effet, il a été montré qu'une stimulation olfactive entraînait une élévation de l'AMP cyclique (Malnic, Gonzalez-Kristeller et al. 2010). D'autre part, des travaux de RT-PCR ont mis en évidence l'expression d'éléments de la cascade de transduction de la voie de l'AMPc. En effet, Jones et Reed (Jones and Reed 1989) ainsi que Bakalayar et Reed (Bakalyar and Reed 1991) ont pu identifier, entre autres, l'expression de la protéine Golf et de l'adénylate cyclase de type III (ACIII) dans l'EO. Ces expériences suggéraient clairement l'implication de récepteurs de type récepteur couplé aux protéines G dans la détection de l'odeur. Leur deuxième hypothèse reposait sur la myriade de molécules présentes dans l'environnement et la puissance discriminative du système olfactif. Ils ont donc supposé qu'un large répertoire de RO serait nécessaire à la détection et à la discrimination de la grande variété des molécules odorantes. Et finalement, du fait de leur fonction, l'expression des RO serait restreinte aux neurones olfactifs de l'épithélium olfactif.

De plus, peu de temps avant la fameuse publication des gènes olfactifs, les premiers RCPG (la rhodopsine et les récepteurs β-adrénergiques) venaient d'être identifiés. Il a fallu attendre une étude de comparaison de leurs séquences en acides aminés pour révéler la présence de motifs conservés (les 7 domaines transmembranaires) et construire, à partir de ces motifs, des amorces dégénérées reconnaissant les RCPG (Dixon, Kobilka et al. 1986).

Ainsi, c'est en réalisant des RT-PCR, avec ces amorces dégénérées, sur des extraits d'ARN d'épithélium olfactif de rat que (Buck and Axel 1991) ont pu amplifier une population hétérogène d'ADNc à partir de laquelle ils ont identifié, cloné et caractérisé 18 gènes codant les RO. Dans cette même étude, grâce à des expériences de northern Blot, Buck et Axel ont estimé qu'il pourrait exister 500 à 1000 gènes de cette même famille, chez le rat,

indispensables à la détection et à la discrimination de la myriade des molécules odorantes (Buck 1992).

Structure et sites d'interactions des récepteurs olfactifs avec les molécules odorantes.

Chez les Mammifères, les gènes codant les RO sont dans leur grande majorité constitués de deux exons, dont seul le deuxième est codant pour une protéine. Le second exon a une taille d'environ 1000 pb (Buck and Axel 1991). Les RO sont de petites protéines membranaires (environ 300 acides aminés) dépourvues de peptide signal, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Il s'agit d'une large famille de récepteurs membranaires capables de détecter et d'effectuer la transduction de signaux extracellulaires aussi variés que des photons, des odorants, des phéromones, des oses ou des macromolécules. Les RCPG ont été regroupés en trois classes sur des critères d'homologie de séquence : les membres d'une même classe possèdent au moins 25% d'identité. La première classe, la plus abondante, a été dissociée en trois familles (a, b et c). Les RCPG de la famille a, qui comprend la rhodopsine et les récepteurs olfactifs, sont caractérisés par un domaine extracellulaire très court (20 à 30 acides aminés) (Bockaert and Pin 1999). L'ectodomaine des RO est de 20 acides aminés. A l'heure actuelle, la structure des RO n'est toujours pas cristallisée. Toutefois, par alignement de séquence des RO contre celle de la rhodopsine (structure cristallisée en 2000), les auteurs (Pilpel and Lancet 1999) sont parvenus à modéliser les RO en situant les sept TM, les boucles intra et extra, ainsi que les domaines N et C-terminaux.

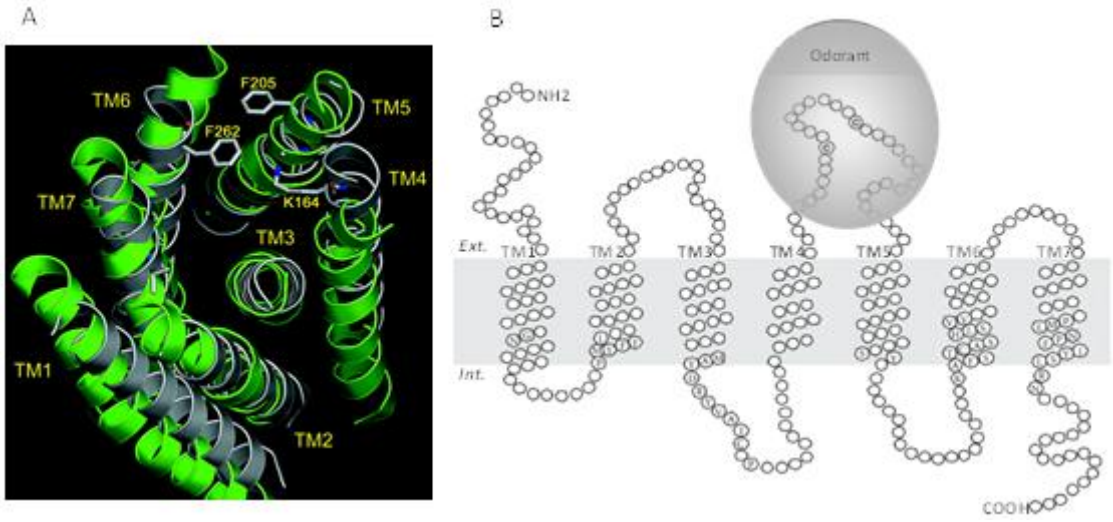


Figure 14. Structure typique d'un récepteur olfactif et structure en haute résolution (rayon-X).

A- Superposition des domaines transmembranaires de la rhodopsine (en vert) et d'un RO 17 (en blanc). **B-** Le schéma illustre un récepteur olfactif dans la membrane plasmatique (en gris), avec ses sept domaines transmembranaires putatifs. Les acides aminés des domaines (TM1, TM2, TM3, TM6 et TM7) qui sont hautement conservés au sein de la majorité des RO sont affichés. Les domaines TM3 (partie centrale), TM4 et TM5 (en rouge) sont extrêmement variables.

Plus tard, une comparaison bio-informatique des séquences d'acides aminés des RO de rats a révélé que, bien que leurs séquences soient extrêmement divergentes, ils partagent des motifs de séquence très conservés qui sont caractéristiques de la famille. Ces motifs conservés d'acides aminés les distinguent des autres RCPG ((Bathellier, Gschwend et al. 2010); (Fuchs, Glusman et al. 2001)). Les motifs conservés sont au nombre de cinq et sont répartis sur 5 TM différents : **GN** dans le domaine transmembranaire 1, **PMYF / LFL**, au domaine transmembranaire 2, **MAYDRYVAIC**, dans le domaine transmembranaire 3, **KAFSTCA / GSHLSVV**, dans domaine transmembranaire 6, et **PMLNPFIYSLRN**, dans domaine transmembranaire 7 (Buck et Axel 1991) (**figure 14**).

En contrepartie, les domaines TM4, TM5, la région centrale de TM3 et les segments C et N terminaux, sont extrêmement variables (Araneda, Peterlin et al. 2004). Cette grande variabilité explique la capacité du système olfactif à détecter une grande diversité de molécules odorantes, tant par leur taille, leur caractère aliphatique ou cyclique que par leur hydrophobicité ou leur groupement fonctionnel. En effet, il a été montré par des expériences de mutagénèse que ces régions variables sont impliquées dans la liaison avec la molécule odorante et constituent donc le site potentiel d'interaction avec les odorants (Pilpel and Lancet 1999; Araneda, Peterlin et al. 2004; Man, Gilad et al. 2004).

Classification des récepteurs olfactifs

Chez la souris les 1296 gènes codant les RO sont groupés en deux classes, en fonction de leur similarité de séquences d'acides aminés et de leur classement phylogénétique : les RO de classe I et les RO de classe II. Les RO de classe I sont également appelés « RO fishlike », car ils ont d'abord été identifiés chez le poisson. Les récepteurs de classe II sont appelés « RO mammalian like », car ils ont d'abord été identifiés chez les mammifères. Alors que les RO de la classe II reconnaissent les odorants volatiles majoritairement hydrophobes, les RO de classe I sont plus sensibles aux odorants hydrophiles. On a longtemps cru que les mammifères sont dépourvus de RO de classe I et que leur présence ne reflète qu'un aspect évolutif du système olfactif. Toutefois, une analyse de séquences du génome de la souris a montré que les RO de classe I représentent plus de 12% de la population des RO (147 gènes dont 120 potentiellement fonctionnels). Ceci indique que les récepteurs de classe I jouent également un rôle important dans le système olfactif des mammifères.

A l'intérieur de ces classes, les RO peuvent être regroupés en familles et en sous-familles en fonction de leurs analogies de séquences. La classification se fait en fonction d'un critère bien défini : les RO ayant plus de 40% d'identité en acides aminés font partie d'une même famille ceux ayant plus de 60% d'identité font partie d'une même sous-famille. Ainsi chez la souris il existe plus de 228 familles de gènes de RO dont 41 (1-42) appartenant à la classe I et 187 (101-286) appartenant à la classe II. Chaque famille peut contenir entre 1 et 50 gènes de RO. Il a été montré que les gènes d'une même sous-famille tendent à être regroupés dans un même groupe de gènes (Fuchs, Glusman et al. 2001; Quignon, Giraud et al. 2005).

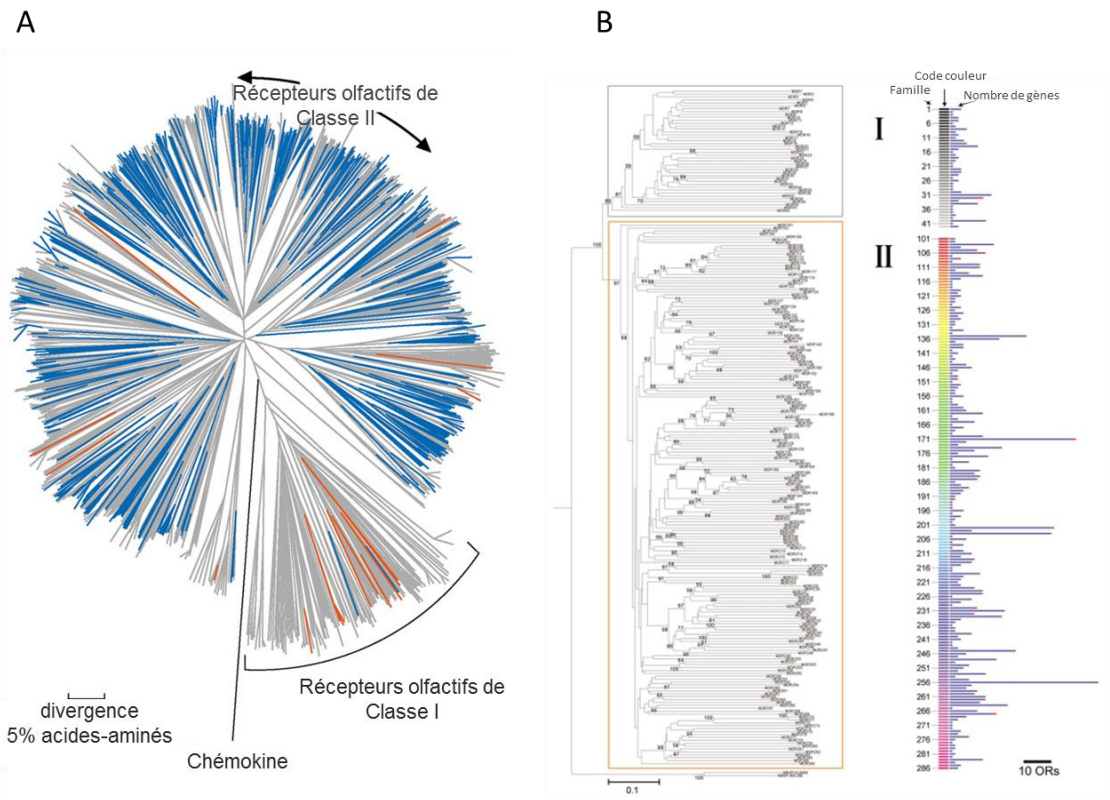


Figure 15. Arbre phylogénétique classant 1107 récepteurs olfactifs de souris.

Les gènes dont l'expression a été confirmée par criblage d'ADNc (puce) d'épithélium olfactif sont colorés en bleus. Les gènes dont l'expression a été confirmée par technique de PCR (amorces dégénérées) sont colorés en rouge. Les autres RO sont coloriés en gris, et la chémokine (hors groupe) en noir. Les RO de classe I sont regroupés entre les crochets, et le reste appartient à la classe II (Young, Shykind et al. 2003).

L'activation des récepteurs olfactifs

La fixation d'une molécule odorante sur le récepteur olfactif active des protéines-G. Il s'agit d'une protéine hétérotrimérique car elle est constituée de 3 sous-unités : α, β et ɣ. La sous-unité α fixe et hydrolyse (domaine GTPase) le GTP, conduisant ainsi à l'activation de voies spécifiques de signalisation en fonction du type de la sous-unité α. Il existe quatre classes de sous-unités α (groupées en fonction des homologies de séquence) : Gsα, Gi/o α, Gq/11 α et G12 α. La première classe Gsα (« s » pour stimulant l'adénylate cyclase) est constituée de 4 sous classes et de la protéine Golf spécifique de la majorité des neurones olfactifs. Alors que les Gsα activent l'adénylate cyclase, les sous-unités Gi α l'inhibent. Les Gq et G12 permettent l'activation des phospholipases C (PLC) impliqués dans la voie de l'inositol-3-phosphate (IP3). L'activation de l'adénylate cyclase par la protéine Golf augmente la production de

l'AMPc. Ce second messager active les canaux calciques « AMPC dépendants », ce qui provoque une augmentation intracellulaire en calcium et ainsi une dépolarisation de la cellule nerveuse (Jones and Reed 1989). Comme il a été mentionné plus haut (sous-partie : voies de signalisation), une sous-population de NRO exprime la sous-unité Gαq activant la voie de l'IP3.

Le mécanisme moléculaire mis en place lors de l'activation du RO par la fixation d'un ligand reste encore mal élucidé. Toutefois, quelques études de mutagénèse des régions variables et conservée du RO ont tenté d'apporter une première description du déroulement de l'activation des protéines G par le complexe ligand-récepteur. Selon Aya Kato (Kato, Katada et al. 2008), la fixation de l'odorant provoquerait un basculement du TM6 ce qui relâcherait les contraintes (imposées par des interactions ioniques) au niveau des extrémités cytoplasmiques des domaines transmembranaires. Ce changement de conformation permettrait ainsi de rapprocher la sous-unité Gα (par son domaine C-terminal) du récepteur et donc son activation.

Organisation et distribution des gènes des récepteurs olfactifs

Les gènes codants pour les récepteurs olfactifs sont répartis dans des groupes de gènes (Barth, Dugas et al. 1997). Chez la souris, les groupes sont au nombre de 27 au total, distribués sur plusieurs chromosomes, exceptés le 12 et le Y (Young, Shykind et al. 2003). Un groupe de gènes contient en moyenne 5 gènes (chaque gène étant distancé de l'autre de 1Mb) et peut contenir plus de 100 gènes RO comme le groupe Olfr7 incluant le gène de M71 (Xie, Feinstein et al. 2000).

Les récepteurs de la classe I qui représentent une partie considérable du répertoire des RO chez la souris (plus de 12%) se distinguent de la seconde classe par leur distribution génomique et anatomique.

En effet, les gènes des récepteurs de la classe I sont concentrés dans un seul groupe de gènes localisé dans le chromosome 7, alors que les gènes des récepteurs de la classe II sont dispersés sur un grand nombre de chromosomes (tout en gardant les sous-familles de gènes regroupés). Toutefois, il faut noter que la distribution des gènes de la classe II n'est pas uniforme, avec plus de la moitié localisée dans les chromosomes 7, 11 et 9.

Si les récepteurs olfactifs de la classe II sont répartis sur les 4 zones de l'EO, tel n'est pas le cas pour les récepteurs de la classe I. Ces derniers sont localisés sur la zone dorsale.

Le gène codant MOR23

Le gène MOR23 dont le nom officiel est olfr16 (appartenant à la 16ème famille des RO), est membre d'un groupe de gènes composé d'au moins 19 gènes RO (Asai, Kasai et al. 1996). Ce groupe est localisé dans la partie distale du chromosome 1. MOR23 est séparé de ses gènes voisins d'une distance de 650 Kb en amont et 90 Kb en aval (voir Celera database). Le gène MOR23 a longtemps été considéré comme étant constitué de deux exons (Asai, Kasai et al. 1996), mais dernièrement il a été admis qu'il possède 3 exons (Vassalli, Rothman et al. 2002) et deux introns (figure 9). Sa taille est d'environ 9 Kb. Seul le troisième exon (930 bp) est codant pour le récepteur olfactif (env. 300 acides aminés). Les deux autres exons ont une taille de 154pb et 349pb respectivement (**figure 16**).

La position de la séquence d'initiation de la transcription varie en fonction des tissus. Alors qu'elle se trouve en amont de l'exon 2 (exon non codant) dans l'épithélium olfactif, elle est localisée dans l'intron 2 en amont de l'exon 3 (codant) dans les testicules. Ainsi, après transcription et épissage de l'ARNm, les introns et les exons non codants sont éliminés dans les cellules testiculaires, en revanche seuls les introns le sont dans l'épithélium olfactif. Toutefois, au niveau de l'EO, seul le dernier exon du récepteur MOR23 sera traduit en protéine. Le récepteur MOR23 est sensible au Lyral (Touhara, Sengoku et al. 1999; Grosmaitre, Vassalli et al. 2006).

Le gène codant M71

Le gène M71 (Ressler, Sullivan et al. 1994) appartient au groupe de gène Olfr17 situé sur le chromosome 9. Ce groupe comprend plus de 100 gènes de RO (Xie, Zhang et al. 2000) . Le gène M71 est positionné entre les gènes M72 et K22 à une distance de 26 et 15 kb respectivement. M72 est l'homologue le plus proche de M71 avec 96% d'homologie de séquence. Le gène M71 dont la taille est de 9Kb est constitué de deux exons dont le premier est non codant (**figure 16**).

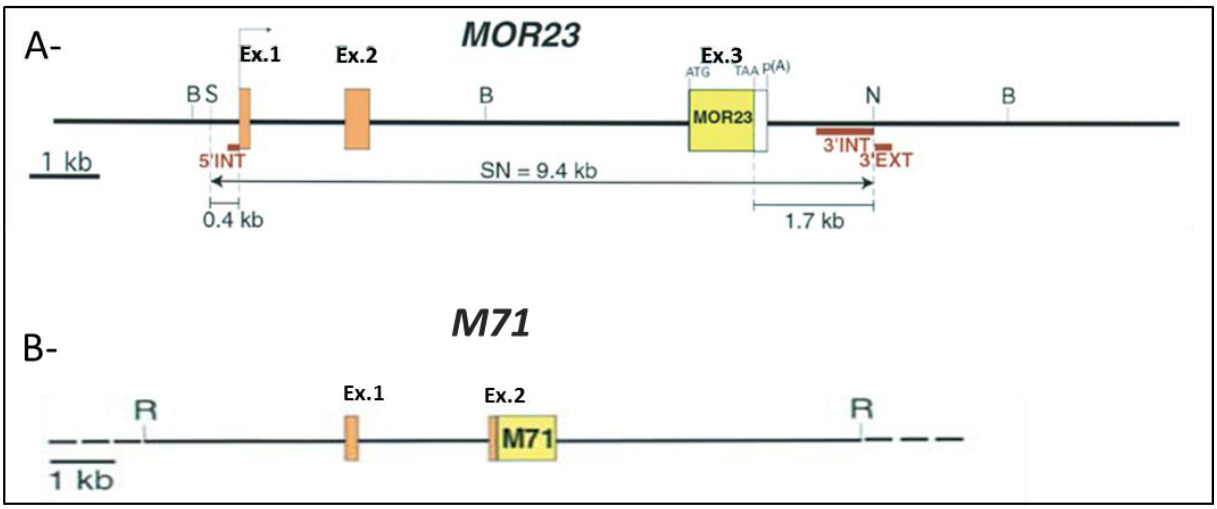


Figure 16. Structure des gènes MOR23 et M71 communément admises.

A- La localisation des trois exons (Ex.1, Ex.2 et Ex.3) et du site d'initiation de la transcription (indiqué par une flèche courbée) ont été identifiés par la technique de RACE. Les deux exons (en rectangle orange) de tailles respectives de 154bp et de 345pb sont situés dans la région non codante. Les deux introns ont une taille respective de 1,4 Kb et de 4,5 Kb. La région codante (rectangle jaune, taille de 930pb) est composé d'un seul exon (EX3). Cet exon contient à son extrémité 3', 16pb (carré blanc) de l'extrémité 5' de la région non codante 3'. La région non codante 3' se prolonge par un site de polyadénylation de 1,7Kb par rapport au codon stop. Le gène MOR23 est isolé dans un fragment de 9,4Kb. Ce fragment (SN) est encadré par deux sites de restriction : SacI et NheI. Le fragment SN sera ensuite inséré dans un vecteur pour la construction du transgène MOR23IRES-tauGFP.Les barres rouges représentent les amorces internes au fragment SN. Ces amorces sont utilisées pour l'identification du gène en Southern-blot. L'amorce interne au fragment 3'EXT sert à identifier les clones ES positifs (Vassalli , 2002). **B-** Le gène M71 est constitué de deux exons. Les séquences non-codantes sont représentées par un rectangle de couleur orange tandis que la séquence codante est en jaune. Le premier exon (Ex 1) d'une longueur de 176pb est suivi par un intron de 2 Kb qui se termine à 18pb avant le codon d'initation de la traduction (Rothman, Feinstein et al. 2005).

Régulation de l'expression des récepteurs olfactifs

Parmi 1296 gènes de RO, un seul est exprimé par neurone tandis que les autres gènes restent silencieux dans l'EO. De plus, un seul allèle (paternel ou maternel) est exprimé par neurone. La meilleur preuve de cette exclusion allélique est qu'un seul OR peut être amplifié (par RT-PCR) à partir d'un neurone olfactif (Malnic, Gonzalez-Kristeller et al. 2010). Selon quel mécanisme un NRO activerait un seul gène codant pour un seul RO parmi un large répertoire comptant plus de 1200 RO ? Sur la base d'études d'autres familles multigéniques, trois

mécanismes de régulation sont proposés pour expliquer le choix et l'activation des gènes des récepteurs olfactifs (Serizawa, Miyamichi et al. 2004).

i) La recombinaison génique qui permet de joindre un promoteur et une région activatrice à la région proximale du RO. ii) La conversion génique qui permet le transfert d'une séquence de gène codant un RO à proximité d'une cassette d'expression. iii) Et finalement, la régulation par une région de contrôle du locus (LCR) qui stimule la transcription à distance par repliement de la chaine d'ADN (**figure 18**).

Alors que les deux premiers mécanismes ont été écartés (Eggan, Baldwin et al. 2004), le troisième mécanisme (LCR) semble le plus probable.

La région de contrôle du locus, LCR est un élément de régulation qui agit à distance sur les régions promotrices des gènes pour activer leur expression.

Ce type de régulation a été proposé pour l'expression des gènes des RO, à la suite d'une étude de comparaison informatique de séquences du génome de la souris et de l'homme (Serizawa, Miyamichi et al. 2003) . Cette étude a permis d'identifier une région conservée (homologue) de 2Kb, appelée région H, située en amont d'un groupe de gènes de RO. Afin de savoir si cette région est impliquée dans l'expression des RO, ces mêmes auteurs ont délété cette région à partir de construction (YAC) contenant un groupe de gènes de RO, composé de 3 gènes (MOR28, MOR10 et MOR83) marqués individuellement (LacZ, eGFP et WGA). Ils observèrent que dans cette construction tronquée, aucun des trois gènes n'est exprimé. L'introduction de la région H dans cette construction tronquée permet de rétablir l'expression des RO. De plus ils montrèrent que plus la région H est proche d'un groupe de gène de RO et plus le nombre de NRO exprimant le premier gène augmente.

Plus tard, des travaux (Lomvardas, Barnea et al. 2006) ont montré que cette région H peut trans-activer spécifiquement des promoteurs de RO (par repliement de l'ADN). Cependant, des études de « knockout » de la région H contredisent le modèle de trans-activation : les régions H réguleraient l'expression des RO en cis et non pas en trans. En conclusion, l'élément H ne peut pas expliquer toute la régulation de l'expression des OR (Nguyen, Zhou et al. 2007). Celui-ci est un cis-régulateur parmi d'autres (Fuss, Omura et al. 2007; Bozza, Vassalli et al. 2009).

D’autres éléments cis-régulateurs de l’expression des RO ont été découverts. Ces régions régulatrices sont les suivantes: un site de fixation d’homéodomaines (domaines protéiques capables de se lier à l’ADN) et un site « O/E like » permettant la liaison des protéines O/E, membres de la famille de facteurs de transcription Olf/EBF. Le site homéodomaine a particulièrement été reconnu comme indispensable à la maturation du neurone olfactif. Ces sites de liaison ont également été retrouvés dans les régions promotrices des gènes de MOR23 et de M71 (Vassalli, Rothman et al. 2002; Nishizumi, Kumasaka et al. 2007) (**figure 17**). La mutation de ces sites régulateurs abolit l’expression des RO (Hirota and Mombaerts 2004). On peut également trouver le long de la séquence transcrite et non transcrite des sites de fixation de CREB impliqués dans la régulation de l’expression de l’ARNm.

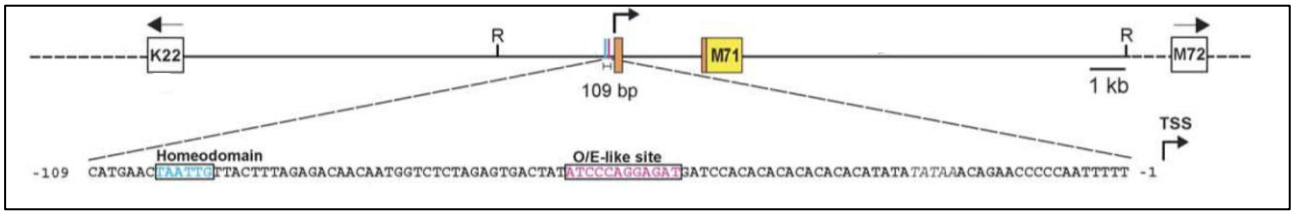


Figure 17. Structure du locus du gène M71.

Le gène M71 est localisé entre le gène du RO M72 et le pseudo-gène K22 (en rectangle blanc). Le promoteur du gène M71 possède un homéo-domaine et un site « O/E-like ». Les sens de lecture des gènes K22, M71 et M72 sont indiqués par des flèches. TSS: site d’initiation de la traduction. R : EcoRI (Rothman, Feinstein et al. 2005).

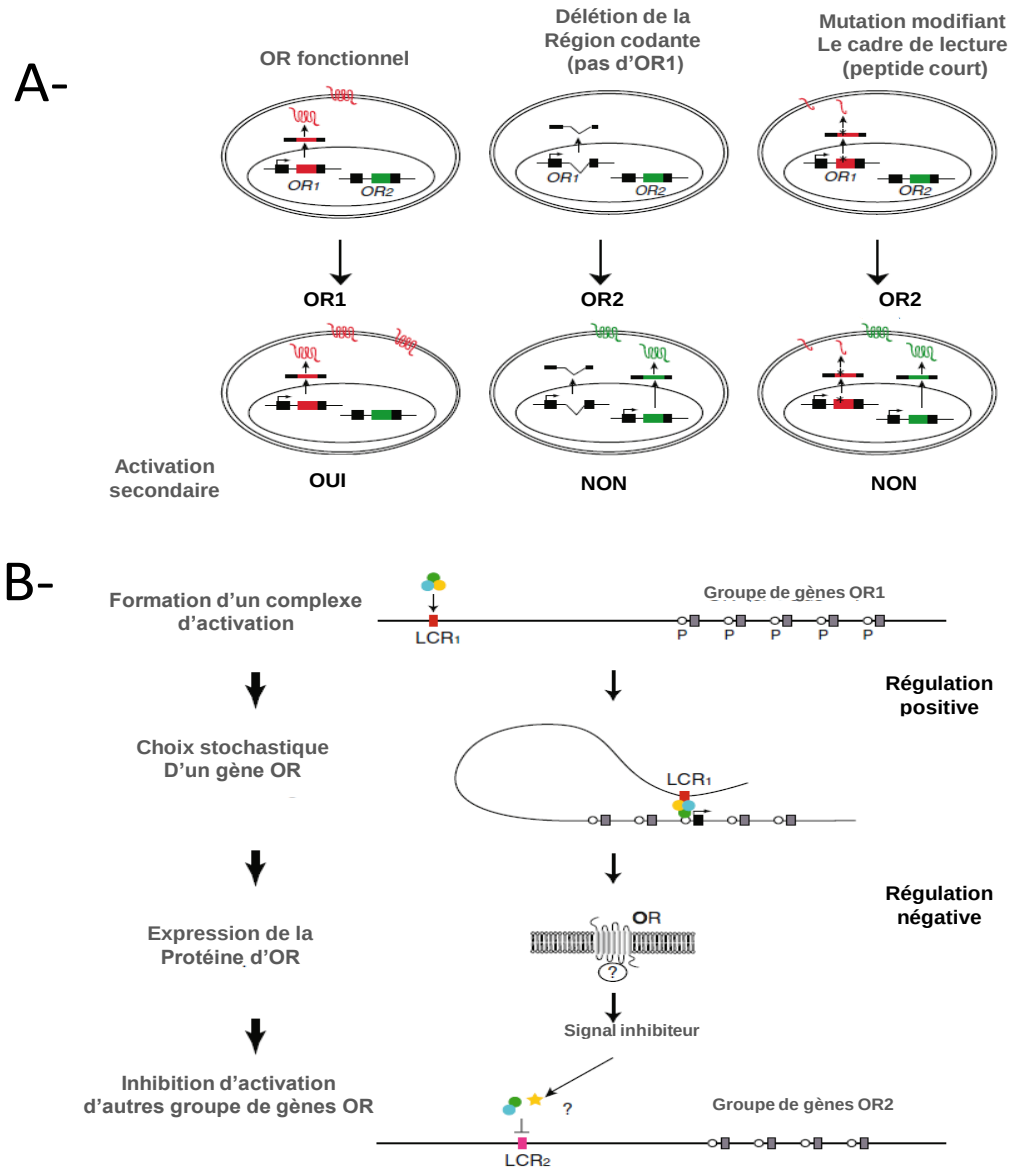


Figure 18. Modèle proposé pour la sélection du gène RO.

A- Régulation de l'expression des gènes OR par rétrocontrôle négatif par les RO assurant la règle: « un récepteur par neurone ». Lorsqu'un gène codant un RO est activé (ex : OR1), l'expression fonctionnelle du RO va inhiber (à gauche) l'expression d'autres RO (OR2). Lorsque la région codante est délétée, le RO se trouvant muté (OR1) n'est plus capable d'inhiber l'expression d'OR2 (milieu). Lorsque la région codante est mutée ponctuellement, cela peut induire un décalage du cadre de lecture et donc l'apparition d'un codon stop prématurément. Ce pseudogène codera pour un peptide de courte taille, ce qui permettra l'activation d'autres gènes (OR2) (à droite). **B-** Un modèle pour l'expression d'un RO. Le complexe d'activation formé par la région contrôle de régulation choisit un site promoteur (P) de manière aléatoire. Ceci va activer un gène RO membre d'un cluster (régulation positive). Une fois que le gène activé est exprimé, il transmet un signal inhibiteur pour bloquer l'activation d'autres gènes RO (régulation négative). L'activation stochastique d'un gène RO et la régulation par feedback négatif permet de maintenir la règle « un neurone par récepteur » dans le système olfactif de mammifères (D'après (Imai and Sakano 2009)) .

Conclusion

Les récepteurs olfactifs les plus représentés dans les organes sensoriels du système olfactif sont les récepteurs olfactifs standards. Découverts par Buck et Axel en 1991, ces RO appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Les gènes codant les RO ont la particularité d'être localisés dans des groupes de gènes de RO et d'être constitués d'un seul exon codant. Bien que la structure du récepteur olfactif ne soit toujours pas résolue, sa modélisation informatique a permis d'identifier les régions variables qui sont impliquées dans la reconnaissance des molécules odorantes. La grande variabilité de ces régions explique la capacité du système olfactif à détecter un large spectre de molécules odorantes. Par le biais de la bio-informatique, les récepteurs ont été classés en deux classes : classe I et II. Ces classes se distinguent par leur divergence en séquence d'acides aminés et par leur différence de distribution dans l'épithélium olfactif et sur le génome.

Partie 3 : Régulation de la genèse olfactive

Ce n'est qu'au cours des trois dernières décennies que les chercheurs sont parvenus à élucider l'incroyable capacité du système olfactif à renouveler les neurones olfactifs morts ou mourants.

En effet, il a fallu attendre des travaux d'études de lésion du système olfactif datant des années 60 (bulbectomie, axotomie et agression de la muqueuse) pour revue (Gokoffski, Kawauchi et al. 2010) pour découvrir que la muqueuse olfactive (MO) constitue un site de neurogénèse. La MO a la capacité de renouveler les NRO morts ou mourants à partir de cellules progénitrices que sont les cellules basales.

Les lésions de la muqueuse olfactive induisent une neurogénèse. Toutefois cette neurogénèse est également active tout au long de la vie de l'animal afin de maintenir une structuration fonctionnelle du tissu olfactif. La différenciation et prolifération des cellules basales (globulaires et horizontales) permettent de renouveler en permanence les neurones olfactifs.

Trois stades cellulaires (précédant le neurone olfactif mature) dans le lignage neuronal ont été décrits dans la littérature, à la suite des travaux d'Anne Calof (Calof, Hagiwara et al. 1996; Calof, Mumm et al. 1998) sur les modèles d'études *in vivo* et *in vitro*.

Le premier stade est la différenciation des cellules souches (cellules basale horizontale) en précurseurs qui prolifèrent et se différencient en précurseurs immédiats des neurones, appelés aussi INP (cellules basale globuleuse = équivalent *in vivo* (Gokoffski, Kawauchi et al. 2010)). Ensuite, les INP prolifèrent et se différencient à leur tour en neurones olfactifs immatures qui finalement se différencient en leur forme finale, les neurones olfactifs matures.

Cette découverte a suscité la curiosité de nombreuses équipes de recherches qui ont finalement montré que le lignage olfactif est tributaire de facteurs intrinsèques et extrinsèques (Calof 1995; Farbman and Buchholz 1996).

Afin de déterminer les facteurs impliqués dans la neurogenèse, des équipes ont développé deux stratégies majeures d'étude : i) la bulbectomie qui induit une apoptose de l'EO suivie par une neurogénèse, ii) la mise en culture d'explants olfactifs à différents stades du développement pour faciliter l'identification des facteurs moléculaires impliqués dans la neurogénèse.

Dans ces deux stratégies, l'utilisation d'indicateurs de division/migration cellulaire (la thymidine tritiée et le bromodéoxyuridine) combinée à celle de marqueurs phénotypiques (Kératine, GAP43, OMP) s'est avérée indispensable pour l'identification des différents stades de la neurogénèse et des facteurs (extrinsèque ou intrinsèque) associés.

Cette partie est consacrée aux différents travaux de recherches relatifs à l'étude du rôle des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur la dynamique cellulaire des neurones olfactifs.

Les facteurs environnementaux jouent un rôle dans le maintien de cet équilibre même si les études qui ont abordé cette question sont rares.

C'est pourquoi, je conclurai cette partie par la description des travaux de recherches qui ont éclairé le rôle de l'environnement sur le développement du neurone olfactif.

Les facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques impliqués dans la neurogénèse des neurones olfactifs sont des facteurs de transcription.

La majorité des facteurs de transcription sont à motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) (Calof, Hagiwara et al. 1996; Calof, Mumm et al. 1998) dont les plus importants sont: Mash1 (l'homologue chez le mammifère du gène pro-neuronal Acaete-Scute de la drosophile) et la neurogenine I.

Mash1 joue un rôle déterminant dans le développement du système nerveux central et périphérique (SNP) où il se trouve exprimé. Dans le SNP, Mash1 est le premier facteur à être impliqué dans le lignage des NRO. Il est exprimé, entre autre, dans les cellules pro-génitrices de l'EO nommées par Calof (Calof, Hagiwara et al. 1996) « Transit Amplify cells ». Ces cellules apparaissent après les cellules souches et avant les INP. Cau et collaborateurs (Cau, Gradwohl et al. 1997) ont montré, qu'en l'absence de Mash1, les « transit amplify cells » ne peuvent se différencier en INP. Partant de là, il est logique de s'attendre à ce que les souris nulles pour Mash1 présentent un déficit du nombre de NRO, comme l'ont montré les travaux de Murray, Navi et collaborateurs (Murray, Navi et al. 2003). Auparavant, il a été montré que le phénotype perdu sur des explants d'EO issus de souris Mash1-/- est rétabli suite à leur infection par des vecteurs rétroviraux dans lesquels ont été insérés l'ADNc de Mash1 (Calof, Mumm et al. 1998). Ensemble, ces résultats suggèrent bien que Mash1 joue un rôle essentiel dans la neurogénèse de l'EO.

Une fois que les cellules progénitrices Mash1+ se différencient en INP, elles perdent leur immunoréactivité pour Mash1 et deviennent Neurogenine I +. A l'instar de Mash1, la neurogenin I est dotée d'une « activité de différenciation neuronale » (Cau, Gradwohl et al. 1997). Elle permet de différencier les INP en NRO immatures qui expriment alors un marqueur connu du développement neuronal : N-CAM. Des marqueurs spécifiques des NRO immatures : la tubuline III, NST (Grill and Pixley 1997) et GAP43 (Roskams, Cai et al. 1998) sont exprimés. Ils jouent un rôle important dans le développement/guidage des axones et donc dans la maturation du neurone.

Les NRO matures perdent leur immuno-réactivité pour GAP43 et NST et deviennent OMP+ (olfactory marker protein) (Farbman and Margolis 1980) (**figure 19**).

Bien que la neurogénèse dépende de facteurs intrinsèques, elle dépend aussi de facteurs extrinsèques, que sont principalement les facteurs de croissance.

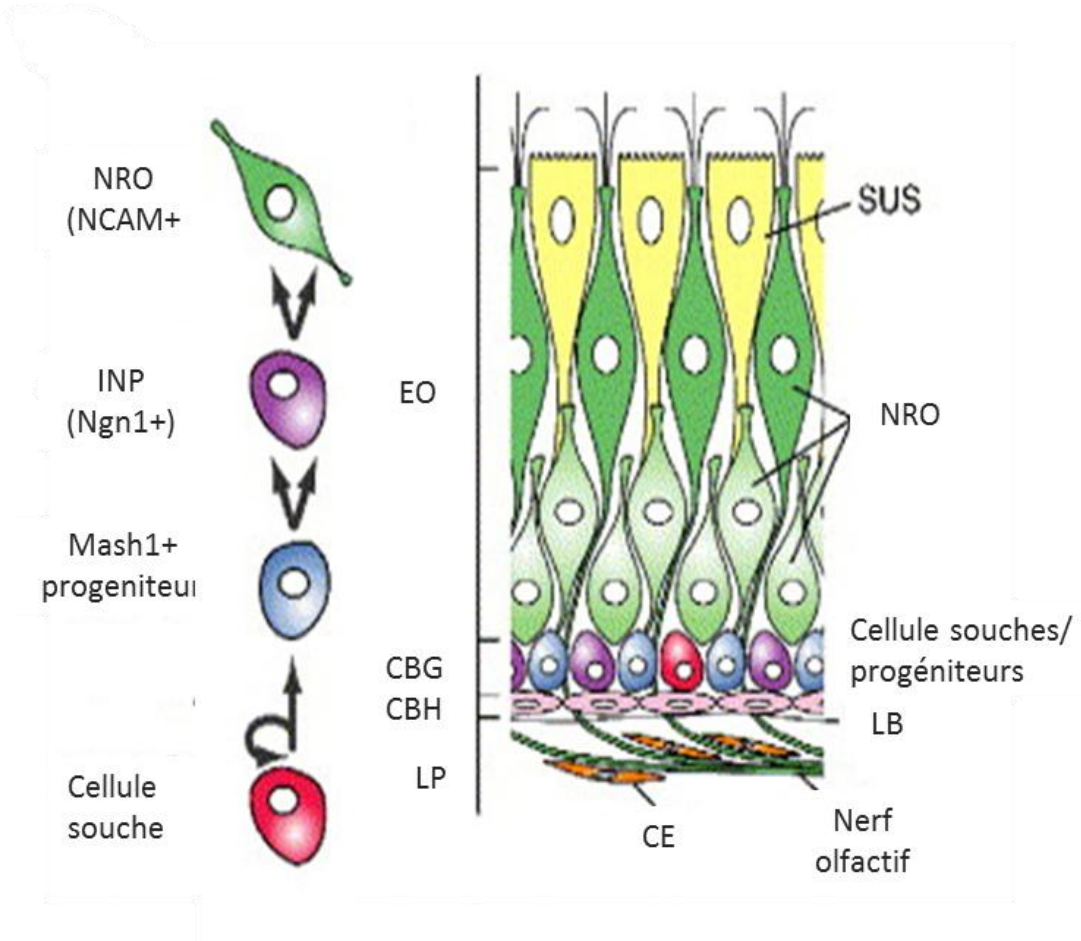


Figure 19. Schéma de la voie de différenciation neuronale.

Les Cellules souches neuronales (rouge) donnent lieu à des « transit amplify cell » qui expriment Mash1 (bleu), suivi par des précurseurs neuronaux immédiats (INP; violet), qui expriment Ngn1. L'INP se divise et se différencie en cellules filles NRO (vert), qui se distinguent par l'expression NCAM. SUS= cellules sustentaculaires, NRO = neurorécepteur olfactif, CBG= couche des cellules basales globulaires, contenant des cellules souches et des progéniteurs neuronaux (Mash1 + progéniteurs et Ngn1 + INP); CBH = couche des cellules basales horizontales, LP = lamina propria; CE = cellules olfactives engainantes; nerf olfactif (= axones des NRO) (Beites, Kawauchi et al. 2005).

Facteurs extrinsèques

La génèse olfactive est régi par différents signaux de régulations autocrines ou paracrines, comprenant essentiellement les facteurs de croissance produits par la muqueuse, la sous-muqueuse et le B.O. Ces molécules interagissent avec les facteurs de transcription impliqués dans le lignage des NRO. (voir ouvrage : Odorat et gout, chapitre.10) (**figure 20**).

Parmi ces facteurs de croissance, citons la famille des facteurs de croissance fibroblastique (FGF) qui prolongent la neurogénèse en régulant la division cellulaire des INP (Newman, Feron et al. 2000). En effet, les expériences de De Hamer et collaborateurs (voir revue (Calof 1995)) sur cultures d'EO de rats en présence de thymidine tritiée (indicateur de mitose) et de FGF ont montré que les INP (qui en temps normal se divisent une seule fois) se divisent à plusieurs reprises avant de se différencier en NRO. D'autres facteurs régulent la prolifération des précurseurs des NRO tels : le facteur de croissance transformant-α (TGF-α) et le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF). TGF-α stimule la prolifération des cellules basales horizontales, tandis que le facteur LIF stimule la prolifération des cellules basales globuleuses (Getchell, Boggess et al. 2002).

En plus de leur rôle de régulateur de la prolifération des cellules progénitrices des NRO, les facteurs de croissance régulent leur survie comme les neurotrophines le font par exemple.

Les neurotrophines sont connues pour réguler la survie de plusieurs population de neurones olfactifs (Tucker, Meyer et al. 2001). Les neurotrophines regroupent des molécules telles que le NGF (neurotrophin growth factor), le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et le NT-3 (neurotrophin-3). Leurs récepteurs sont exprimés de façon séquentielle durant la génèse olfactive. D'abord apparaît, dans les cellules basales, le récepteur TrK A dont le ligand est NGF. Ensuite, le récepteur TrK B dans les neurones immatures et matures. BDNF, son ligand, serait impliqué dans la survie des NRO. Et finalement le récepteur TrK C avec son ligand NT-3 serait impliqué dans le maintien du neurone mature, tout comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-AB) (Newman, Feron et al. 2000).

En bref, de nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de la neurogénèse.

Le turnover des neurones olfactifs peut être affecté par l'environnement puisque les cils olfactifs sont en contact permanent avec les molécules chimiques de l'air qui nous entoure. Dans la partie suivante je ferai un bilan des rares connaissances actuelles du rôle de l'environnement sur la neurogénèse.

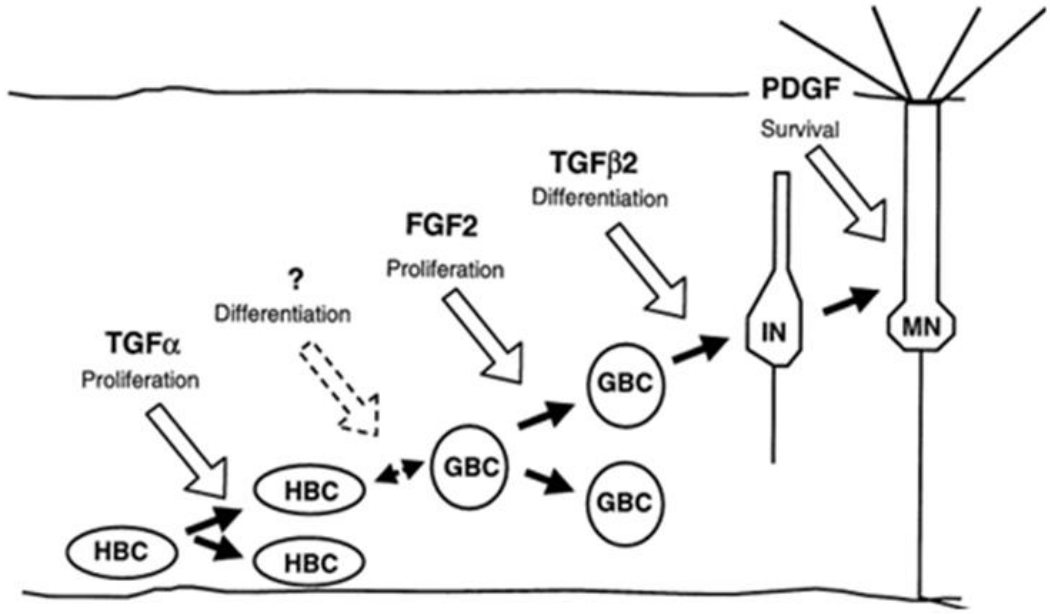


Figure 20. Représentation schématique du développement du NRO sous le contrôle de facteurs extrinsèques.

Ce schéma indique les différents sites d'actions des facteurs de croissance. Tous les facteurs de croissance ne sont pas représentés sur ce schéma et ils peuvent agir sur d'autres types cellulaires que ceux représentés. La relation de lignage entre les cellules basales horizontales et les globulaires n'est pas prouvée (flèche en pointillée). GBC: cellule basale globulaire; HBC: cellules basale horizontale; IN: neurone immature; MN: neurone mature (Newman, Feron et al. 2000).

Facteurs environnementaux

Nombreux sont les faits expérimentaux qui ont mis en exergue le rôle des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur la neurogénèse.

Cependant, les études portant sur le rôle de l'environnement dans le développement du neurone olfactif sont plus rares. Parmi ces études, la majorité des sujets traités se rapporte à l'effet des composés toxiques sur la dynamique cellulaire de l'EO.

Effets des composés toxiques sur l'épithélium olfactif.

Plusieurs auteurs comme K. Brennemann et collaborateurs (Brenneman, James et al. 2000) ont rapporté que l'exposition à un composé toxique tel que le sulfure d'hydrogène (H2S) a un

impact direct sur la neurogénèse. Ils ont montré que seuls les neurones olfactifs matures sont affectés par cette agression chimique particulière. Les cellules de la couche basale (comprenant les cellules progénitrices) ne sont, par conséquent, pas atteintes.

Mark E. Hurtt (Hurtt, Thomas et al. 1988) décrivait que l'exposition continue d'une muqueuse olfactive à un composé toxique, en l'occurrence, le bromure de méthyl, non seulement provoque une mort de NRO, mais induit (à l'image de la bulbectomie) une prolifération des cellules basales (pro-génitrices). Il observa une récupération de l'EO sur le plan morphologique et fonctionnel en dépit d'une exposition continue au toxique.

En revanche l'exposition à d'autres composés organiques peut provoquer un phénomène inverse. C'est le cas de la pyridine utilisée dans les travaux de G. Buron et collaborateurs (Buron, Hacquemand et al. 2011), qui augmente le nombre de neurones matures et réduit le nombre de cellules progénitrices. Les conséquences seraient liées à la lipophilie du composé et donc à sa capacité à pénétrer dans la muqueuse mais aussi à sa métabolisation.

Par ailleurs, certains travaux se sont penchés sur l'effet de l'activité sur l'épithélium olfactif et sur le bulbe olfactif. Les stratégies employées ont été, soit la privation olfactive, soit l'exposition à l'odeur.

Effets de l'activité sur l'épithélium olfactif.

Dès les années 80 (Farbman, Brunjes et al. 1988) il a été montré par la quantification des NRO que la privation sensorielle de souris cautérisées dès la naissance pendant 21 jours provoque une réduction de 10% du nombre des neurones. Les mêmes auteurs ont montré que la baisse des neurones ne concerne que les neurones immatures. Cette baisse a été retrouvée plus tard sur un modèle de culture cellulaire de neurones olfactifs (Brauchi, Cea et al. 2006). Ces auteurs suggèrent que la baisse est provoquée par une mort de type apoptotique dépendante du calcium. Une autre étude montre à travers des expériences d'électroolfactogramme que l'exposition répétée (pendant 23 jours) à un certain odorant augmente la sensibilité à cet odorant chez la souris (Wang, Wysocki et al. 1993). Paradoxalement à l'étude précédente (Farbman, Brunjes et al. 1988), cette augmentation suggère une survie des neurones stimulés.

Plus tard, une étude menée chez la souris montre que la sur-exposition à l'odeur induit la survie des neurones stimulés (Zhao and Reed 2001).

Avec l'apparition d'outils modernes de la génétique moléculaire (souris génétiquement modifiées, transfection par lentivirus modifiés etc…) permettant de suivre une population spécifique de neurones olfactifs, des études récentes ont montré des résultats opposés : l'exposition à l'odorant induit, soit la survie des NRO (Watt, Sakano et al. 2004), soit la baisse du nombre de NRO (Cavallin, Powell et al. 2010).

Dans le premier cas de figure, le récepteur I7 et la protéine GFP ont été coexprimés via un adénovirus dans les neurones olfactifs de souris exposées à 20mM d'octanal pendant 6 semaines. Cette exposition induit une survie des neurones exprimant le récepteur I7 (Watt, Sakano et al. 2004). La survie des neurones est associée à une interaction entre les voies de transduction olfactive et de la régulation de la survie cellulaire. Effectivement, l'activation continue des récepteurs olfactifs a permis d'augmenter l'expression d'un facteur de transcription, CREB (cAMP responsive element binding) impliqué dans plusieurs processus physiologiques (la prolifération et différentiation cellulaire) notamment dans l'activation de gènes à propriétés inhibitrices d'apoptose « Bcl2 ».

Dans la deuxième étude, la population des neurones exprimant le récepteur M72 diminue après une exposition de 21 jours à l'acétophénone pure (Cavallin, Powell et al. 2010). Une autre étude montre que l'exposition de souris à l'octanal dilué 100 fois ne provoque pas de changement du nombre de neurone M71 (Kerr and Belluscio 2006). Dans cette étude, l'odorant a été appliqué sur le ventre de la souris alors que dans les deux cas précédents (Watt, Sakano et al. 2004; Cavallin, Powell et al. 2010), l'odorant a été déposé sur un coton contenu dans une boule à thé suspendu à la cage d'exposition.

L'étude de Wang et Wysocki et collaborateurs décrivait en 1993 (Wang, Wysocki et al. 1993) qu'une souris NZB/B1NJ odorisée - pendant une période de deux à quatre semaines - à l'androsténone voit son seuil de détection augmenter pour ce même odorant. Il n'en est pas de même pour une souris CBA/J exposée à l'androsténone. Ce phénomène serait associé à l'état d'anosmie du sujet vis-à-vis de la molécule odorante proposée. Les souris à faible sensibilité à l'odorant développeraient une meilleure sensibilité après exposition répétée à l'odeur, que des souris déjà sensibles à l'odeur.

L'ensemble de ces travaux (Wang, Wysocki et al. 1993; Zhao and Reed 2001; Watt, Sakano et al. 2004; Kerr and Belluscio 2006; Cavallin, Powell et al. 2010) suggère que les conséquences d'une exposition à l'odeur sur une population de NRO dépendent du couple ligand-récepteur, de la concentration et du paradigme expérimental utilisé. Dans le modèle I7,

la survie peut concerner uniquement les neurones transféctés : les conséquences sur la population native de neurone I7 restent inconnues.

Effets de l'activité sur le bulbe olfactif.

Au niveau central, il a été montré dès les années 70 que l'exposition continue à une odeur induit une dégénérescence des neurones du bulbe olfactif (Doving and Pinching 1973). Plus tard, il a été montré que l'exposition de souris adultes à un environnement enrichi en odeur (temps d'exposition : 20 jours) augmente drastiquement l'incorporation de neurones néoformés dans le bulbe olfactif (Rochefort and Lledo 2005) ainsi que leur survie (Rochefort, Gheusi et al. 2002). Ceci est associé chez le rat adulte (temps d'exposition : 10 jours) à une augmentation de leurs activités (Mandairon, Didier et al. 2008). Ces effets ont une contrepartie fonctionnelle sur les cellules mitrales qui se traduit par une baisse de leur activité chez les rats adultes (Buonviso, Gervais et al. 1998). Au niveau comportemental, ces effets se traduisent par une amélioration des performances de discrimination d'odeurs aspécifiques à l'odeur pour lesquels les rats ont été soumis pendant 10 et 20 jours (Mandairon, Stack et al. 2006; Mandairon, Stack et al. 2006).

Dans l'étude de la migration cellulaire (Rochefort and Lledo 2005), ce processus s'interrompt suite à l'arrêt de l'exposition. De la même manière, une autre étude (Kempermann and Gage 1999) montre que la neurogénèse au niveau de l'hippocampe est anormalement augmentée suite à l'exposition, puis chute après arrêt d'exposition. Enfin ces travaux montrent clairement une fonction adaptative du système olfactif à son environnement.

A la lumière de ces informations recueillies, on peut en conclure que la dynamique cellulaire - c'est-à-dire le turnover du NRO et des neurones de second ordre (bulbe olfactif) - dépend d'une stimulation odorante. En effet, Meisami, dans ses travaux (1976) (Meisami 1976) mentionne qu'un blocage expérimental de l'activité neuronal par occlusion olfactive ralentit le turnover des NRO, ce phénomène est appuyé par D. Coppola (Coppola and Waggener 2012). Qu'en est-il d'une stimulation odorante précoce, en l'occurrence durant la période postnatale durant laquelle le système olfactif se met en place ? Modifie-t-on la dynamique cellulaire des neurones de l'épithélium olfactif ? Afin de répondre à cette question qui est la problématique centrale de mon travail de thèse, je décrirai dans le paragraphe suivant, les travaux publiés relatifs à la question posée.

Bien qu'il soit communément admis dans la littérature, depuis des décennies jusqu'à ce jour, qu'une stimulation sensorielle précoce (avant la maturation du cerveau) par un environnement enrichi modifie le fonctionnement du cerveau ainsi que son organisation anatomique (Turner and Greenough 1985; Abrous, Koehl et al. 2005), il n'en est pas de même sur le système olfactif périphérique.

En outre, une des rares études porte sur les conséquences d'une expérience olfactive précoce sur le développement du système olfactif périphérique (Kerr and Belluscio 2006).

Les auteurs concluent que la stimulation sensorielle post-natale n'induit pas de changement de la densité de neurones spécifiques à l'odeur testée, mais accélère la maturation des glomérules.

En revanche, il n'existe aucune donnée sur les conséquences fonctionnelles et moléculaires d'une exposition à l'odeur sur une population spécifique de neurones, surtout durant la période précoce du développement.

Conclusion

Bien qu'il soit établi que l'équilibre entre la neurogénèse et l'apoptose des NRO est régulée non seulement par les facteurs extrinsèques, intrinsèques mais aussi par les facteurs environnementaux - comme les odorants –, les conséquences fonctionnelles, anatomiques et moléculaires d'une expérience olfactive précoce d'un individu sur la muqueuse olfactive restent à caractériser.

Comme jusqu'à ce jour, l'adaptation périphérique de l'EO induite par une stimulation odorante n'a jamais fait l'objet d'étude à l'échelle d'une population de neurones olfactifs, j'ai consacré une partie de ce chapitre (**partie 3**) aux différentes possibilités techniques d'étude de populations homogènes de cellules afin de répondre à cette problématique.

Partie 4 Etude moléculaire sur une population homogène de cellules

L'intérêt pour l'analyse d'une population homogène de cellules a augmenté de façon spectaculaire au cours de ces dernières années. Cet intérêt nouveau s'explique par le fait que ce type d'analyse couvre un large champ d'application dans des disciplines très variées, telles que l'hématologie (étude de l'hématopoïèse…), l'immunologie (étude de sous population cellulaire…), la cancérologie (étude de cellules tumorales circulantes) et la génétique. Il concerne, tant la recherche fondamentale, que la recherche clinique. Toutefois, il a fallu développer des techniques efficaces d'isolement de populations cellulaires homogènes.

Dans cette partie, j'expliquerai en quoi cette technique pourrait m'aider à aborder la problématique de ma thèse et je décrirai les différentes techniques actuelles qui permettent d'isoler une population cellulaire particulière.

En biologie moléculaire, il existe deux manières d'analyser le contenu cytoplasmique d'un ensemble de cellules formant un tissu. Soit par une approche globale dite « classique » consistant à analyser le contenu en protéines ou en ARN ou en ADN à partir d'un ensemble de cellules (tous les types cellulaires étant mélangés). Soit par une approche ciblée qui consiste à analyser le contenu d'une population pure de cellules (**figure 21**). L'information donnée par la première stratégie est générale tandis que celle de la deuxième est précise d'un type cellulaire donné.

Le choix de l'approche dépendra de la problématique posée.

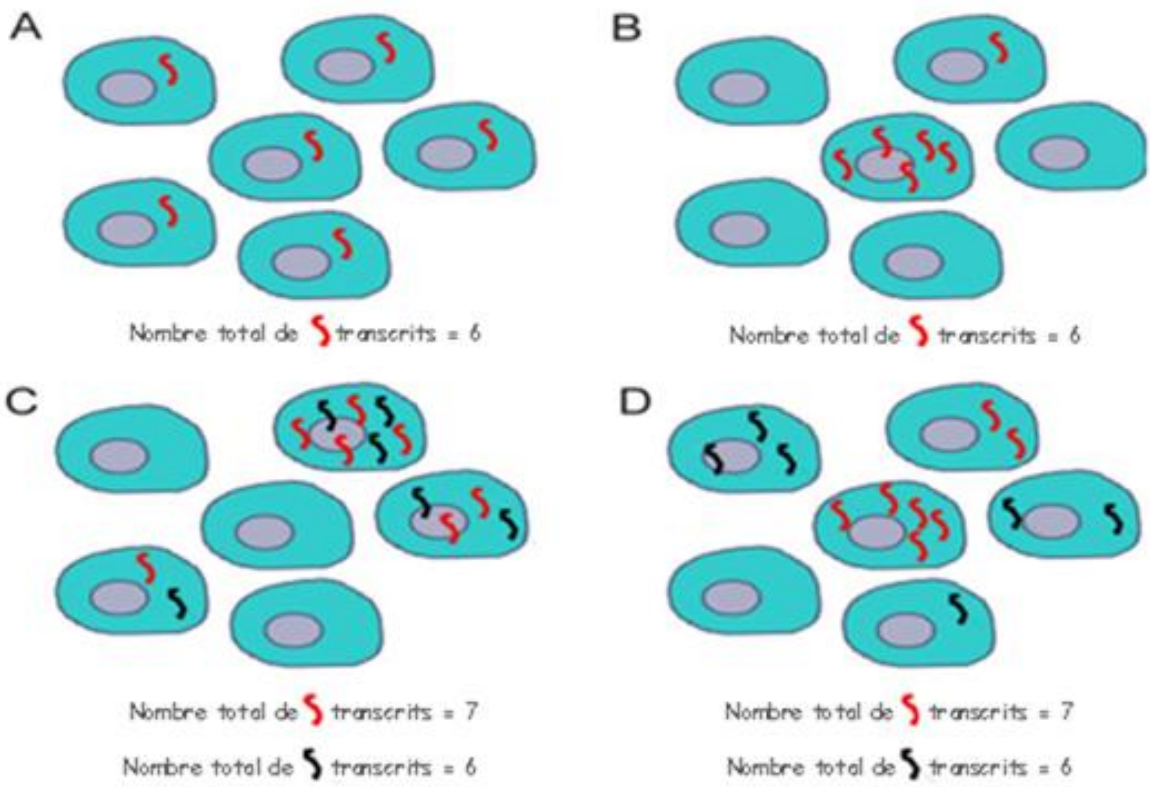


Figure 21. Hétérogénéité cellulaire des niveaux de transcription.

Les mesures sur cellules uniques (population homogène) permettent de distinguer les cas (A) et (C) de (B) et (D), respectivement, tandis que les mesures sur une population (hétérogène) ne le permettent pas.

Si l'analyse d'une population homogène couvre un large champ multidisciplinaire, tant dans la recherche fondamentale que clinique, les études à ce jour qui ont tenté d'analyser par approche moléculaire une population homogène de neurones olfactifs sont rares. Une des raisons est la difficulté de l'isolement des cellules individuelles pour l'analyse moléculaire.

Dans les paragraphes suivants, seront détaillés les trois principales méthodes: la micromanipulation par pipette de patch, la microdissection laser et la cytométrie en flux.

La micromanipulation (prélèvement par la pipette de patch)

Parmi les trois méthodes d'isolement énumérées dans le paragraphe précédent, nous allons consacrer cette sous-partie à la description de la méthode de prélèvement par pipette de patch. Cette technique m'a permis de répondre à une de mes problématiques de travail qui est de

déterminer les conséquences moléculaires d'une odorisation post-natale de souris, à l'échelle d'une population de neurones olfactifs.

Les systèmes de micromanipulations typiques sont composés d'un microscope inversé, équipé d'un micromanipulateur - pour piloter la pipette - et d'épi-fluorescence (si l'échantillon est marqué par la fluorescence). Les applications peuvent toucher le secteur de la médecine reproductive – injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) qui permet de pallier certaines anomalies de spermatozoïdes ne pouvant pas féconder des ovocytes (Kimura and Yanagimachi 1995), la criminalistique - génotypage médico-légal - et la recherche fondamentale (Esumi, Kaneko et al. 2006; Taniguchi, Kajiyama et al. 2009).

Il s'agit d'une méthode fiable pour la capture des cellules individuelles. Il est notamment possible de contrôler visuellement l'intégrité morphologique des cellules (**figure 22**). Toutefois, cette méthode présente des limites.

Un des inconvénients majeurs de cette technique est le temps nécessaire au transfert des cellules (à partir d'un support de stockage jusqu'à un tube pour l'analyse moléculaire) limitant ainsi le débit du procédé. En outre, une fois que le micromanipulateur quitte le plan optique du microscope, il n'est plus possible de contrôler visuellement le transfert de la cellule unique dans le tube. Ceci représente un deuxième inconvénient de la technique. En conséquence, certaines cellules ne parviennent pas à être transférées correctement dans le fond d'un tube.

Pour y remédier, il est possible de casser la pointe de la pipette où se trouve la cellule prélevée dans un tube standard de PCR. Ce tube est ensuite soumis à une centrifugation pour assurer le transfert de la cellule dans le tampon de lyse. L'analyse en aval nécessite une amplification du matériel génétique (PCR) et parfois une pré-amplification, que ce soit pour étudier un gène ou plusieurs gènes.

En dépit de ces deux inconvénients, la micromanipulation reste une méthode fiable et puissante pour la capture des cellules individuelles. Les deux autres techniques qui vont faire l'objet des prochains paragraphes sont certes plus appropriées pour certaines applications - en l'occurrence l'analyse à haut débit - mais possèdent également leurs propres limites.

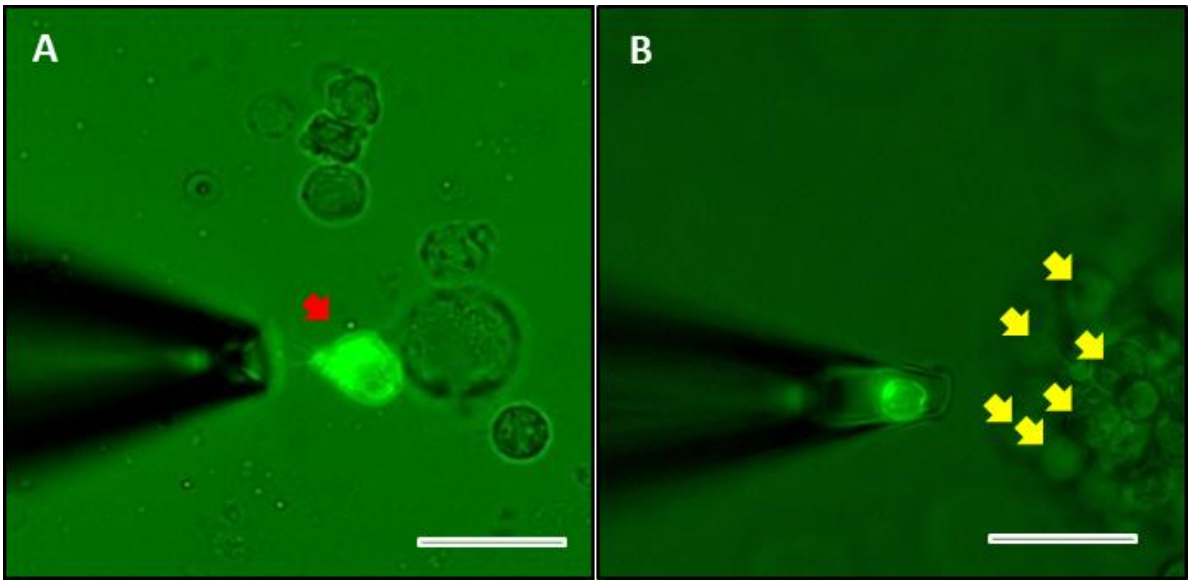


Figure 22. Prélèvement par la pipette de patch.

A- Micrographie montrant une pipette de patch à proximité d'une cellule d'intérêt marquée à la fluorescence (indiquée par une flèche rouge). **B-** En prélevant la cellule fluorescente, on exclut les cellules non fluorescentes (marquées par des flèches jaunes). Barre d'échelle : 12µm.

La microdissection laser (MDL)

Une alternative à la méthode de prélèvement par la pipette de patch est la microdissection laser (MDL). Dans cette partie sera décrit le principe de la méthode.

Historiquement, plusieurs stratégies ont été développées pour micro-disséquer des régions/cellules d'intérêt à partir d'un tissu en vue d'analyser le contenu cytoplasmique. Une des premières stratégies a consisté à séparer manuellement les cellules d'intérêt d'une coupe histologique. Cette technique imprécise est propice à la contamination (Radford, Fair et al. 1993). Une autre méthode, notamment développée par D. Shibata (Shibata, Hawes et al. 1992), a consisté à détruire les régions non désirées par irradiation ultraviolet – dans le but d'inactiver le matériel génétique - pour ne garder que les cellules d'intérêt (voir figure). En conséquence seul le matériel génétique des cellules non-irradiées est amplifié et donc analysé. Il a fallu attendre l'étude magistrale de M.R. Emmert-Buck et collaborateurs (Emmert-Buck, Bonner et al. 1996) pour découvrir une façon plus élégante de micro-disséquer les régions d'intérêt d'un tissu : la microdissection laser (MDL).

Voici comment se présente la technique : à travers un microscope inversé, l'opérateur visualise le tissu - sur lequel est posée une feuille de transfert -, sélectionne les cellules à analyser et actionne alors deux faisceaux lasers pulsés dans l'optique du microscope. Un premier laser UV - à haute énergie - va permettre la découpe de la région d'intérêt et un deuxième IR est absorbé dans un endroit précis sur la feuille de transfert qui se trouve au-dessus des cellules cibles. A cet endroit précis, le film fond et se confond avec la ou les cellules sous-jacentes de choix. Lorsque le film est retiré, les cellules choisies restent liées au film, tandis que le reste du tissu est laissé derrière.

Bien avancée en termes de vitesse, de facilité d'utilisation par rapport au prélèvement par la pipette de patch, la MDL doit faire face à quelques problèmes :1) le premier problème est lié à l'état du tissu (fixé ou vivant). En effet, certaines études (von Ahlfen, Missel et al. 2007) ont montré que la fixation d'un tissu - entre autre par le paraformaldéhyde - compromet l'intégrité de l'ARN. La RT-PCR se trouve inhibée en raison des liaisons covalentes créées entre les bases de l'ARN bloquant l'accès à la polymérase 2) la deuxième limite de la technique se rapporte au diamètre du laser qui varie entre 7,5 et 30µm ce qui introduit de la contamination pour l'isolement de cellules de taille réduite. Dans notre cas, plusieurs tentatives de prélèvements n'ont pas abouti en raison de la taille des neurones olfactifs (5-6 µm de diamètre) 3) la dernière limite de la MDL est qu'elle n'est pas applicable sur des cellules en suspension. Les faisceaux lasers sont déviés par la solution.

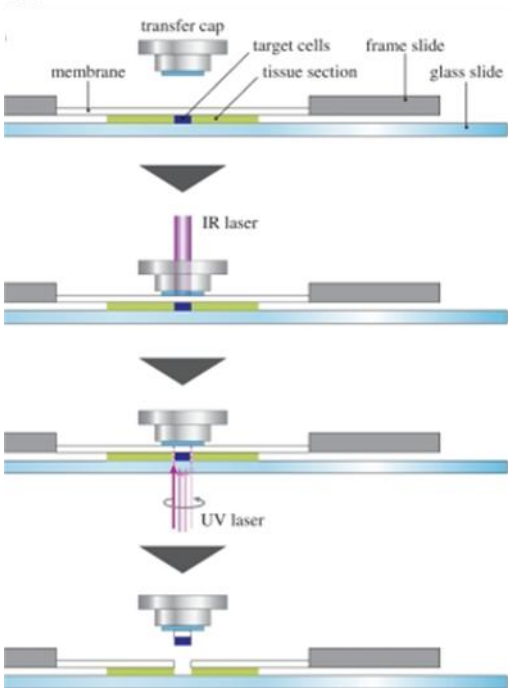


Figure 23. Schéma de la procédure d'isolation de cellules cibles par la microdissection laser.

En bref, un couvercle de transfert est placé au-dessus de l'échantillon qui contient la cellule d'intérêt. Ce couvercle de tube est recouvert par un film. Pour capturer la cellule d'intérêt dans le couvercle de transfert, un faisceau laser de type Infrarouge (IR) est appliqué à travers le couvercle. Ceci permet de faire fondre le film plastique autour de la cellule d'intérêt. La surface entourant la cellule d'intérêt est ensuite coupée par un faisceau laser de type ultra-violet (UV). Le tube de transfert est ensuite retiré pour être centrifugé. Ainsi la cellule d'intérêt est isolée du reste des cellules de l'échantillon.

En résumé, cette technique trouve son intérêt pour l'étude de cellules de grandes tailles issues de tissus fixés. Ainsi pour le prélèvement de neurones olfactifs, nous avons considéré cette technique comme étant inappropriée (ce problème sera abordé dans la partie discussion).

Tri par cytométrie en flux

C'est en 1934 que Moldavan a conçu le premier appareil de cytométrie en flux (CMF) qui, à l'origine, est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule (taille relative, granularité, intensité relative de fluorescence).

Dans les années 70, les chercheurs du laboratoire national de Los Alamos, notamment Fulwyler, ont associé des méthodes de mesures des caractéristiques physiques des cellules avec des méthodes électrostatiques afin de trier des cellules (Leary 2005). Le développement

d'appareillages commercialisés et l'apparition d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux.

La CMF permet l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux optiques mesurés sont relatifs aux propriétés intrinsèques des particules incluant les dimensions de la particule (forward scatter ou FSC), leur granularité relative (Side Scatter ou SSC) et leur propriété de fluorescence. Ces signaux sont ensuite séparés par un trajet optique constitué de filtres et de miroirs puis collectés par des photomutiplicateurs (détecteurs), amplifiés, numérisés et traités par un ordinateur . Cette analyse individuelle est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'évènements par seconde. L'ordinateur représente les paramètres mesurés sous la forme d'histogramme (2 paramètres : FSC en fonction de SSC et SSC ou FSC en fonction de l'intensité de la fluorescence émise). Après avoir évalué les paramètres de la population d'intérêt, il est possible de déterminer les critères de séparation. Ainsi, toutes les cellules dont les caractéristiques sont comprises entre les valeurs définies seront triées physiquement. Les cellules triées seront isolées individuellement dans des gouttelettes qui seront déviées par un champ électrostatique et récupérées dans un récipient pour une analyse moléculaire. Si la goutte contient une cellule non sélectionnée, le champ électrostatique ne s'active pas et la gouttelette sera éliminée (Leary 2005).

Pour le tri d'une population rare (telle une population de neurones olfactifs), la cytométrie en flux exige un enrichissement du milieu à l'aide de marqueurs spécifiques de sélection (ce qui représente un inconvénient de la technique).

En conclusion, parmi les différentes techniques d'isolement de cellules, la plus adaptée à notre type d'échantillon est le prélèvement par la pipette. En effet, l'inconvénient majeur de la méthode de tri par cytométrie en flux est qu'elle est assez lourde et qu'elle ne prend pas en considération l'intégrité des neurones olfactifs. Un neurone olfactif dépourvu de ses prolongements cytoplasmiques n'a pas le même contenu cytoplasmique qu'un neurone morphologiquement intact. Par ailleurs, la limite de la MDL est liée à son manque de précision de la découpe du tissu et aux conditions de traitement de l'échantillon inadaptées à l'étude d'ARN. Une partie du chapitre suivant sera consacrée à la description d'une méthode efficace d'analyse d'ARNm à partir d'un échantillon de neurones olfactifs isolés par prélèvement à la pipette.

Chapitre II : Données expérimentales

Partie 1 : Matériels et méthodes

Modèle d'étude

Deux souches de souris transgéniques (MOR23GFP et M71GFP)

Chaque NRO n'exprime qu'un seul type de récepteur olfactif parmi un répertoire composé de 1200 gènes de récepteurs olfactifs (Mombaerts 1999). Cependant il nous est impossible de savoir quel récepteur est exprimé par un neurone donné. En l'absence de signe morphologique, il faut utiliser un subterfuge pour identifier les neurones porteurs d'un récepteur spécifique. Les neurones sont donc distingués par un indice biochimique. En effet, nous nous sommes servis de souris transgéniques avec la séquence d'ADN de la protéine « green fluorescent protein », (GFP) située en aval des récepteurs d'intérêts, MOR23 et M71. Ainsi, comme les séquences des récepteurs et de la GFP sont sous le contrôle d'un même promoteur, tous les neurones exprimant, MOR23 ou M71, co-exprimeront la protéine GFP.

La GFP est issue de la méduse, *Aequorea Victoria*. Cette protéine est utilisée dans plusieurs applications pour son rôle de rapporteur. La molécule est souvent modifiée dans le but d'augmenter son intensité (EGFP). Lorsqu'elle est utilisée dans des constructions transgéniques, les neurones exprimant suffisamment de la GFP sont fluorescents lorsqu'ils sont exposés à une source de lumière de 488 nm.

Les deux souches de souris transgéniques qui ont été utilisées durant mon travail de thèse ont été fournies par le Professeur Peter Mombaerts (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt, Germany) Les souches sont: MOR23-internal ribobome entry site (IRES)-tauGFP et M71(IRES)-tauGFP (Bozza, Feinstein et al. 2002; Vassalli, Rothman et al. 2002). Ces souches, ayant pour fond génétique un mélange 129 et C57BL/6, ont été employées afin de pouvoir suivre deux populations spécifiques de neurones (MOR23 et M71) co-exprimants le récepteur olfactif et la GFP. Ainsi il est possible d'analyser leur densité, de les isoler pour analyser l'expression des gènes et d'étudier leur physiologie.

Obtention de lignées transgéniques OR-IRES-tauGFP

Pour obtenir des lignées de souris coexprimant un RO et un marqueur tel la protéine GFP, une transgénèse ciblée par mutation fine (Knock in) a été réalisée (Bozza, Feinstein et al. 2002; Vassalli, Rothman et al. 2002). Brièvement, voici les étapes : Isoler un fragment d'ADN, 2) Ajouter une cassette de sélection floxée, 3) Transfecter des cellules totipotentes (exemple : cellules ES) par un vecteur contenant la construction d'intérêt appelée, transgène, 3) Sélectionner les cellules souches transfectées, 4) Introduire ces cellules transfectées dans des blastocystes et les transférer dans un utérus de femelle pseudogestante, 5) Croiser les souris chimériques et faire des PCR sur descendants pour vérifier la présence du transgène.

(Rq : l'élimination de la cassette de sélection (étant souvent la néomycine résistant au GA143) peut se faire, soit avant l'introduction des cellules ES dans le blastocyste par leur transfection à la recombinase, soit par croisement avec des souris exprimant la recombinase).

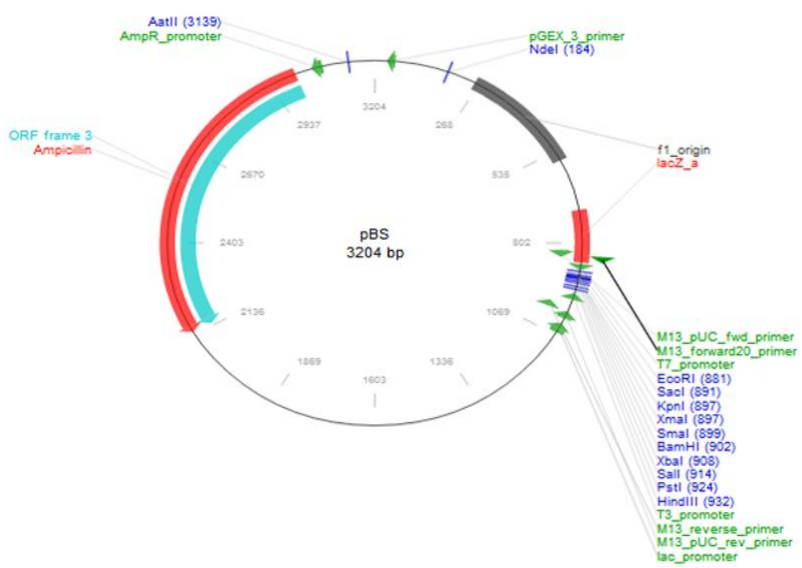
Souris MOR23 transgéniques (MOR23-IREStauGFP)

Pour la construction du transgène, un fragment génomique de 9,4 Kb comprenant le gène est isolé par l'utilisation d'un couple d'enzymes de restriction Sacl et Nhel qui coupent à 0,4Kb en amont du gène et à 1,7 Kb en aval du gène respectivement. Après recombinaison dans un plasmide (PBS) une cassette est ajoutée en aval du transgène. Elle comprend un site d'entrée aux ribosomes (IRES), un marqueur axonal fluorescent, tauGFP (Mombaerts 1996; Rodriguez, Feinstein et al. 1999) et un gène de sélection, à la néomycine (voir figure). Le vecteur recombiné est ensuite introduit dans des cellules souches (ES, E14) dérivées de souris 129P2/OlaHsd par éléctroporation et les clones transfectés sont sélectionnés. Les cellules souches transfectés sont ensuite injectées dans des blastocystes. Ces blastocyste sont transférées dans des utérus de femelles pseudo-gestantes (2,5 jours de gestation) C57BL/6J. Les descendants chimériques sont croisés entre eux puis les hétérozygotes avec des souris transgéniques EIIa Cre C57BL/6J (exprimant la recombinase) pour supprimer la cassette de sélection, néo. Une PCR est réalisée sur les descendants pour vérifier la présence du transgène et l'absence de néo. Les souris négatives pour le transgène Cre sont ensuite croisées entre elles. Le fond génétique des souris est le mélange suivant : **129** blastocyste X **C57BL/6J** cellules souches.

Souris M71 transgéniques (M71-IrestauGFP)

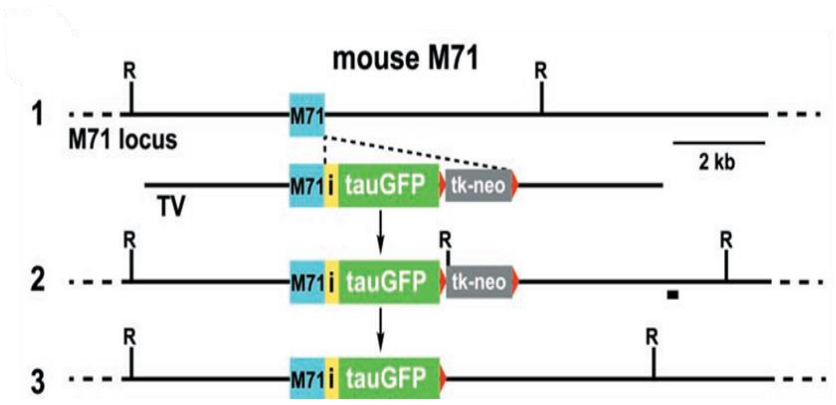
Le gène M71 est isolé par PCR à partir de souris 129. Le fragment d'ADN isolé de 9,2Kb est introduit dans un vecteur plasmidique de type PBS-SK (P Blue script II SK) (**figure 24**) par ajout d'un site de restriction PacI, 3 nucléotides en aval du codon stop. Une cassette IREStauGFP-LTNL (avec la séquence flanquante neo floxée) est ensuite ajoutée à la construction plasmidique. Le plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction, pmeI, pour son introduction par électroporation dans des cellules souches (E14) dérivée de souris 129P2/OlaHsd (Mombaerts 1996; Rodriguez, Feinstein et al. 1999). Après sélection au G418 (gancyclovir), les ES résistants après vérification par southern-blot sont transfectées par de la recombinase avant leur introduction dans des blastocyste qui sont ensuite transféré dans des utérus de femelles C57BL/6 pseudo gestantes. Les F1 chimériques sont croisées, et leurs descendants +/- (hétérozygote pour le transgène) avec des souris transgéniques EIIa Cre (recombinase) afin d'éliminer le marqueur de sélection. Les souris négatives pour le transgène Cre sont ensuite croisées entre elles. Le fond génétique des souris est le mélange suivant : **129** blastocyste X **C57BL/6J** cellules souches.

A-



http://www.addgene.org/vector-database/2017/

B-



Adapté de Bozza, T et coll 2002

Figure 24. Construction des transgènes OR-IresTauGFP.

A- vecteur plasmidique utilisé pour la construction des transgènes MOR23 et M71.

B- Différentes étapes de la construction du transgène M71IrestauGFPtKnéo. 1) Recombinaison du gène cible (M71) par le vecteur de ciblage (PBS-M71IREStauGFPtk-néo). 2-3) Suppression de la séquence tk-néo floxée par action de la recombinase.

Conditions d'élevage des souris

Les souris transgéniques sont mises en élevage dans l'animalerie de l'INRA-Dijon qui a un statut sanitaire E.O.P.S. (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Cette animalerie est agréée par la Direction Départementale des Services Vétérinaires pour l'élevage et l'expérimentation sur le rat, la souris et le hamster. Les souris nous sont livrées régulièrement dès l'âge de 6 semaines. Ainsi, dès leur réception, nous les mettons en couple dans l'animalerie (à statut conventionnel) du CSGA après une période de deux semaines d'adaptation. Les souris sont soumises à des conditions standard de température (22°C ±1°C) et d'humidité sous un cycle de lumière-obscurité de 12 heures et à un régime alimentaire *ad libitum*.

Dès la mise-bas, les nouveau-nés sont, soit exposés, soit maintenus sans exposition (groupe contrôle).

Exposition

Nombreux sont les paradigmes expérimentaux d'exposition à l'odeur (protocole d'exposition, concentration etc…) employés par des études disponibles en littérature. Par conséquent, afin d'établir notre protocole d'exposition, nous nous sommes:

1- Concertés sur un protocole où les résultats sont bien établis tant sur le plan fonctionnel que comportemental (Buonviso, Gervais et al. 1998; Rochefort, Gheusi et al. 2002; Mandairon, Didier et al. 2008) : le protocole consiste à exposer nos animaux pendant 21 jours à l'odeur pure par le biais d'une boule à thé.
2- Intéressés à déterminer les conséquences d'une perturbation du système olfactif durant sa période de maturation fonctionnelle : les neurones exprimant MOR23 acquièrent une maturité fonctionnelle à 21 jours (Lee, Tian et al. 2009).

D'ailleurs, lorsque l'activité de l'ensemble des populations de neurones olfactifs est bloquée ou sur-stimulée, la réponse physiologique des neurones exprimant MOR23 est modifiée (He, Tian et al. 2012). Que se passe-t-il lorsque l'on sur-stimule, de manière quasi-ciblée, la population des récepteurs MOR23?

Pour cela, dès la naissance, les souris sont exposées à une molécule odorante (Lyral ou Acétophénone) 1 heure par jour pendant 21 jours (période postnatale) (figure 26).

Les cages (dans lesquelles sont exposées les souriceaux) sont placées sous une hotte pour éviter toute exposition des autres souris de l'animalerie. Les dimensions des cages sont les suivantes : 30 cm de longueur, 17 cm de largeur et 14 cm de profondeur, soit un volume de 7140 cm3. Pour chaque exposition, un volume de 20µl de l'odorant est déposé sur un coton qui est ensuite encapsulé dans une boule à thé. Cette boule à thé est suspendue sur la grille de la cage. Et finalement, une cage est posée au-dessus afin de créer un espace clos (**figure 25**).

En considérant les molécules odorantes comme étant des gazs parfaits, nous pouvons déterminer la concentration par litre (en M/l) des odorants à travers la relation des gaz parfaits (PV = nRT). Cette relation relie la pression du gaz (en pascal), le volume occupé par le gaz (en m^3), le nombre de moles de gaz (n) et la température (en kelvin).

La constante des gaz parfaits R est égale au produit de la constante d'Avogadro ($1.602x10^{23}mole^{-1} \times 1.381x10^{-23} JK^{-1}$) et de la constante de Boltzman. **Elle vaut 8.314 en $J.mol^{-1}.K^{-1}$**

Dans les conditions normales, c'est-à-dire sous une pression de 1 bar (10^5pascal) et à une température de 273°K (25°C), les concentrations des odorants utilisés dans un volume de 1L sont :

- [$1,75.10^{-5}$] M/L pour l'acétophénone dont la pression de vapeur est de : $3,26.10^{-1}$ mmHg.
- [9,3.10-^{10}] M/L pour le Lyral dont la pression de vapeur est de : $1,74.10^{-5}$ mmHg.

Pour étudier les conséquences à long terme du protocole d'exposition sur la plasticité du système olfactif, nous laissons récupérer les souris pendant une période de 4 semaines. Elles sont ensuite sacrifiées (pour expérimentation) après administration de solution anesthésique (Kétamine 150 mg/Kg ; Xylazine 10 mg/Kg).

Figure 25. Procédure d'exposition.

A gauche : dispositif d'exposition ; à droite : installation de la cage sous une hotte lors d'une exposition

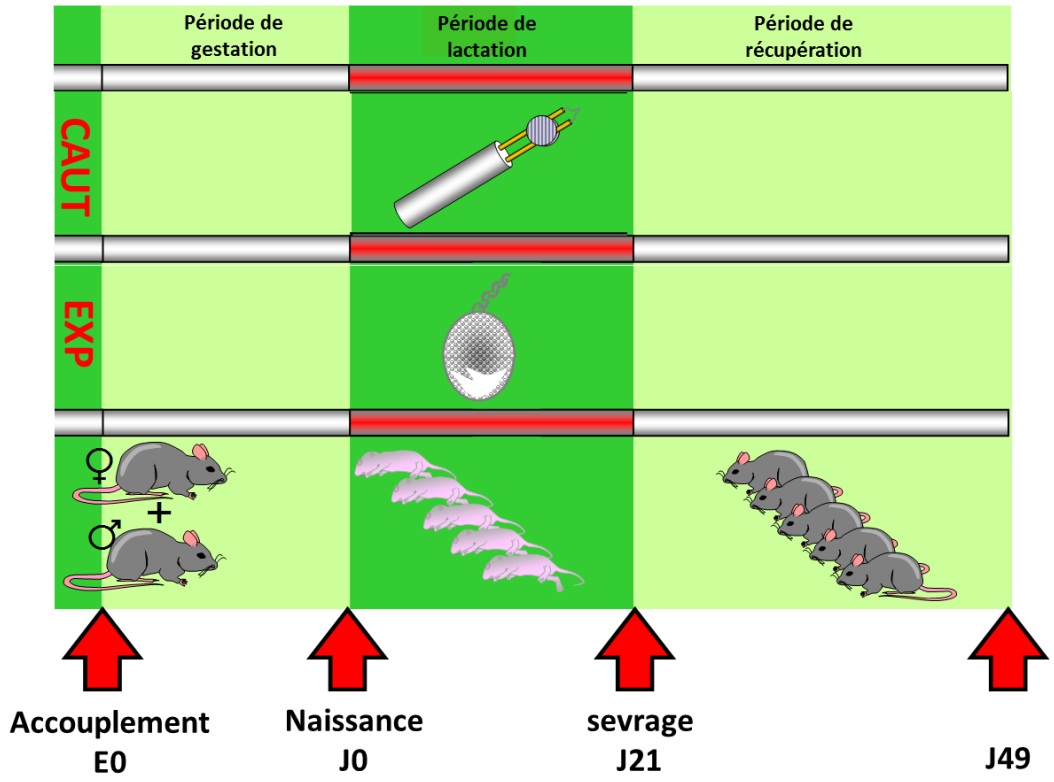


Figure 26. Diagramme montrant les deux types de traitements.

Dès la naissance (J0), soit les souris sont exposées (EXP) aux odorants (20µl Lyral ou Acétophénone), soit elles sont cautérisées le lendemain (CAUT). Après la période de lactation de 21 J (J21), elles sont, soit sacrifiées, soit laissées dans les cages pendant une période de récupération de 4 semaines. (Cadiou Hervé, pour dessin).

Dissection de l'épithélium olfactif (explant)

Seule la partie septale et dorsale de l'épithélium olfactif est prélevée. En effet, les analyses de biologie moléculaire serviront d'une part à conforter les résultats de comptage neuronal d'explants olfactifs, et d'autre part à apporter une explication sur les résultats observés.

Pour ce faire, après anesthésie, les souris sont décapitées et les têtes sont aussitôt immergées dans une solution RINGER (**tableau 1**) refroidie et oxygénée (95% O_2 et 5% CO_2). Ensuite, nous dégageons le septum par coupe longitudinale et disséquons l'épithélium olfactif (**figure 27**).

Substances	mM	Masse molaire (g/mol)	Masse (en g) pour 1000ml
NaCl	124	58,4	7,24
$CaCl_2$, $2H_20$	2	74,56	0,22
KCl	3	246,48	0,32
NaH_2PO_4 H_20	1,25	147,02	0,294
$MgSO_4$, $7H_20$	1 ,3	137,99	0,17
Glucose	15	84,01	2,18
$NaHCO_3$	26	180,16	2,18

Tableau 1. Tableau récapitulatif des produits ajoutés pour obtenir 1l de solution RINGER.

Le PH est ensuite ajusté à 7,5-7,6 avec du NaOH, l'osmolarité aussi à 305 mOsm avec du glucose.

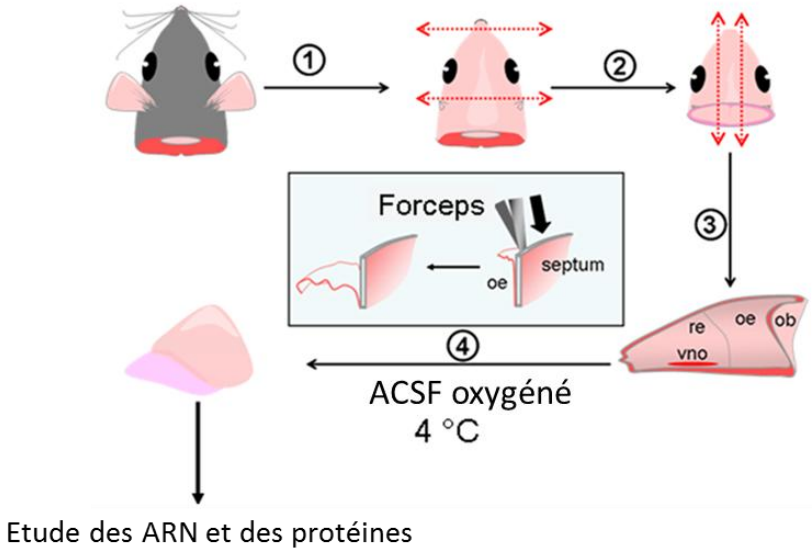


Figure 27. Schéma récapitulatif des étapes de la dissection (dessiné par Hervé Cadiou).

Etude des ARN

Choix des amorces

Pour sélectionner des amorces, il faut avant tout avoir les informations relatives aux gènes d'intérets (séquence codante, jonction exon-exon, nombre de transcrits alternatifs, région d'homologie entre les variants, etc...). Ces informations sont disponibles sur différentes bases de données telles, la "*National center of Biotechnology Information*" (NCBI) ou "*Ensemble gene*". Ensuite, il est possible de construire les amorces, via un logiciel comme "Primer Express", en prenant en compte les paramètres standards de la PCR en temps réel (qPCR) (taille des amorces, pourcentage de bases G et C, température d'hybridation etc...) et les critères de spécificité d'amplification par PCR (ex: séquence d'amorce qui couvre des jonctions exon-exon pour éviter la contamination par amplification d'ADN génomique, ADNg). Une fois les séquences construites, il faut vérifier leur spécificité à travers un logiciel disponible en ligne "Primer Blast". Si aucune homologie de séquence entre les amorces et les autres gènes de la souris n'est détectée, nous synthétisons les amorces. Les produits d'amplification de la qPCR sont séquencés et leur séquence est comparée avec celles disponibles en ligne grace à un un logiciel appelé "nucleotide Blast". Finalement, après avoir trouvé les conditions optimum de PCR (ex: témpérature d'hybridation des amorces,Tm), il faut déterminer l'efficacité des amorces et trouver des gènes de normalisation (**figure 28**).

Figure 28. Diagramme récapitulatif des étapes à suivre pour choisir des amorces de qPCR.

Construction des amorces

Les paires d'amorces, au nombre de huit, que j'ai construites durant ma thèse me permettront d'apporter une réponse à la problématique principale de thèse: quelles sont les conséquences de l'exposition sur le niveau d'expression d'ARNm des gènes de la cascade de transduction olfactive ainsi que des récepteurs olfactifs d'intéret (MOR23 et M71) au niveau des NRO- voir liste d'amorces - (**tableau 2**).

Méthode: Afin de construire des amorces, il faut d'abord trouver les séquences consensus codantes (CCDS) des gènes qui nous intéressent sur une base de donnée en ligne tel "*Ensembl genome*". Ensuite, grâce à un logiciel, nous pouvons sélectionner des couples d'amorces spécifiques à nos gènes d'intéret. Ces amorces choisies doivent empêcher les contaminations de PCR dues à l'ADN génomique (ADNg) et à l'auto-amplification des amorces.

Technique: En tapant des alias de gène , tel MOR23, sur la base de données des gènes de la "*National Center of Biotechnology Information"* (NCBI): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=mor23, nous obtenons le nom officiel du gène, olfr16. Ainsi, il est possible d'effectuer les recherches de CCDS (ADN complémentaire d'une région codante d'ARNm mature, dépourvu de séquences d'introns : (Pruitt, Harrow et al. 2009) sur la base de donnée « *Ensembl genome* » : http://www.ensembl.org/index.html. Toutefois, un choix judicieux des amorces ne peut se faire sans une solide connaissance de notre séquence d'intérêt de départ. En effet, certains gènes peuvent donner naissance à plusieurs transcrits alternatifs, c'est le cas de la phosphodiestérase 1c, impliquée dans la cascade de transduction du signal olfactif (8 transcrits alternatifs). Comme nous nous intéressons pas aux variants de transcription, notre choix d'amorces se fera sur des parties (exons) ayant des homologies avec d'autres transcrits alternatifs (**figure 29**).

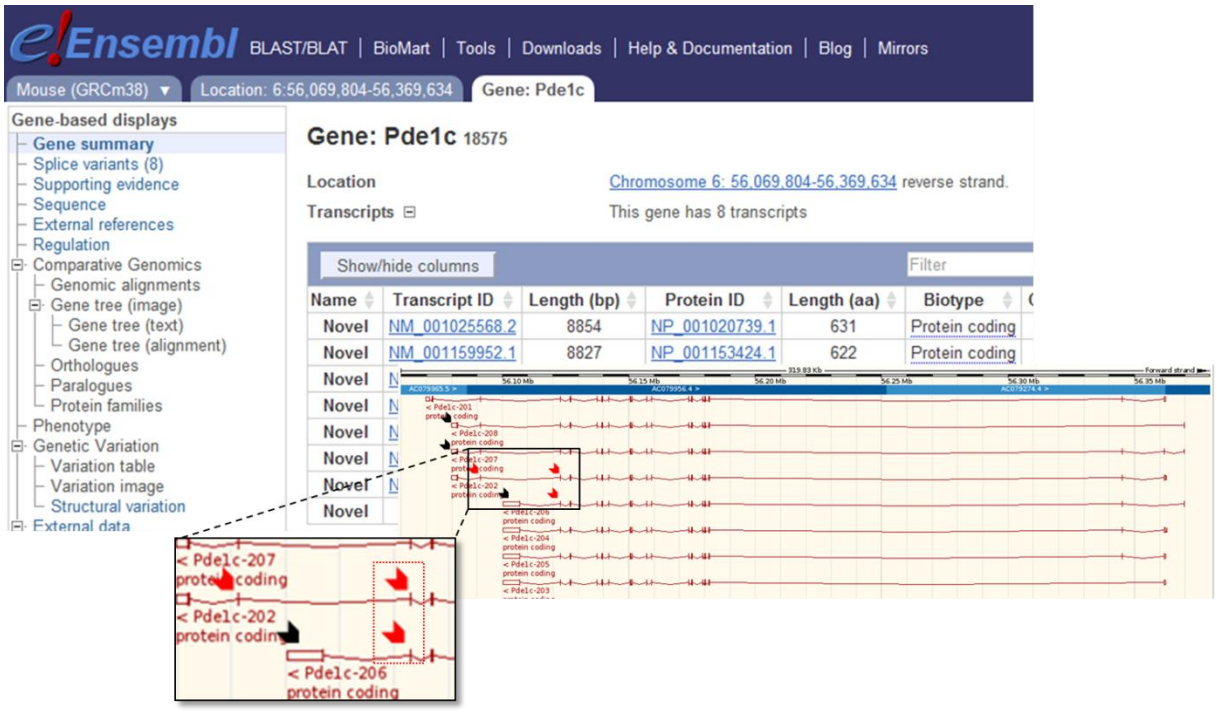


Figure 29. Présence de transcrits alternatifs pour un gène d'intérêt.

Il existe 8 transcrits codants du gène pde1c. Les transcrits sont constitués d'exons codants (flèches rouges) et d'exons non codants (flèche noires). Une amorce qui reconnaîtra le premier codon codant (flèche rouge) du 4ème transcrit, pde1c-202 (encadré noir) ne sera pas valide pour notre étude, puisqu'il ne reconnaîtra pas le transcrit pde1c-206. En revanche, une amorce reconnaissant le deuxième exon codant sera valide (encadré pointillé rouge).

Après exportation de la séquence CCDS vers un logiciel spécialisé dans la construction des amorces (primer express), il est possible de sélectionner la paire d'amorces parmi les amorces proposées par le logiciel. Les critères de choix sont basés sur la spécificité de reconnaissance des amorces. 1- les séquences oligonucléotidiques ne doivent reconnaitre que des séquences d'ADNc, autrement dit, elle doit chevaucher deux exons si possibles (les RO n'ont qu'un exon codant) (f**igure 30**) et ce, afin d'empêcher l'amplification de l'ADN génomique (même si notre échantillon est un peu contaminé). 2- Les séquences ne doivent pas s'auto-dimériser « *self dimer* » ou se dimeriser entre elles « *cross dimer* » pour éviter l'auto-amplification (**figure 31**). Les amorces proposées par le logiciel sont déterminées selon les critères standards de PCR (la longueur des amorces, %GC, Température de fusion des amorces, taille de l'amplicon) (**figure 32**).

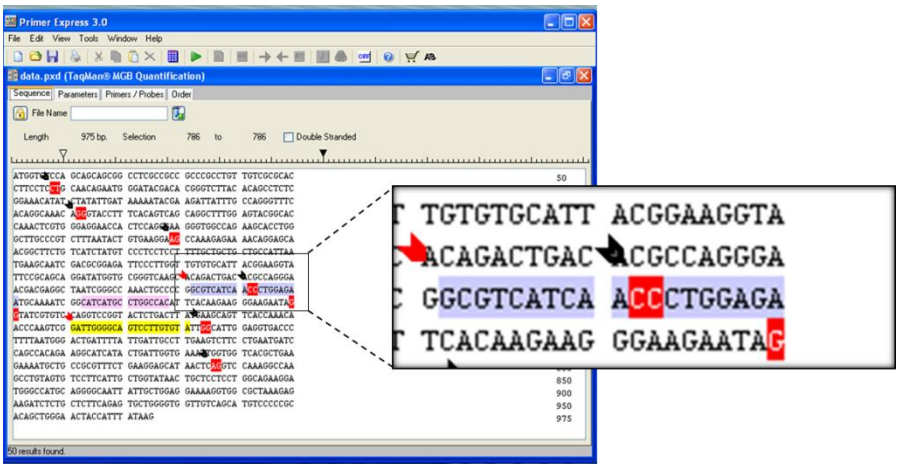


Figure 30. Construction d'une paire d'amorces (GAPDH – gène de ménage utilisé) via Primer Express 3.0.

Les flèches noires indiquent les jonctions exon-exon, les flèches rouges indiquent les séquences d'amorces. Ces paires d'amorces n'amplifient pas l'ADNg, car une des amorces (Amorces *forward* à droite) couvre une partie chevauchante exon-exon.

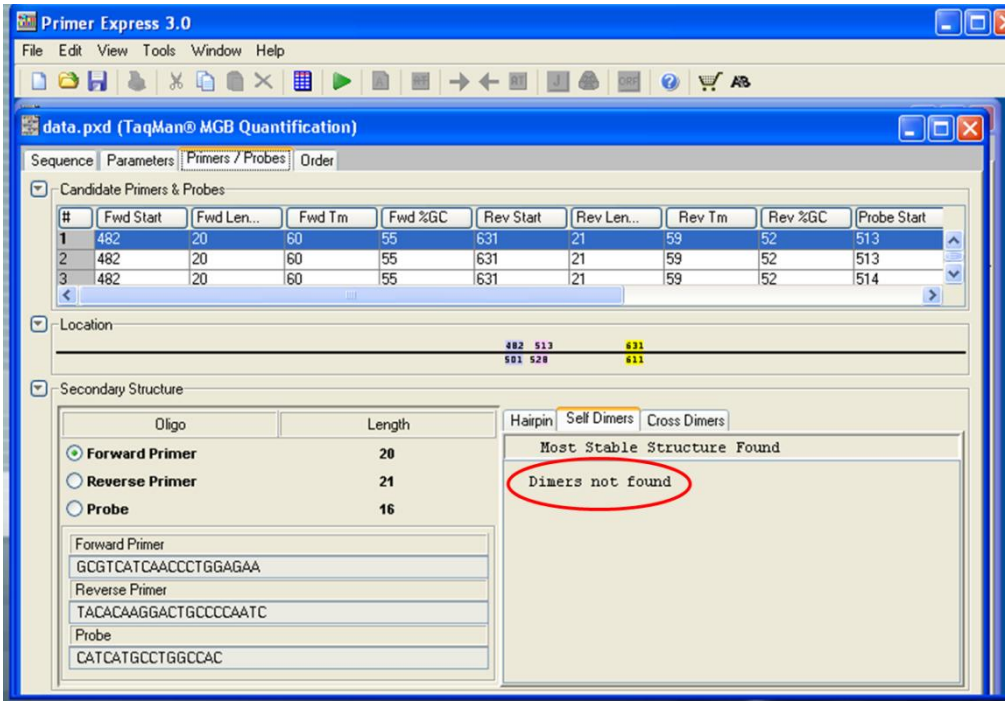


Figure 31. Vérification de la spécificité des amorces.

Ces paires d'amorces (GAPDH) ne s'auto-amplifient pas (encerclé en rouge), car il y a absence d'auto-dimère (ces amorces ne font ni « d'épingles à cheveux» ni de « cross dimers »)

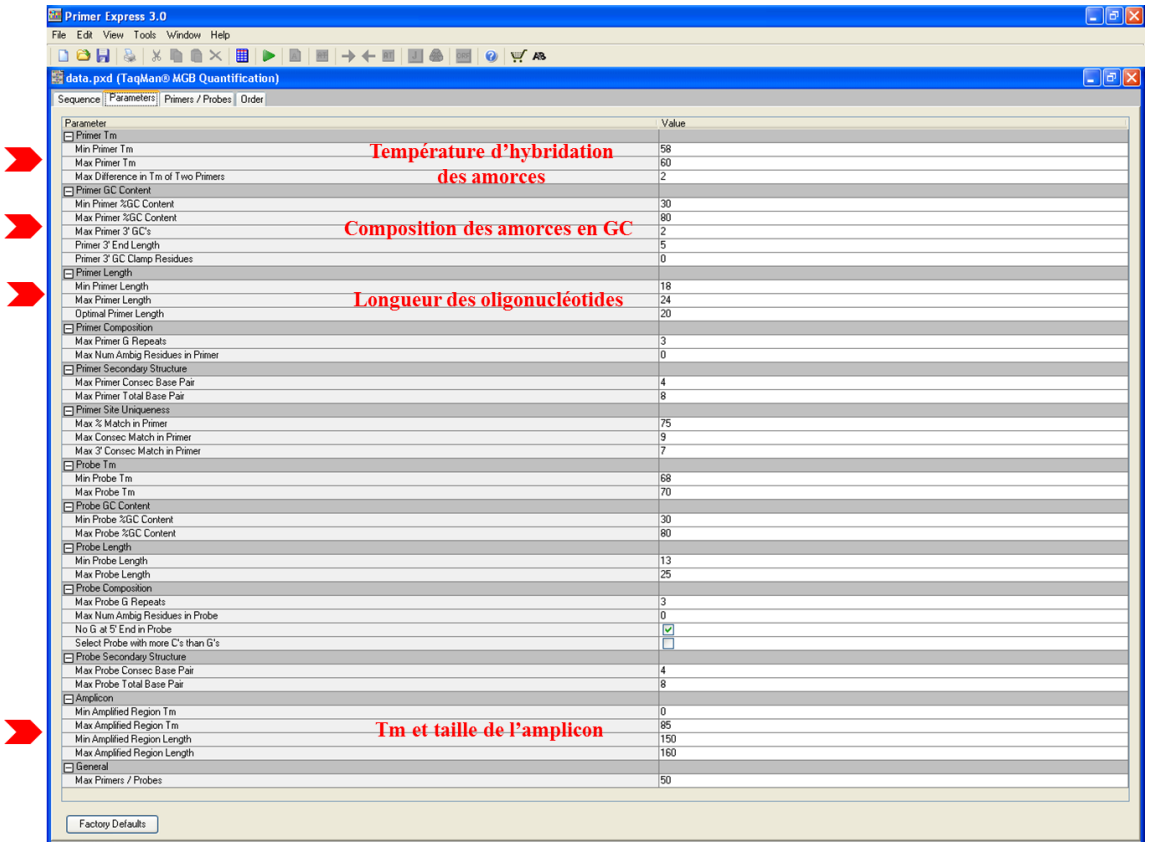


Figure 32. Paramètres de PCR pris en compte par Primer Express 3.0.

Les flèches rouges indiquent les principaux critères pris en compte par le logiciel dans la construction des amorces.

Alignement des amorces

Principe: La validation des amorces construites est une étape importante de l'étude des ARNs. En effet, cette étape permet de s'assurer de la spécificité des couples d'amorces choisis, c'est à dire qu'ils ne s'hybrident avec aucun autre ADNc, en l'occurence chez la souris.

Méthode: Pour se faire, il faut interroger une base de donnée des transcrits "*Ref seq mRNA*" et du génome "*Genome*" de la souris (mus musculus) sur le moteur de recherche "*primer Blast*" : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi. Techniquement, il suffit d'insérer les séquences d'oligonucléotides et de lancer la recherche de complémentarité de séquence entre le couple d'amorce et tous les transcrits présents chez la souris (**figure 33**).

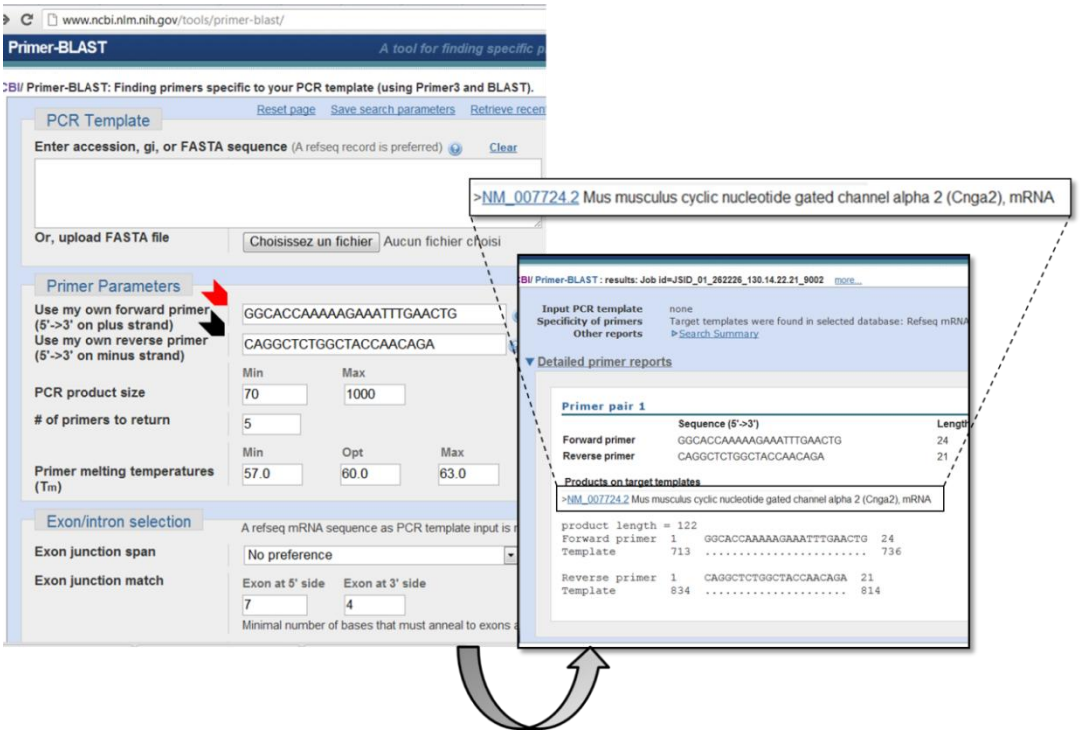


Figure 33. Vérification de la spécificité des amorces par interrogation de la base de données d'ADNc de souris via le programme Primer Blast.

Les séquences forward (flèche rouge) et reverse (flèche noire) des amorces de cnga2 construites sur primer express sont insérées et un lancement de recherche de complémentarité de base entre ces séquences et la base de données des transcrits et du génome de la souris est effectué. A droite, dans l'encadré noir, on peut s'apercevoir que nos amorces ne reconnaissent que les transcrits de la cnga2.

Après avoir validé "in silico" nos paires d'amorces, nous les commandons chez "Eurogenics" qui les synthétise (Voir séquences de toutes les amorces **tableau 2.)**

Target gene	Type	Sequence (5'-3')	Product lenght (bp)
adcy3 (ACIII)	**Forward**	AGGCGACTGTTACTACTGCATCTG	60
	Reverse	ACGTACGAGATGGCCTCTACCA	
Gnal (Golf)	**Forward**	CTTGGCAGGGAAGTCAAAAATC	109
	Reverse	GGCTGGTGCTGATCCTCAAGAA	
Cnga2	**Forward**	GGCACCAAAAAGAAATTTGAACTG	101
	Reverse	CAGGCTCTGGCTACCAACAGA	
GAPDH	**Forward**	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	77
	Reverse	CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAA	
OLF151 (M71)	**Forward**	CCATCTGTCAACCCTTGCTTTAT	157
	Reverse	TCAACATGAGGCCAGTCTCAAT	
OLF16 (MOR23)	**Forward**	CTTGTTGGTTTGTGGGTCTTTAGG	80
	Reverse	CAAAAGGGCAAATGGAACATG	
Suclg	**Forward**	GCGTCATCAACCCTGGAGAA	139
	Reverse	CTGCCCCAATCCGACTTG	
PDE1C	**Forward**	GTCCCAGCGTCGTGATTAGC	66
	Reverse	TCATGACATCTCGAGCAAGTCTTT	

Tableau 2. Séquences des amorces "Forward" et "Reverse" spécifiques aux ADNc d'intérêts.

Les noms officiels des gènes, ainsi que la taille des amplicons, figurent dans ce tableau.

Séquençage et alignement des produits de PCR

Principe: Blaster les séquences oligonucléotidiques *in silico* "via NCBI" est une étape indispensable dans le choix des amorces. Cependant, il est conseillé de séquencer le produit de PCR pour s'assurer de la spécificité de l'amplification.

Méthode: Après amplification de la séquence d'intéret par PCR en temps réel, nous déterminons la quantité d'ADNc par dosage "nanodrop" (**voir extraction des ARNs**). Un échantillon d'une concentration de 15ng/µl est envoyé à *Beckman Coulter Genomics* pour etre séquencé. Un volume de 10µl est nécessaire au séquençage (2 réaction/séquence) d'une seule séquence d'oligonucléotide.

Si les conditions de séquencages sont bonnes et si le produit de PCR ne contient pas de contaminants, nous recevons les séquences des amplicons (**figure 34**). Ces séquences sont à leur tour alignées dans *nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (**figure 35**) pour déterminer la présence de séquence de similarité entre le produit séquencé et les séquences d'ADNc de la souris: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Ainsi, tous les produits PCR des gènes d'intérêt de ce travail ont été séquencés et alignés. Tous nos produits de PCR sont spécifiques des gènes d'intérêt et exempt de contamination (voir les séquences des produits PCR dans **tableau 3**).

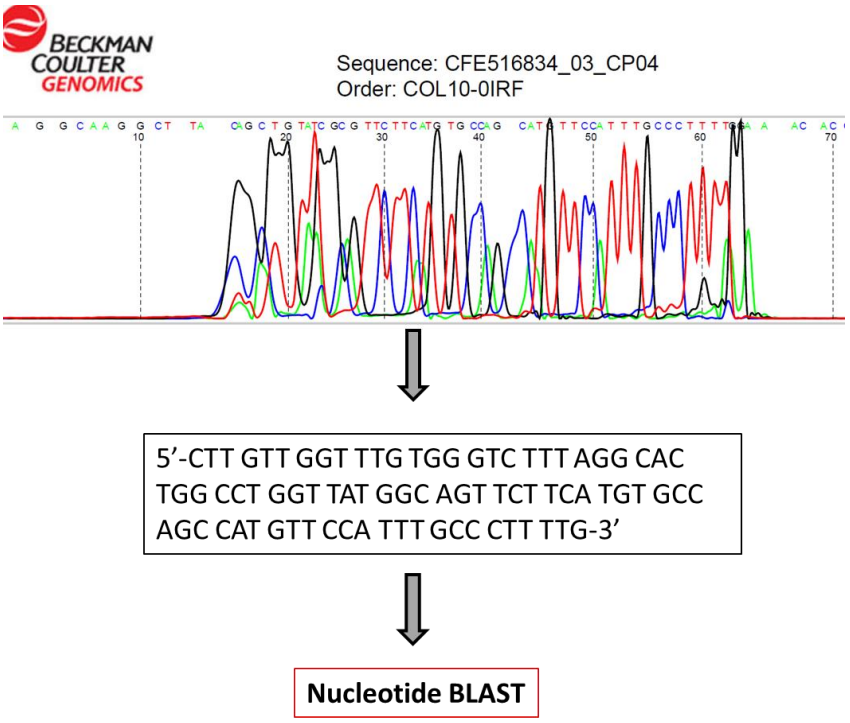


Figure 34. Représentation d'un électrophoregramme de produits de séquençage et de la séquence obtenue.

Le produit de séquençage est ensuite aligné sur *Nucleotide Blast.*

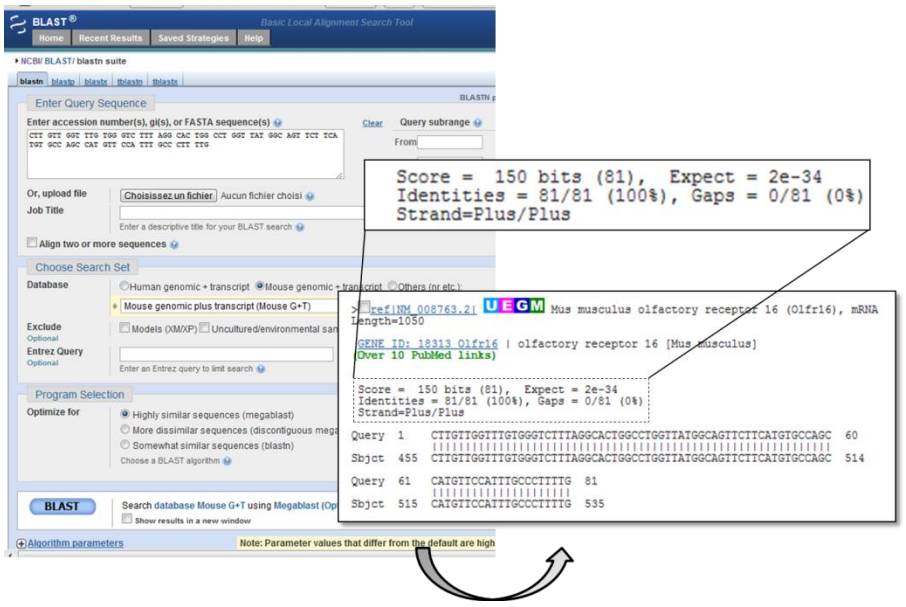


Figure 35. Exemple de produits de séquençage « blasté » sur *nucleotide Blast*: MOR23.

Le produit de séquençage est introduit, puis la base de données est intérrogée. A droite, on peut voir que 81/81 des nucléotides de la séquence du produit PCR de MOR23 sont complémentaires à celle de l'ADNc de MOR23. Nous avons une similarité de séquence de 100%.

Gènes	Séquence des produits de PCR (5'->3')
Olf151	AGG ATC TCA TGG CTC WGG CTC TCW GCW GGG WGG GCT TTW GTC TAT GCC GTA GGA CTC ATC GGT TCA GCA ATT GAG ACW GGC CTC ATG TTR AA
Olf16	CTT GTT GGT TTG TGG GTC TTT AGG CAC TGG CCT GGT TAT GGC AGT TCT TCA TGT GCC AGC CAT GTT CCA TTT GCC CTT TTG
Adcy3	TTA AAT GGA GCA ACG GGC ATG GTC CTC CCG GTA GTC AGG CAA GCC GCA GAT GCA GTA GTA ACA GTC GCC T
Cnga2	CCC TCT TTT CTT CTG GAG CTG TCA GTA CCG TAT GCT TGT TTG CAT TGC CAT GCC TGT TCT TTA CAA CTG GTG TCT GTT GGT AGC CAG AGC CTG ACC CCC AAG TCA CCT GAC TGC GCC CCC CCA CAT A
Golf	ATT TCG GGG ATG CCA TTA TAC TGT CCC TGA AGA TGC AAC ACC AGA TGC GGG AGA AGA TCC CAA AGT TAC AAG AGC AAA GTT CTT TAT CCG GGA TCT GTT CTT GAG GAT CAG CAC AGC CAA TGT
Pde1c	GGG CAT GAC AGA TGA GAC TGG CCA AGT GCA TGT TGC AAG GGG TGC ATC TTA AAG ACC CCT CTG ATT GAC TTG GCT GTA CTC TAG GGA GGT CTG TGG ACC AGG ATC ACT CCA ACA CCG GAA GAG GCA GGA GGA TCA CTC CAA CAC CGG AA

Tableau 3. Séquence des produits de PCR des gènes d'intéret (obtenus par séquençage).

La spécificité de toutes les séquence à été vérifiée sur Nucleotide BLAST.

Optimisation des amorces (Température d'hybridation)

Principe: La température d'hybridation (Tm) dépend de la composition en base de chaque oligonucléotide. Elle est calculée par la relation suivante: **2(A+T) +4(G+C).** Plus la Tm est élevée, plus la spécificité d'hybridation entre les paires d'amorces et leur séquence d'intéret est élevée.

Méthode: Pour ce faire, nous avons déterminé la Tm optimum de chaque paire d'amorces (**tableau 4**) en réalisant des gradients de PCR avec des fourchettes de températures variant en fonction des Tm de chaque amorce fournie par Eurogentec. A titre d'exemple, pour les paires d'amorces de: ACIII, Golf, CNGA2, ACTB et GAPDH dont leurs Tm "commerciales" sont comprises entre 48 et 52°C, nous avons fait des tests de gradients de PCR allant de 48°C à 58°C (**figure 36).** Les concentrations d'amorces utilisées sont de 250nM.

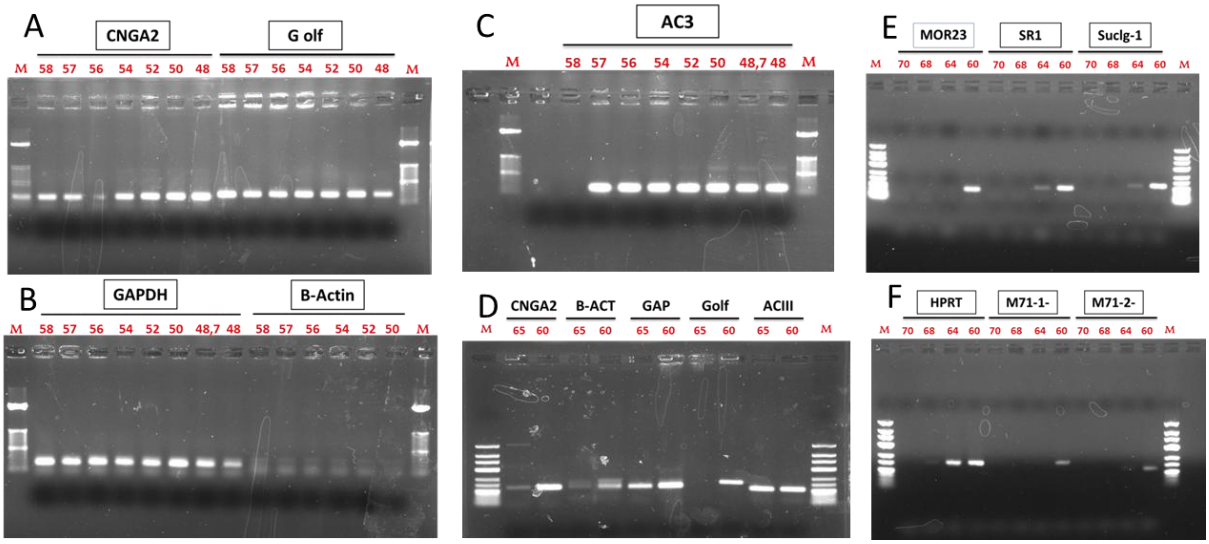


Figure 36. Optimisation de la Tm des amorces.

En (**A, B** et **C**), nous avons fait un gradient de PCR allant de 50°C à 58°C. Comme l'intensité des bandes n'est pas différentes entre les différentes Tm, nous avons testé deux températures plus élevées (60°C et 65°C) (**D**) Ensuite nous avons retenu les Tm pour lesquelles la bande n'est ni trop intense ni trop faible. Pour CNGA2, par exemple nous avons choisi la Tm intermédiaire entre 60°C et 65°C: soit 62°C. En (**E**) et (**F**) ont été déterminées les Tm optimum des autres amorces.

	CNGA2	ACTB	GAPDH	Golf	AC III	HPRT	M71-1	M71-2	MOR23	SR1	Suclg
Tm (°C)	**62**	**62**	**62**	**60**	**65**	**62**	**58**	**58**	**60**	**60**	**60**

Tableau 4. Température d'hybridation optimum d'amorces déterminées par gradient de PCR.

Test d'efficacité des amorces

Principe : L'efficacité d'une réaction de PCR, généralement notée (E) n'est pas toujours égale à 100%. Si E=100%, à chaque cycle on a 2n, par contre si E est différent de 100% on a alors (E+1)n. Cela signifie que, sur l'ensemble des cycles considérés comme quantitatif, tous les brins matrices ne servent pas forcément à donner une copie complète de l'amplicon. Deux phénomènes en sont les principales causes : 1- Tous les brins matrices ne sont pas forcément liés par un complexe amorce/polymérase lors de la phase d'hybridation. 2- Toutes les synthèses ne sont pas forcément complètes, notamment si la phase d'élongation est trop courte. Cette efficacité va donc dépendre des paires d'amorces employées. Ainsi nous avons déterminé l'efficacité des amorces utilisées durant mon travail.

Méthode : Nous avons préparé une gamme de dilution d'ADNc d'épithélium olfactif de souris (50 - 25 - 12,5 - 6,25 et 3,1 ng) et nous avons ensuite réalisé des PCR avec toutes les paires d'amorces. Dans le but d'identifier l'efficacité de PCR de chaque paires d'amorces, nous avons ensuite tracé la courbe : Ct = K log (concentration) + c avec K=pente. L'efficacité a ensuite été calculée par la relation suivante : $E= (10^{1/-K}-1) X100$ (**figure 37 et tableau 5**).

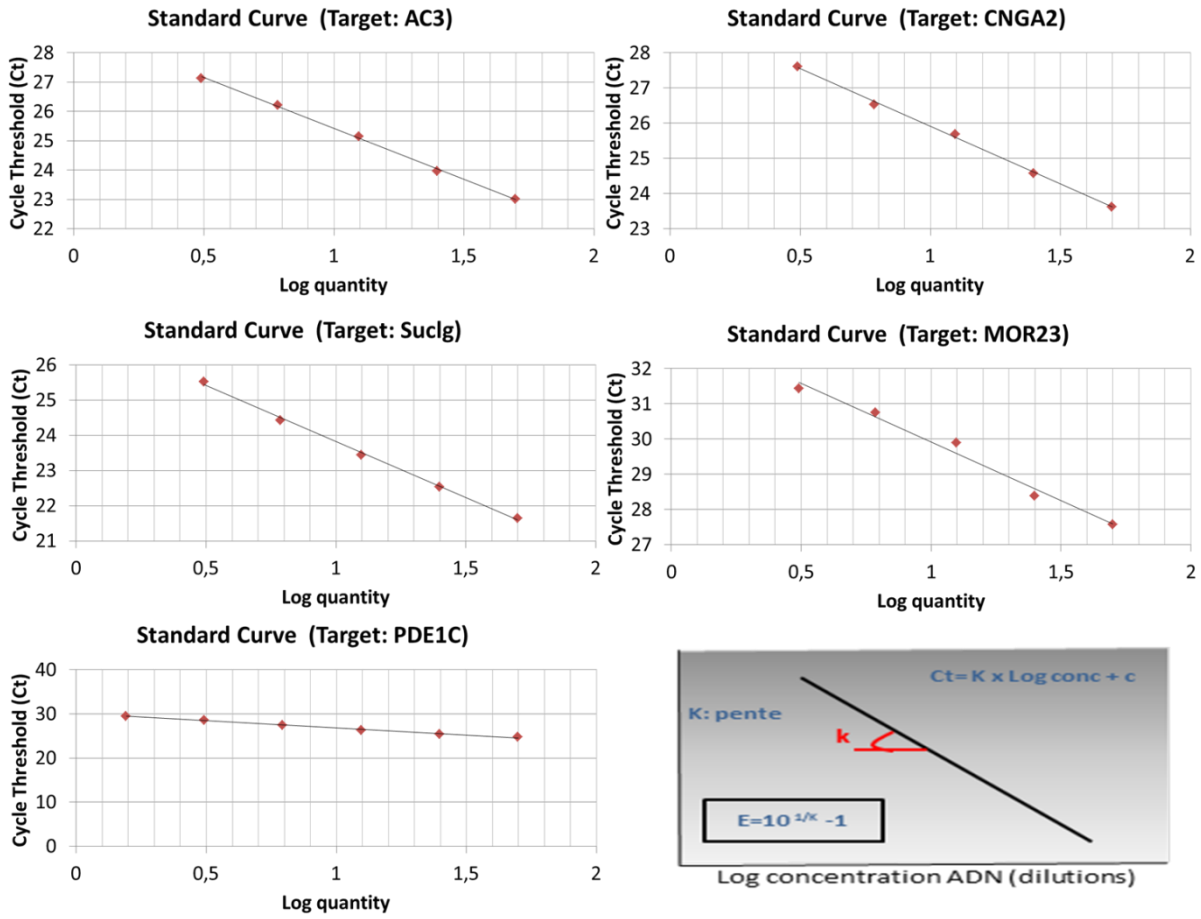


Figure 37. Courbes d'efficacité de PCR de toutes les amorces.

Amorce	R2	Pente (K)	$10^{(1/-K)}$	Efficacité (%)
MOR23	0,99	-3,33	1,99	99,6
AC3	0,99	-3,4	1,96	96,8
CNGA2	0,99	-3,28	2,01	101
PDE1C	0,99	-3,26	1,99	99,6
Suclg	0,99	-3,2	2,05	105

Tableau 5. Valeurs obtenues (Efficacités, corrélations et pentes).

Choix de normalisation et choix des gènes de normalisation

Principe : Le choix d'une normalisation appropriée représente l'un des aspects les plus importants de la RT-qPCR à prendre en considération. Il existe différentes stratégies. 1- La normalisation avec l'ARN total (par rapport à la quantité d'ARN total utilisée lors de l'étape de transcription inverse). Cependant, la quantification de l'ARN par cette technique n'est pas précise. 2- La normalisation avec le nombre de cellules. Cependant le rapport entre la quantité d'ADN et le nombre de cellules peut être variable. 3- La normalisation avec des gènes de références. La normalisation par rapport à un gène de référence est la plus couramment utilisée. Les gènes de références sont un groupe de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité de la cellule. Pour valider une expérience de RT-qPCR, il est recommandé de normaliser les Ct des gènes d'intérêts par au moins deux « gènes de normalisation » dont l'expression d'ARN ne varie pas quelles que soient les conditions testées.

Méthode : J'ai réalisé des qPCR sur 12 conditions (incluant : l'exposition postnatale au Lyral et à l'acétophénone ainsi que des souris non exposées) avec 4 paires d'amorces : HPRT, Sucl-g, Beta-Actine et GAPDH. Après avoir mesuré les Ct de chaque amplification, j'ai tracé une boîte à moustache indiquant les variations des Ct (les paramètres de dispersion représentés sont : min, Q1, médiane, Q3, médiane, moyenne et max) (**figure 38**). Pour la qPCR sur tissu olfactif, je n'ai retenu que les amorces correspondantes aux plus faibles variations (Suclg, hprt et gapdh). L'amorce de la β-actine n'a pas été retenue car elle a une valeur maximale éloignée de la médiane.

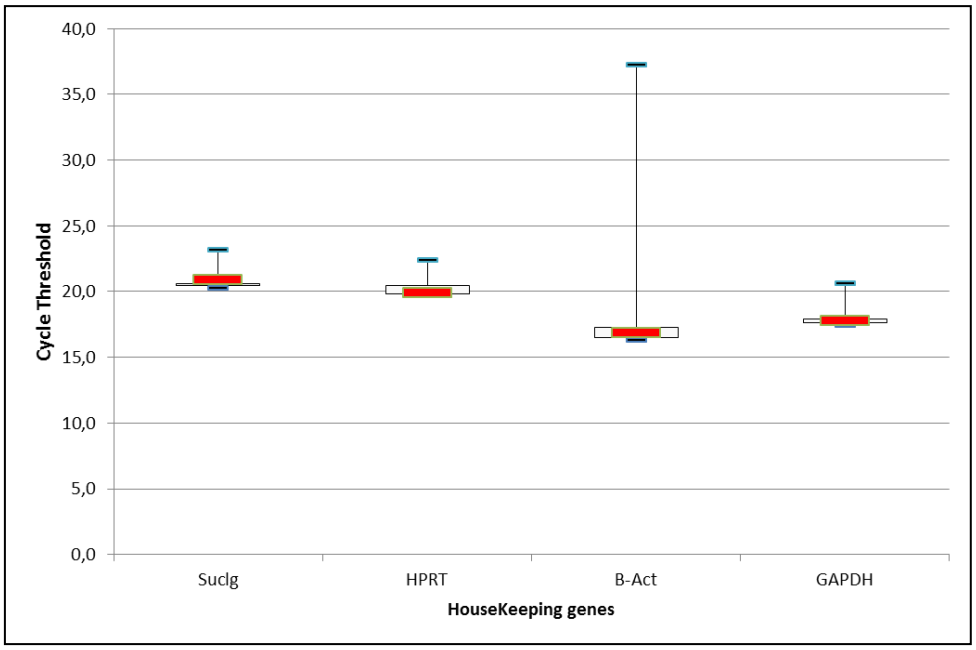


Figure 38. Validation des gènes de normalisation.

Boîte à moustache représentant les variations des cycles seuils (Ct) mesurés avec différentes amorces (Suclg, HPRT, B-Act, GAPDH). Les Ct ont été quantifiés par RT-qPCR à partir des 12 conditions expérimentales. La distribution autour des médianes (boîte rouge) est assez homogène entre les amorces (Suclg, HPRT, β-Actine et GAPDH).

Modèle de calcul

La concentration initiale d'une cible est généralement dérivée de son Ct (cycle threshold), qui correspond au nombre de cycles d'amplification où la courbe d'amplification croise la ligne seuil. Cette ligne est placée au niveau de la phase exponentielle, de façon à se distinguer clairement du bruit de fond. Pour chaque échantillon analysé, les CT obtenus pour les gènes d'intérêt et de référence doivent être convertis en ratio d'expression normalisé.

Pour cela, il existe plusieurs méthodes de calcul, dont deux couramment utilisées : la méthode du ΔΔ**Ct** et le modèle de **Pfaffl**.

La méthode de ΔΔCt utilise une formule arithmétique pour calculer le ratio d'expression d'un gène cible entre deux échantillons en normalisant avec un gène de référence. Tout d'abord il faut déterminer les différences de Ct (ΔCt) des gènes cibles des échantillons et des contrôles :

ΔCt (éch) = Ct (cible éch) –Ct (référence éch)

ΔCt (cont) = Ct (cible cont) – Ct (référence cont)

Ensuite, nous pouvons calculer individuellement les $2^{-\Delta Ct\ (ech)}$ et $2^{-\Delta Ct\ (cont)}$. Enfin, le ratio $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nous permet de déterminer les niveaux relatifs d'ARNm de chaque gène cible.

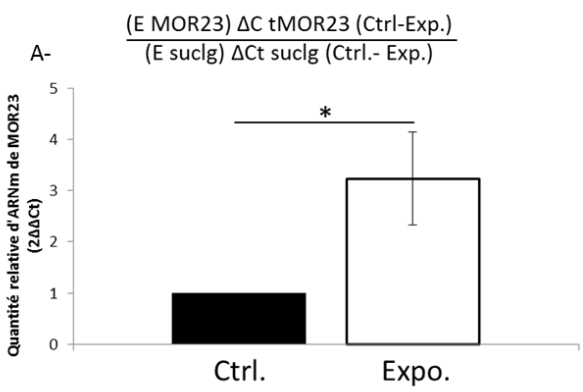
En outre, une différence d'efficacité de PCR entre les gènes cibles et le gène de référence génère une erreur pour le ratio d'expression. Pour cela, il existe des modèles qui prennent en compte l'efficacité de PCR du gène cible et du gène de référence. Le plus répandu est le modèle de Pfaffl. Ce modèle se base sur l'équation suivante :

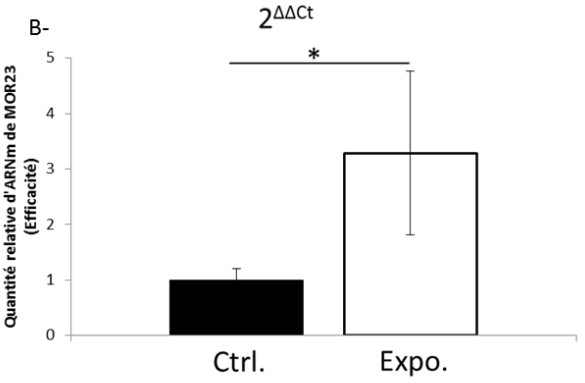
$$R = [(E\ cible)^{\Delta Ct\ cible\ (contrôle\text{-}échantillon)}] / [(E\ ref)^{\Delta Ct\ ref\ (contrôle\text{-}échantillon)}]$$

R = ratio d'expression relative d'un gène cible entre un échantillon et un contrôle.

Afin de vérifier si l'efficacité de PCR modifie nos résultats d'analyse des gènes (dont les efficacités sont proches de 100% (tableau5)) par qPCR sur cellules uniques, nous avons analysé, le gène MOR23 par le modèle de Pfaffl.

Malgré une différence d'efficacité de 6% entre le gène MOR23 et le gène suclg, les résultats de qPCR entre les deux méthodes d'analyse varient à 1,54% près (Ctrl n=5 et Exposés n=5) (**figure 39**).





C-

		Ctrl	Expo
EFFICACITE	RQ	1	3,23
	SD	0	0,90
$2^{\Delta\Delta Ct}$	RQ	1	3,28
	SD	0,2	1,4

Figure 39. Analyse de l'expression de l'ARNm de MOR23 par différentes méthodes de calcul.

A-Analyse par le modèle Pfaffl. **B**-Analyse par la méthode ΔΔCt. **C**- tableau des valeurs des quantités relatives (RQ) et des écart-types (SD). (* : P<0,05).

Les autres gènes cibles, qui varient significativement, ont une efficacité quasi identique (MOR23 : 99,6% ; PDE1C : 99,6% ; PDE1C : 101%). Il ne m'a pas semblé indispensable de les analyser par le modèle de Pfaffl.

Extraction et dosage des ARNs

Après avoir choisi les amorces nécessaires à l'analyse des gènes d'intérêt par qPCR, l'étape suivante consiste à extraire les ARNs à partir d'épithélium olfactif de souris. Pour chaque souris, les épithéliums olfactifs sont récoltés dans des tubes (RNase free) contenant des stabilisants d'ARN (RNA later) ou dans des tubes (vides) aussitôt immergés dans de l'azote liquide. La dernière technique est la meilleure façon de protéger les ARNs contre la dégradation (Fleige, Walf et al. 2006). Les tubes sont ensuite congelés à -80°C. Ils sont décongelés postérieurement pour l'extraction d'ARN selon le protocole suivant :

Principe :

L'extraction des ARNs est réalisée à l'aide de colonnes d'extraction RNeasy (Kit RNeasy mini Plus ^{TM} Quiagen). Ce kit contient un tampon dénaturant (composé notamment d'isothiocyanate de guanidine) qui assure l'intégrité des ARNs lors de la lyse des tissus et de la dissolution des composés cellulaires. Le passage du lysat dans la colonne RNeasy (ayant une affinité pour l'ADNg) sépare l'ARN de l'ADNg. L'extraction sur colonne est une alternative à l'extraction par phénol-chloroforme qui est un composé toxique.

Méthode :

Après avoir décongelé les tissus, l'addition de 600 µl d'un tampon inactivateur de la RNase tissulaire (RLT PLUS, contenant 3 µl de tampon Dx et 6µl de β-mercaptoéthanol), l'ajout d'une bille métallique RNase free et une agitation au « tissu Lyser » ($20H_z$, 2 X 2min) permettent de libérer le contenu cytoplasmique, de l'homogénéiser et de conserver l'intégrité des ARNs. On élimine ensuite les débris cellulaires par centrifugation (14000 rpm, 3min) et on récupère le surnageant contenant les composés cytoplasmiques dont les ARN totaux.

On charge ensuite le lysat sur une colonne (gDNA eliminator spin column) qui retiendra l'ADNg. Aux ARN totaux récoltés dans le tube, est ajouté 1 volume équivalent d'éthanol 70% (soit environ 600µl). L'action combinée de l'éthanol et des agents chaotropiques permet aux ARNs d'être adsorbés spécifiquement sur la membrane de la colonne constituée de silice.

Afin d'éliminer les contaminants et pour ne garder que les ARNs, on charge les colonnes (RNeasy column) et on centrifuge (10 000 rpm, 10 min). Après lavages successifs par l'addition de deux tampons (riches en agent chaotropique) et centrifugations, respectivement 700µl de « RW1 » (10 000 rpm, 10 min) et 500µl de « RPE » (10 000 rpm, 10 min) (qui éliminent les protéines et l'ADN résiduel), les ARNs sont élués dans un volume de 15µl d'eau RNase free.

L'ARN étant instable, principalement l'ARN messager, il importe de prendre des précautions durant l'étape d'extraction et de purification surtout pour une conservation des ARNs à long terme. Les mesures à prendre sont les suivantes (Fleige and Pfaffl 2006):

1- Echantillon dépourvu en protéines (estimation par le ratio DO_{260nm}/DO_{280nm}).
2- Echantillon dépourvu en ADNg.
3- Echantillon dépourvu en enzyme inhibiteur de la PCR.
4- Echantillon dépourvu en cation divalent Ca^{2+} et Mg^{2+} (cofacteurs de nucléase).
5- Echantillon dépourvu en nucléase.

Pour cela, avant de conserver les ARNs ou de réaliser la PCR, il est important de vérifier la qualité des ARNS. La quantité et la qualité des ARNS sont évaluées par dosage au Nanodrop (Thermoscientific, Delaware USA). Les ratios calculés, DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} donnent respectivement une estimation de la contamination protéique et des composants organiques. Tous les échantillons ayant un ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} supérieur à 1,8 ont été retenus. En effet ce ratio est considéré comme étant un indicateur de bonne qualité d'ARN (Ho-Pun-Cheung, Bascoul-Mollevi et al. 2009).

Contrôle de l'intégrité des ARNs

Principe : A ce jour, il est bien connu que la qualité et l'intégrité des ARNs ont une influence directe sur la validité et la fiabilité des résultats de PCR quantitative. En effet, l'étape de vérification de l'intégrité des ARNs est cruciale avant toute PCR quantitative, comme le souligne les dernières recommandations de qPCR « MIQE guidelines » (Fleige and Pfaffl 2006).

Après séparation des ARNs par chromatographie micro-capillaire (sur puce permettant d'analyser 12 échantillons) (**figure 40**) et après détection des bandes ribosomiques 28S et 18S (indicateur d'intégrité d'ARNs), le logiciel (technologie Agilent) dont nous disposons attribue une note allant de 1 à 10 à nos échantillons. Plus la bande est proche de 1 et plus les ARNs

sont dégradés, à l'inverse plus le numéro est proche de 10 et plus les ARNs sont intacts et donc retenus pour la PCR.

Méthode : Suite au nettoyage des électrodes de la station expérion (800µl de tampon de lavage et deux fois 800µ d'H2O traité à la DEPC), on lance l'amorçage de la puce, après avoir déposé un puit 9µl de matrice de séparation, combinée à un marqueur d'ARN« GS » (préparation de GS : 1µl « RNA stain » dans un volume de 65µl de gel filtré).

Une fois la puce amorcée, nous déposons dans un second puit « GS » 9µl de marqueur d'ARN « GS », 9µl de matrice de séparation filtrée « G » dans un autre puit « G », 5µl de tampon de charge dans le puit « L » et dans tous les autres puits, 1µl de marqueur de taille (pour déterminer la taille des bandes d'ARN) dans le puit « L » et finalement 1µl de chaque échantillon dans les 12 puits, avant de lancer l'électrophorèse. Une fois que la séparation électrophorétique est terminée, le logiciel mesure l'intensité des bandes 5S, 18S et 28S et les représente sous forme de courbe (**figure 41**). Théoriquement, un échantillon de bonne qualité est représenté par une hauteur du pic 28S faisant deux fois celle de 18 S. Le logiciel fourni avec la station Expérion permet en revanche, grâce à des algorithmes, d'analyser les courbes et d'attribuer un indice d'intégrité des ARNs, appelé RIN « *RNA Integrity Number* », allant de 1 à 10. Tous les échantillons dont les RIN excédent 9 sont retenus pour l'analyse PCR.

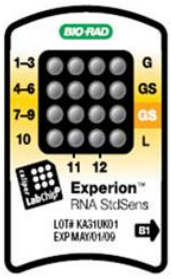


Figure 40. Puce de Biorad pour électrophorèse micro-capillaire.

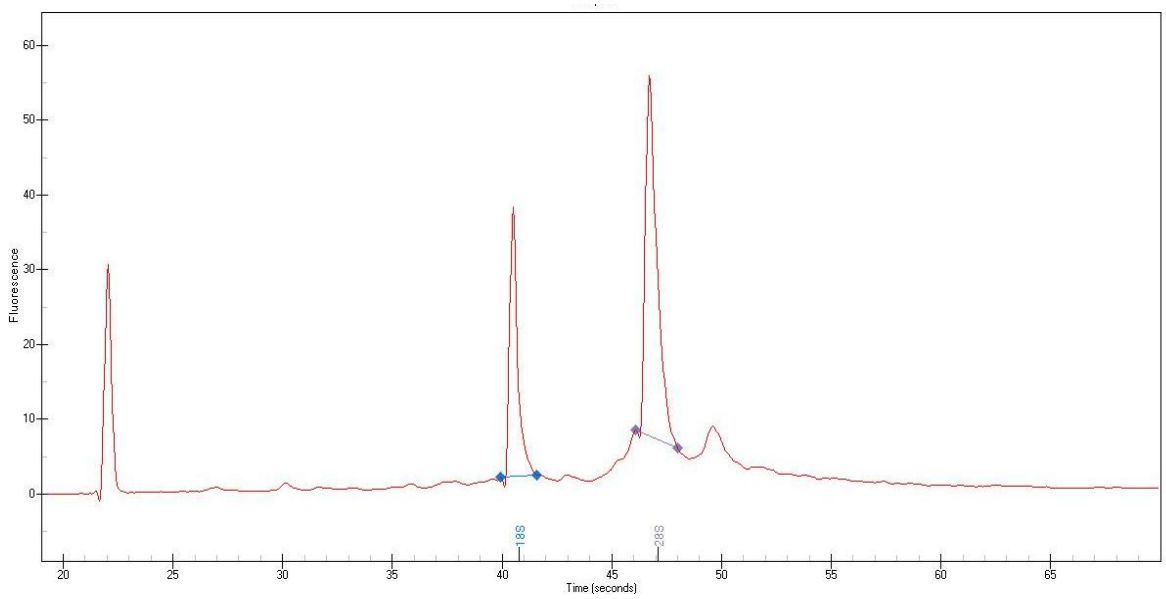


Figure 41. Chromatogramme d'une électrophorèse micro-capillaire**.**

Cette courbe a été obtenue à partir d'ARN totaux d'épithéliums olfactifs de souris MOR23GFP contrôle âgées de 21 jours. Le pic 28 S est plus grand que le 18S. Le RIN est de 9.

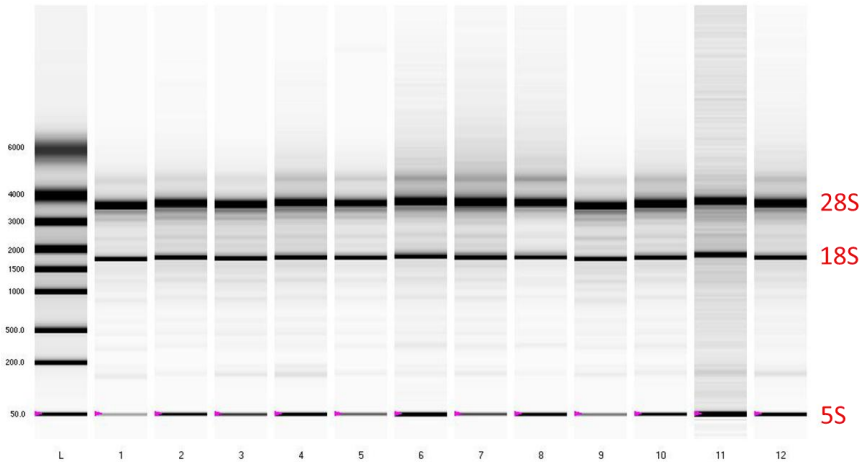


Figure 42. Electrophorégramme obtenu par puce micro-capillaire montrant les bandes 28S (~ 4000 pb), 18S (~ 1700pb) et 5S (~ 50pb).

12 échantillons d'ARNs issus d'épithéliums olfactifs de 12 souris ont été déposés dans les puits. L= « ladder » ou marqueur de taille.

Nous avons vérifié l'intégrité des ARNs extraits et purifiés à partir d'EO de 12 souris conservées de deux manières distinctes (RNA later ou azote liquide) à des dates différentes. Nous avons remarqué que les 12 échantillons présentaient un RIN au-dessus de 9. Comme nous pouvons le voir sur l'electrophorégramme (**figure 42**), les bandes 28S sont plus intenses que les 18S, attestant une bonne qualité des ARNs. Ainsi, nous avons conclu qu'il n'était plus nécessaire de vérifier l'état d'intégrité des ARNs à chaque fois.

Transcription Inverse (Tissu entier)

Principe :

La technique de transcription inverse (Reverse Transcription, RT) permet d'obtenir, à partir des ARNs extraits, l'ADN complémentaire correspondant.

Méthode : Avant de réaliser la transcription inverse, nous digérons les échantillons d'ARNs à la DNase recombinante de crevette « usb® » (qui a la particularité de ne reconnaitre que les doubles brins d'ADN) pour éliminer toute trace éventuelle de contaminants d'ADNg. La DNase est ajoutée aux 500ng d'ARNs, à raison d'une concentration finale de 0,13 unité/µl (le tampon de la DNase est constitué de 40 mM de Tris-Hcl pH=8 et de 14mM de MgCl2). Les tubes sont ensuite chauffés pendant 10 minutes à 37°C. Ce sont les conditions optimales pour la destruction de l'ADNg de nos échantillons.

Après avoir refroidi les tubes à une température de 4°C (dans de la glace), le mélange réactionnel contient (pour 10 µl) un volume d'échantillons correspondant à 1 µg d'ARN, 1 mM de dNTP, 50ng de random hexamers (fournis avec le kit) et de l'eau RNase free qsp. 10µl.

Ce mélange est chauffé à 65°C pendant 5 min (la DNase I est désactivée à cette température).

Après avoir refroidi la solution (1min, 4°C), 10 µl d'un mix sont ajoutés. Ce mix contient : 2µl de tampon RT 10X, 4µl de MgCl2 à 25mM, 2µl de DTT à 0,1M, 1µl de RNase OUT (40U/µl) et 1µl de Superscript III (200U/µl). 1µl de reverse transcriptase (fourni par le kit), 2 µl de tampon 1X (fournis avec le kit). Tous les réactifs sont fournis par le kit Invitrogen.

La réaction de transcription inverse nécessite une incubation à 50°C pendant 45 min, puis une incubation à 55°C pendant 15 min et une dernière incubation à 70°C pendant 15 min.

qPCR : Quantitative polymérase Chain réaction (tissu entier)

Principe : La PCR permet une amplification de l'ADNc grâce à des amorces sens et anti-sens spécifiques des gènes étudiés (tableau 2). Chaque cycle de PCR comporte une étape de dénaturation de l'ADN double brin (95°C, 3 secondes), une étape d'hybridation des amorces à l'ADN simple brin (température d'hybridation), une étape d'élongation (60°C, 30 secondes). Le "Sybr Green" est un agent intercalant fluorescent qui se lie préférentiellement sur l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Sa fluorescence augmente de mille fois lorsqu'il est lié à l'ADN, ce qui permet d'obtenir un signal fluorescent proportionnel à la concentration en ADN. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle. Le microspectrofluorimètre couplé à l'appareil (StepOnePlus™Applied Biosystems, CA) permet de quantifier cette fluorescence.

Méthode : Après la transcription inverse, sont déposés dans chaque puit de la plaque de qPCR, 2µl de produit RT et 18µl de SSO Fast Eva Green supermix qui contiennent les amorces à une concentration finale de 250 nM (fourni par BIO-RAD). Les températures suivantes ont été appliquées aux plaques pour les réactions de qPCR (95°C, 20S et 40 cycles d'amplification [95°C, 3s et 60°C, 30 s] et finalement 65°C-95°C pour la courbe de fusion. Chaque reaction est effectuée en duplicata dans une plaque 96 puits. Deux gènes de référence (recommandé par *MIQE Guidelines*) fortement exprimés (ici le Suclg et le GAPDH) doivent être utilisés afin de normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en CT (Cycle threshold). Il faut ensuite soustraire aux moyennes des duplicats de chaque échantillon la moyenne obtenue pour le gène référent.

qPCR sur plaque customisée Taqman.

Principe: La PCR en temps réel sur plaque customisée par technique TaqMan permet d'analyser plusieurs gènes d'intérets sans avoir à valider les amorces (elles sont déjà validées par *Applied Biosystem*). De plus, la sonde TaqMan combinée aux amorces "*TaqMan gene expression assay*" augmente la spécificité d'amplification des ADNc par PCR en temps réel. Le choix des TaqMan genes expressions assays se fait sur le site d'applied biosystem: http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-probe-based-gene-expression-analysis/taqman-gene-expression-assay-selection-

guide.html qui propose plus de 182000 paires d'amorces différents couplées à une sonde TaqMan (TaqMan Genes expressions assays).

Méthode:

Dans chacun des puits des plaques livrées, se trouvent lyophilisées deux amorces et une sonde TaqMan spécifique du gène d'intéret ou des controles endogènes. Ensuite nous additionnons dans chacun des puits 5µl d'échantillon (10ng d'ADNc) et 5µl de "*Fast Master Mix TaqMan 2X*". Ainsi le volume réactionnel de qPCR est de 10µl.

Profile de thermocyclage (qPCR) : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 20 secondes et 40 cycles de PCR (95°C pendant 3 secondes, 60°C pendant 30secondes).

Analyse des données: Les données sont ensuites analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse de qPCR "data Assist v 3.01" qui se base sur la modèle $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak 2008). Les valeurs sont représentées, soit sous forme de "Heat Map", "Volcano Plot" ou "RQ Plot". Ce logiciel réalise les traitements statistiques des données et fixe un seuil de significativité $P<0,05$.

Etudes des ARNs sur cellules isolées

Afin de réaliser une qPCR sur une cellule ou sur une population de cellules, il faut, soit extraire tout son contenu (ce qui est difficilement contrôlable) soit la cellule. Le challenge est de prélever toute la cellule uniquement. Trois méthodes d'isolement se présentent à nous: 1- prélèvement par pipette de patch, 2- prélèvement par microdissection laser et 3- tri cellulaire par cytométrie en flux.

J'ai consacré une grande partie de mon temps à développer un outil efficace d'isolement de cellules. L'ensemble des protocoles établis sera décrit pour les différentes tentatives de prélèvements.

Dissociation de l'épithélium olfactif et prélèvement par pipette de patch

Principe: Il s'agit de digérer les trames protéiques reliant les cellules de l'EO à l'aide d'enzymes de digestion et de compléter cette dissociation mécaniquement. Le but est de prélever le contenu d'une cellule dans son intégralité. On verra par la suite que le challenge est d'obtenir des neurones olfactifs de morphologie intacte.

Méthode: Durant ma thèse j'ai été amené à tester différents protocoles de dissociation avec à chaque fois un ou deux facteurs qui variaient d'un protocole à l'autre. Je ne vais rédiger que le protocole final, les autres sont décris brièvement dans la **figure 44.**

Après dissection, l'épithélium est incubé dans une solution enzymatique (*papain Carica papaya*: 0,2mg/tube) à une température de 37°C pendant 10 minutes et sous agitation (700rpm). L'épithélium est ensuite dissocié mécaniquement à l'aide de deux pinces et les fragments non dissociés ainsi que les débris sont éliminés par passage au tamis cellulaire (diamètre des pores: 40µm). Les cellules sont ensuite déposées sur une lame ou boite de pétri couverte d'un substrat (polyethylenimine) pendant 20 minutes à température ambiante (**figure 43**). Avant de prélever les cellules, je m'assure qu'elles soient morphologiquement intactes. Les cellules qui seront prélevées possèdent, toutes, les cinq éléments caractéristiques d'un neurone olfactif mature (bouton dendritique avec de multiples cils, une dendrite, un axone et un corps cellulaire). De plus, nous avons montré par patch-clamp perforé que ces cellules MOR23 GFP sont fonctionnelles (**figure 45).** Elles répondent à différentes concentrations de Lyral. Ensuite, une pipette en verre de Borosilicate est étirée életriquement, via une étireuse de patch-clamp (voir programme sur **tableau 6**) (Sutter instruments) puis forgée au diamètre voulu (~5,2µm). Puis les cellules GFP sont prélevées par la pipette sous un microscope (Olympus B51Wi) équipé d'un micromanipulateur (pour pouvoir piloter la pipette sous le champ visuel du microscope) et d'un système d'épifluorescence (**figure 46**). Après avoir prélevé la cellule fluorescente, la pipette est détachée du porte électrode et la pointe est cassée dans un tube standard de PCR. Le tube de PCR contient 2µl de tampon de lyse stabilisateur d'ARN (side Step Lysis and stabilization Buffer de Stratagene). Les tubes de PCR sont placés dans la glace durant le prélèvement et gardés à -80°C après une centrifugation (10 000 rpm, 5 min) jusqu'à utilisation postérieure. A chaque fois est prélevé du milieu environnant les cellules pour servir de controle de contamination. Il sera analysé avec les echantillons.

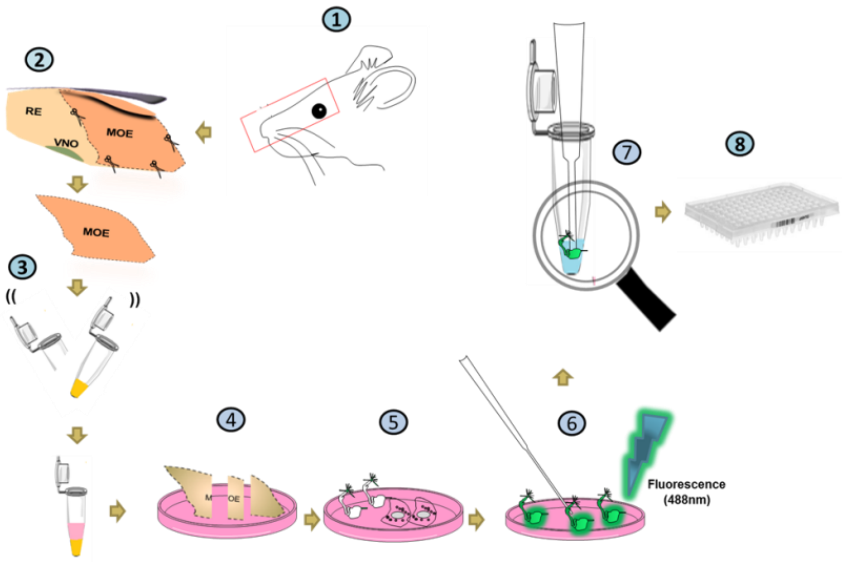


Figure 43. Diagramme montrant la méthode de prélèvement par la pipette de patch.

(1)(2)-Après avoir disséqué l'épithélium septal, nous retirons l'épithélium olfactif et nous l'incubons dans de la papaïne à 37°C pendant 10 min sous agitation (800rpm) **(3). (5)** – Les cellules sont ensuite incubées sur une boîte de pétri (ou lamelle) couverte par du poly éthylène imine pour adhésion après une dissociation mécanique **(4). (6)** Les cellules GFP sont ensuite collectées avec une pipette de patch sous microscope équipé de fluorescence. **(7)**Après la collection des cellules, la pointe de la pipette est cassée dans un tube de PCR contenant un tampon de lyse et ensuite on réalise la q-PCR **(8).**

Heat	Pull	Velocity	Time
425	0	20	200

Tableau 6. Programme étireuse pour pipette de prélèvement.

Pipette de type Borosilicate, OD: 1,2mm, ID: 0,94mm, Ramp test: 391 et Ref: BF120-94-10.

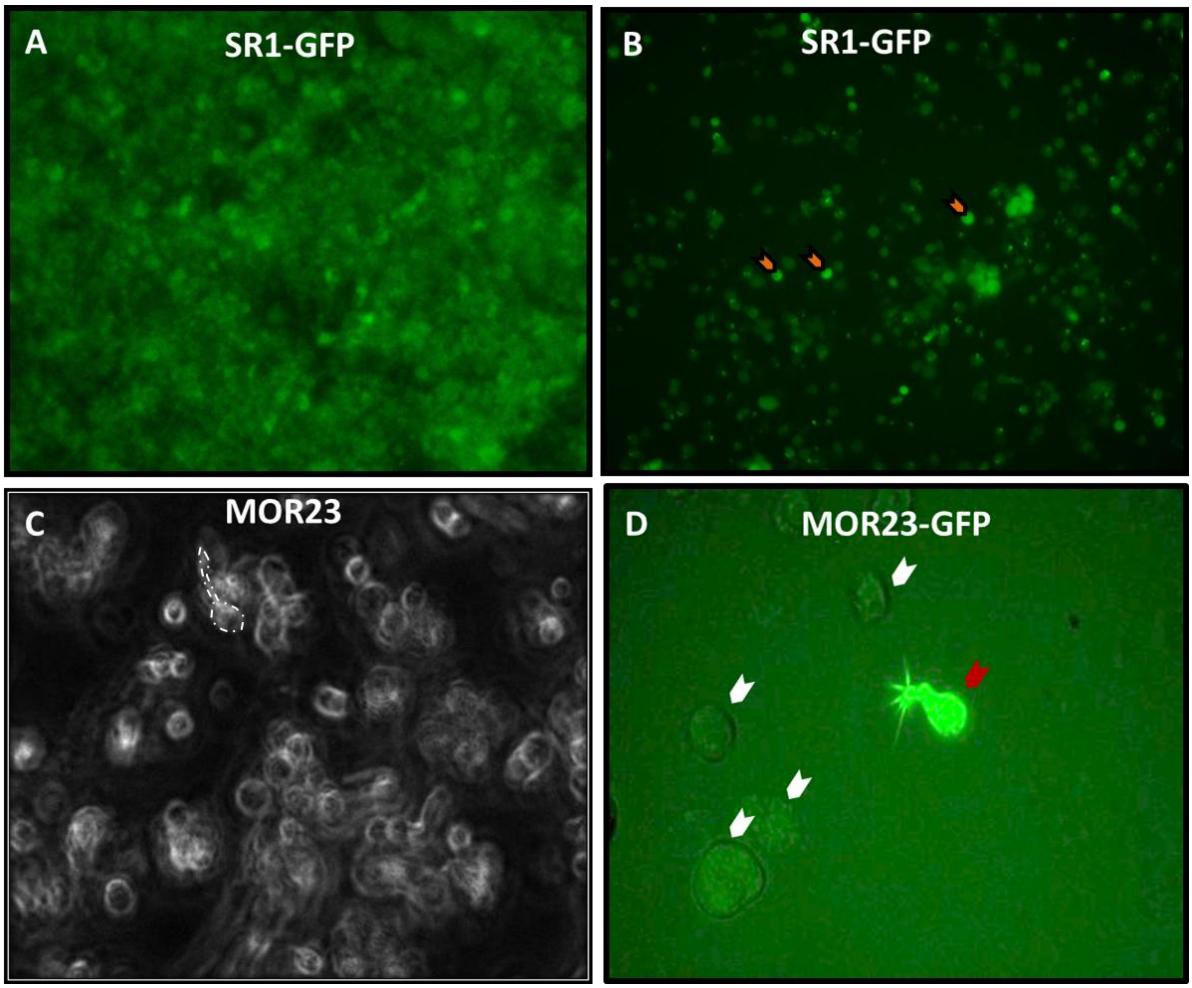


Figure 44. Elaboration d'un protocole efficace de dissociation de l'épithélium olfactif.

A-Solution enzymatique **(SE)**: DnaseII+Dipase+collagénase, Dissociation mécanique (**DM**): trituration cone+pipette pasteur, Incubation (**I**): Concanavalin IV (1h, 37°C) > Autofuorescence + cellules non adhérées. **B**- Changement **I**: Poly ethylène imine (1h, 37°C) > Cellules adhérées mais rondes(flèches oranges). **C**- Changement de **DM**: trituration cone uniquement + changement **SE**: Papaine > quelques cellules ont la forme fusiforme (pointillé blanc), mais pas de cellules GFP. **D**- Changement **I**: Incubation pendant 20 min à température ambiante + changement de **DM**: dilacération de l'EO via des pinces > cellule fluorescente (flèche rouge) à morphologie intact et cellules non fluorescentes (flèches blanches) .

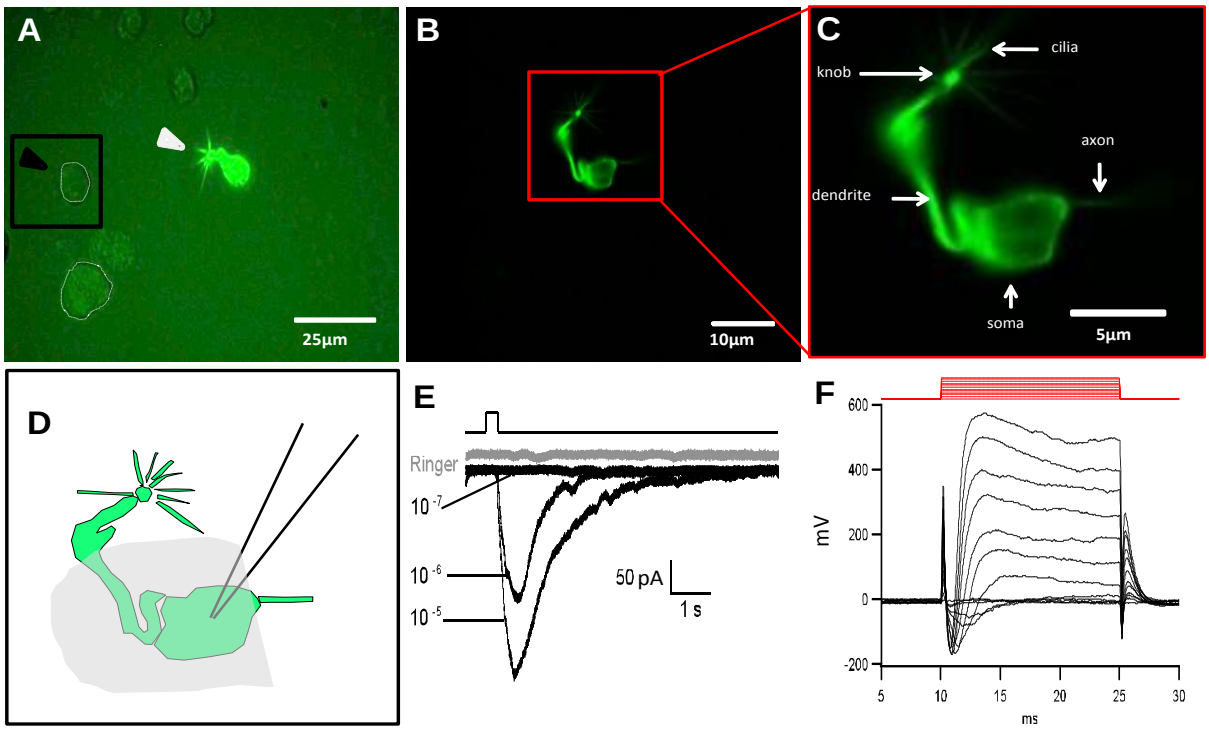


Figure 45. Les cellules prélevées ont une morphologie intacte et sont fonctionnelles.

A- On peut prélever spécifiquement une population de neurones GFP sur la base de la fluorescence. Ces cellules ont une morphologie intacte, (**B et C**) les 5 caractéristiques du NRO sont observées. **D**- Quand on effectue un enregistrement électrophysiologique en mode voltage-imposé (-40mv à +120mv), les cellules GFP répondent à différentes concentrations odorantes (10^{-7} à 10^{-5}M) (**E**) et présentent des courbes voltages-courants typiques de NRO à membrane intact (**F**)

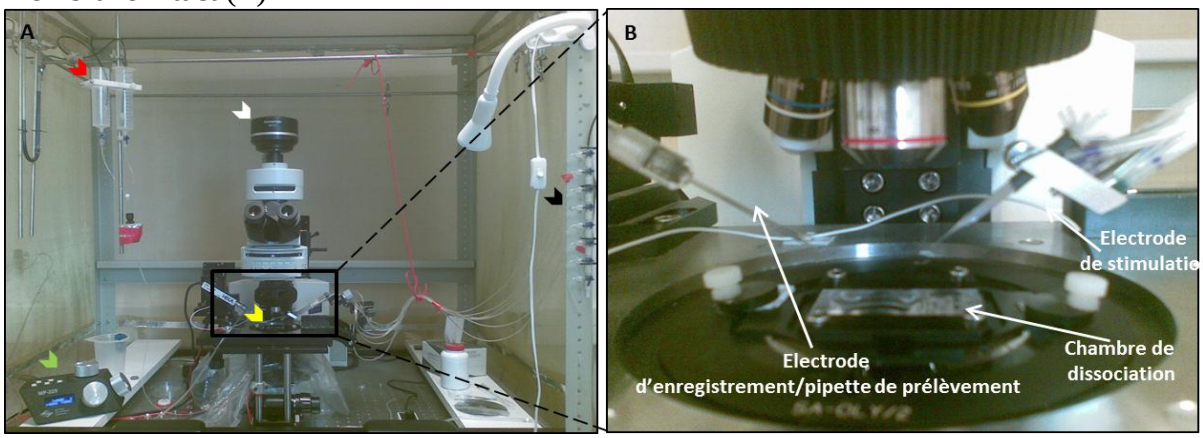


Figure 46. Photo d'un poste d'électrophysiologie employé ici pour prélever les neurones MOR23 GFP dissociés.

A- Ce poste est équipé d'un micromanipulateur (vert), d'un microsocope à fluorescence droit(flèche blanche), d'un système de perfusion (flèche rouge) permettant le changement régulier du milieu des cellules et de vannes de stimulation (pour délivrer plusieurs solutions/concentrations d'odorants) indiqué par une flèche noire. La chambre de dissociation est indiquée par une flèche jaune. **B**- Vue en fort grossissement de la chambre.

Microdissection Laser.

Principe: Cette technique permet de micro-disséquer (au moyen de lasers) des cellules d'intérêts à partir d'un tissu en vue d'analyser le contenu cytoplasmique.

Méthode: Comme la technique n'est pas applicable sur des cellules en suspension en raison de la déviation du faisceau laser en milieu aqueux, nos essais de microdissection ont été réalisés sur des coupes d'épithéliums olfactifs. Voici le protocole : Après avoir lavé nos coupes (14µm) par immersion dans un bain de PBS pendant 4 minutes, nous avons immergé nos lames pendant 4 minutes dans deux bains successifs d'alcool, à deux concentrations différentes (respectivement 70° et 100°) et dans un bain de xylène pur. Ces immersions servent à déshydrater nos coupes. Enfin, nous avons passé les préparations sous le dispositif de microdissection laser afin de prélever les cellules GFP. En revanche, nous avons constaté que les faisceaux lasers étaient incapables de découper le tissu. En conséquence, nous avons répété la même expérience sur des tranches plus fines (10µm). Cette fois-ci le laser a pu couper le tissu, mais de manière imprécise. Puisque les micro-disséquâts contiennent la cellule GFP (avec morphologie de mauvaise qualité) et des cellules non-GFP, nous avons considéré la technique propice à la contamination (**figure 47**).

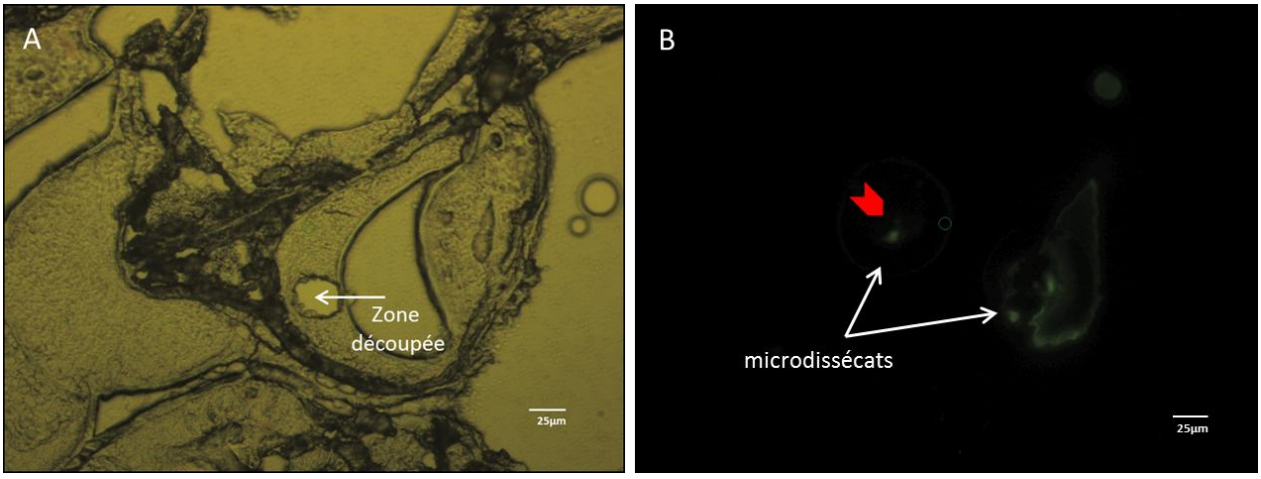


Figure 47. Micrographie prise sur un poste de microdissection laser.

A- Vue d'une coupe coronale d'un épithélium olfactif prise en grossissement 20X (lumière transmise) indiquant la zone découpée par le faisceau laser. **B**- photo prise (20X) en lumière fluorescente de la membrane montrant les microdissécats (neurone GFP indiqué par une flèche rouge).

Tri par cytométrie en flux

Principe: Le tri par cytométrie en flux permet de séparer des cellules en suspension en fonction des propriétés intrinsèques des particules incluant: leurs dimensions : forward scatter ou FSC, leur granularité relative ou Side Scatter « SSC » et leur propriété de fluorescence.

Méthode: Après dissociation des épithéliums olfactifs, nous filtrons les cellules en suspension pour éviter d'obstruer la gaine d'entraînement du dispositif de tri cellulaire. La première étape du tri des cellules fluorescentes consiste à évaluer les paramètres cellulaires des cellules d'intérêts dans un appareil classique de cytométrie en flux. Ainsi, dans un second temps il sera possible de déterminer les critères de séparation pour pouvoir trier physiquement toutes les cellules dont les caractéristiques sont comprises entre les valeurs définies. Les cellules seront isolées dans des gouttelettes individuelles qui seront déviées par un champ électrostatique et récupérée dans un récipient.

Lors d'une première tentative, j'ai dissocié deux EO issus d'une souris MOR23GFP et d'une souris C57/B6 (contrôle). Cependant aucun signal GFP n'a été détecté par l'appareil. Ceci m'a conduit à concentrer mes échantillons en dissociant cette fois 3 souris MOR23GFP et 3 souris SR1GFP. L'idée est d'avoir le plus grand nombre possible de cellules exprimants la GFP et donc d'augmenter le nombre d'évènements GFP positifs (un évènement est un signal optique émis par une cellule et détecté par les photomultiplicateurs du cytomètre). Dans cet essai, le cytomètre a pu identifier quelques évènements GFP positifs (entre 13 et 33) parmi les 30 000 cellules analysées. Toutefois, le pourcentage d'évènements GFP positifs avoisinant les 0,1% est trop faible pour être trié (sans contamination par les autres cellules) par la technique de cytométrie en flux (**figure 48**).

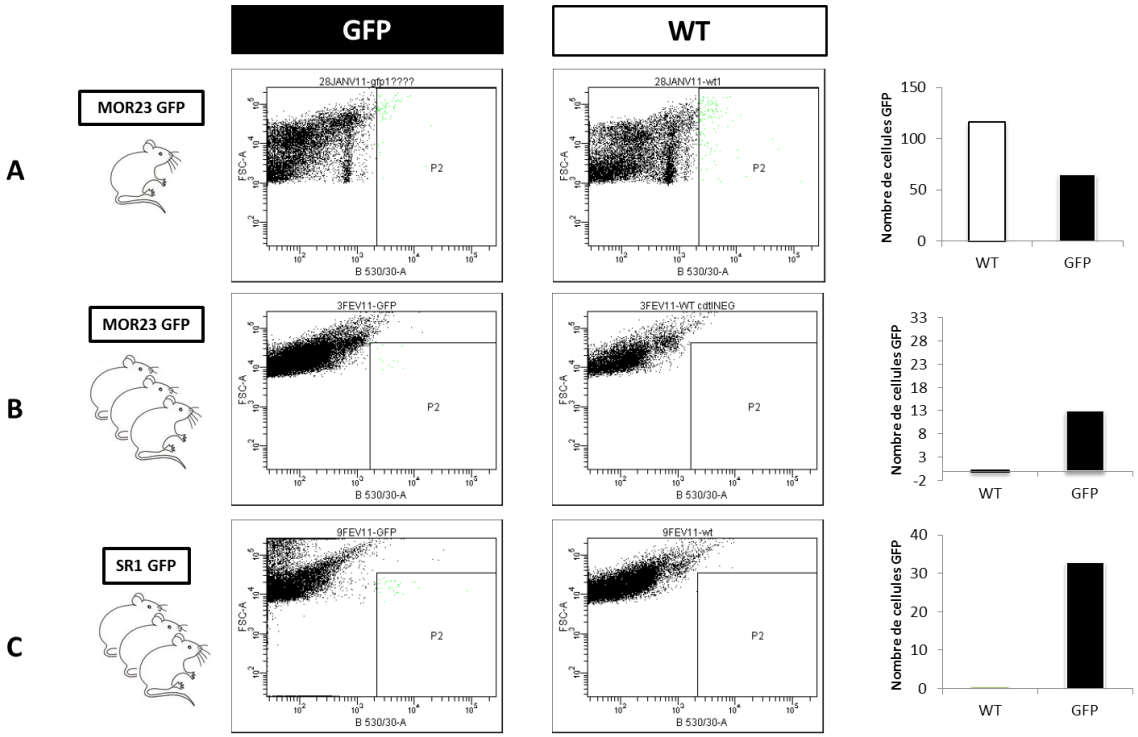


Figure 48. Représentation des paramètres cellulaires mesurés par cytométrie sur des neurones olfactifs dissociés.

A- le nombre d'évènements GFP positifs détectés sur une suspension cellulaire issue de souris WT est plus importante que celle détectée chez la souris MOR23 GFP. Cela est dû à une autofluorescence. **B** et **C-** le nombre d'évènements GFP+ détectés chez les souris GFP (MOR23 ou SR1) est plus important que celui des WT. En revanche, c'est insuffisant pour être trié du reste des cellules olfactives.

RT-qPCR : (cellules isolées)

Principe : La grande sensibilité de la qPCR permet d'amplifier les transcrits d'une seule cellule isolée (**figure 49**). Afin de minimiser les variations d'expression biologique et d'obtenir des résultats représentatifs d'une population de cellules, 7 cellules sont prélevées par souris. Il est cependant possible d'amplifier le matériel génomique (ADNc) de départ par une pré-amplification afin de pouvoir analyser plusieurs gènes (50 gènes) à partir de quelques cellules (7). Le protocole de Lyse cellulaire + RT a été basé sur plusieurs articles dont les principaux sont cités sur le **tableau 7**.

Méthode :

Transcription inverse : De la même manière que pour la qPCR sur tissu entier, nous digérons les échantillons d'ARNs à la DNAse recombinante de crevette avant de réaliser la

transcription inverse. La DNase est ajoutée au tube (contenant 7 cellules +3µl de tampon de lyse) à raison d'une concentration finale de 0,13 unité/µl (soit 3,2 µl d'une solution de DNase contenant : 3µl de tampon (voir qPCR sur tissu entier) + 0,4µl DNase stock (2U/µl)). Les tubes sont ensuite chauffés pendant 10 minutes à une température optimale de 37°C. (Voir optimisation **figure 50**).

Après avoir refroidi les tubes à une température de 4°C (dans de la glace), nous ajoutons dans le tube, 3,5µl d'un premier mix contenant les réactifs pour la RT (dans 13µl de mix :2µl d'oligodT à 50µM, 2µl dNTP à 10mM, 1µl de « *Random*» hexamère et 8µl H20).

Ce mélange est chauffé à 65°C pendant 5 min afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides sur l'ARNm.

Après avoir refroidi la solution (1min, 4°C), 4 µl d'un mix enzymatique sont ajoutés. Un mix de 35µl contient : 20µl de tampon RT 5X, 5µl de DTT à 0,1M, 5µl de RNase OUT (40U/µl) et 5µl de Superscript III (200U/µl). Tous les réactifs sont fournis par le kit Invitrogen ™.

La réaction de transcription inverse nécessite une incubation à 50°C pendant 45 min, puis une incubation à 55°C pendant 15 min et une dernière incubation à 70°C pendant 15 min.

Quantitative polymerase chaine reaction : Après la transcription inverse, sont déposés dans chaque puit de la plaque de qPCR 1,5µl de produit RT et 8,5µl de SSO Fast Eva Green supermix qui contiennent les amorces à une concentration finale de 250 nM (fourni par BIO-RAD). Les températures suivantes ont été appliquées aux plaques pour les réactions de qPCR (95°C, 20S et 40 cycles d'amplification [95°C, 3s et 60°C, 30 s] et finalement 65°C-95°C pour la courbe de fusion). Un gène de référence fortement exprimé (ici le Suclg) est utilisé afin de normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en CT (Cycle threshold). Il faut ensuite soustraire aux moyennes des duplicats de chaque échantillon, la moyenne obtenue pour le gène référent.

Papiers	Suspension cellule-unique	Lyse cellulaire	Réaction RT
- Titre: Split single-cell RT-PCR analysis of Purkinje cells **- Publié dans nature protocols** **- Auteurs: Shigeyuki Esumi et al, 2006**	Cellule dans DNase/RNase free water (congeler dans de l'azote liquide)	Centrif. 200g, 4°C,1min Add 1µl of gene specific primer mix (2.5µM primer+ 1µl of 10mM dNTP mix) *65°C, 5 min* *Hold on ice 2 min*	Ajouté 2 µl 5X cDNA synthesis buffer (Invitrogen, supplied with thermoscript) 0.5µl 0.1M DTT (Invitrogen, supplied with…) 0.5µl RNasin 0.5µl (7.5U)Thermoscript Reverse transcriptase *55°C, 60min* *85°C, 5 min (pour arreter la réaction)*
- Titre : RNA expression profiling at the single molecule level **- Publié dans Genome research protocol** **- Auteurs: Jan Hesse, 2006**	RNase OUT (20U, Invitrogen) + Chaotropic salts Ou Guanidine thiocyanate (50 mM)	0.5mM dNTP (Sigma) 2.0µM oligo (dT, Eurofins MWG Operon) 2.0µM random hexamers (Eurfins, MWG Operon) *65°C, 5min* *Hold on ice* Vf=6.5µl	50mM Tris-HCL (pH 8.3) 75mM KCl 3mM MgCl2 5mM dTT 20U RNase OUT 50U Superscript III **Paramètres de RT:** 25°C-5min 50°C-60min 55°C-15min 70°C-15min Vf=10µl (soit 3.5µl)
- Titre: Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR **- Publié dans nature protocols** **Auteurs : Kiyomi Taniguchi et al 2009**	2µl PBS	1.1µl cell-lysis sol.(mix de 1µl resuspension buffer+ Lysis Enhancer, Invitrogen) *75°C, 10 min* *Hold at +4°c, 10min* 0.86µl DNase sol. (0,5 U DNase I in 20mM Tris-Hcl (pH8.4), 2mM MgCl2, 50mM KCl) *20-25°C, 5min (genomic DNA digestion)* **Inactivation DNase** 1.2µl EDTA (2.5mM pH8) *70°C, 5min* *Hold on ice*	17.6µl (10^7oligo dT, 568µM dNTP mix, 0.08% Tween-20, 8.9mM Tris-HCl (pH8) *70°C, 5min* *Hold on ice* 9µl RT sol. 50mM Tris-HCL (pH8.3) 75mM KCL 3mM MgCl2 11 mM DTT 40U RNase OUT 200U superscriptIII , Invitrogen
- Titre: 220-plex microRNA expression profile of a single cell **- Publié dans nature protocols** **- Auteurs : Fuchou Tang et al, 2006**	- Transfer la cellule-unique dans 4.3µl de RT master mix - Centr. 9.000g, 10s *95°C, 5min (puis Hold on ice)* Composition du RT Master Mix : **1X** **H2O** 3.61µl **10X cDNA archiving Kit Buffer** 0.5µl **22O-plex RPs (200nM)** 0.125µl **RNase inhibitor (20U/µl)** 0.065µl **Total volume** 4.3µl		Add 0.65µl enzyme mix 1X RNase inhibitor (20 U/µl) 0.065µl MMLV RT (50U/µl) 0.335µl dNTP (100 mM with dTTP) 0.25µl Total volume 0.65µl Centr. 9.000g, 10s **Parameters RT:** 16°C,30min 20°C, 30s 42°C, 30s 50°C, 1s (60 cycle) 85°C, 5min Hold 4°C

Tableau 7. Récapitulatif des différents protocoles de Lyse cellulaire et de RT à partir de cellules uniques.

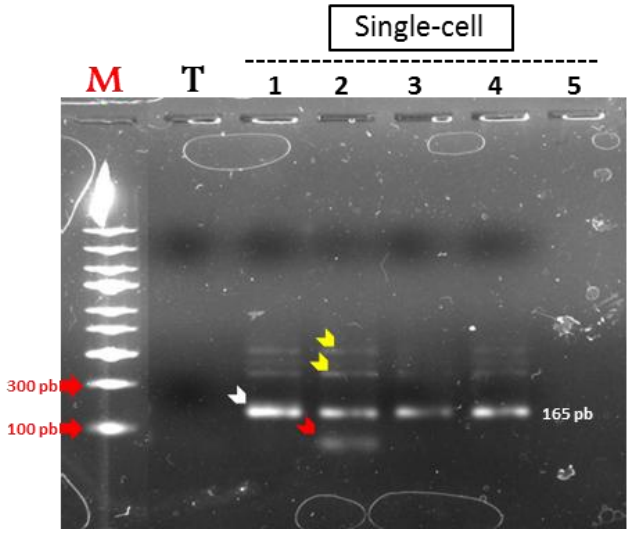


Figure 49. Amplification d'ADNc à partir d'une seule cellule.

5 produits de PCR (issus de cellule uniques) ont été déposés sur un gel d'agarose 1,2% et migrés avec un témoin (T) (milieu d'incubation des neurones) et un Marqueur de taille (M). La taille de l'amplicon de la cyclophiline (fortement exprimé dans l'EO) est de 165pb. Dans les pistes (1 à 5), on voit de l'ADNc amplifié (flèche blanche), de l'ADNg amplifié (flèche jaune) et des dimères d'amorces (flèche rouge). Le témoin ne montre pas de produit d'amplification. Les paires d'amorces de la cyclophiline, du fait de leur forte expression, n'ont servi que pour l'optimisation de la technique de prélèvement de cellules isolées.

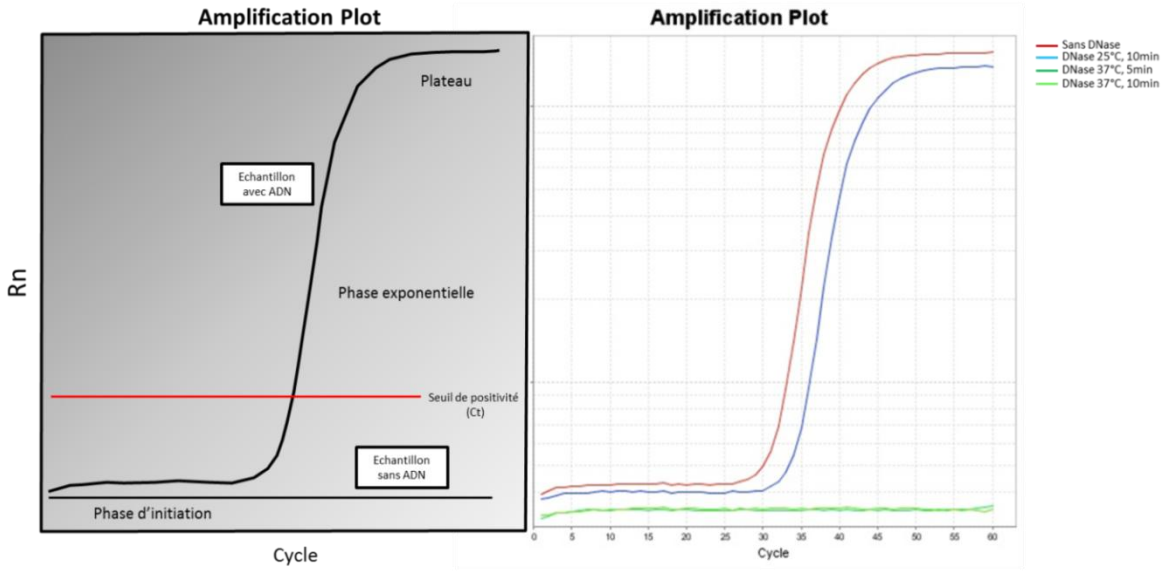


Figure 50. Optimisation de la digestion de l'ADNg de cellules isolées.

Un échantillon de cellules isolées (ligne rouge: RT- et DNase -) tout comme un échantillon (ligne bleue: RT- et Dnase 25°C, 10min recommandé par Invitrogen) voit son ADNg (MOR23) s'amplifier après PCR. Toutefois, les échantillons traités à la Dnase 37°C (lignes vertes: 5 ou 10 min) ne montrent pas d'amplification après PCR

La digestion 37°C, 10min a été retenue pour nos expériences de qPCR.

Analyse d'un grand nombre de gènes à partir de quelques cellules (Pré-amplification)

Principe : La pré-amplification permet de diluer suffisamment l'ADNc de l'échantillon (cellules prélevées) afin de pouvoir analyser un grand nombre de gènes par PCR en temps réel.

Méthode : Pour réaliser la PCR de pré-amplification, mélanger 25µl de « *TaqMan PreAmp master Mix 2x* » + 12,5µl de « *pooled assay Mix 0,2X* » (mélange de 500µl contenant 5µl de chaque amorce/sonde appelé, « *Assay TaqMan Gene Expression Assay 20X* ») et 12,5µl d'ADNc obtenu par rétro-transcription de l'ARN du tube contenant les cellules prélevées dans le tampon et digéré à la DNase (voir qPCR Syber Eva Green). Ce mélange de PCR de pré-amplification doit être fait pour chaque échantillon. Il y aura autant de mélange de 50µl pour la PCR de pré-amplification que d'échantillons.

Profile de thermocyclage (préamplification): 95°C pendant 10 minutes et 10 cycles de PCR de pré-amplification (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 4 minutes). Après les 10 cycles de PCR de pré-amplification, diluer au 1/5 avec du tampon TE 1X. Le volume total de PCR de pré-amplification obtenu sera donc de 250µl. Cela revient à dire que, pour chaque échantillon, on obtiendra 250µl d'ADNc d'échantillon pré-amplifié.

Réaction de PCR en temps réel : Dans une plaque pour l'instrument StepOnePlus, on disposera par puits : 1µl du couple d'amorces/sonde Taqman « *Assay TaqMan Gene Expression Assay 20X* » + 5µl d'ADNc d'échantillon pré-amplifié + 10µl de « *TaqMan FAST Advanced Master Mix 2X* » + 4µl d'H20 nucléase free. Il y a autant de puits que d'échantillons à tester pour le gène.

Profile de thermocyclage (PCR en temps réel) : 95°C pendant 20 secondes et 40 cycles de PCR (95°C pendant 1 seconde et 60 °C pendant 20 secondes (une phase à 60°C avec enregistrement de la fluorescence)).

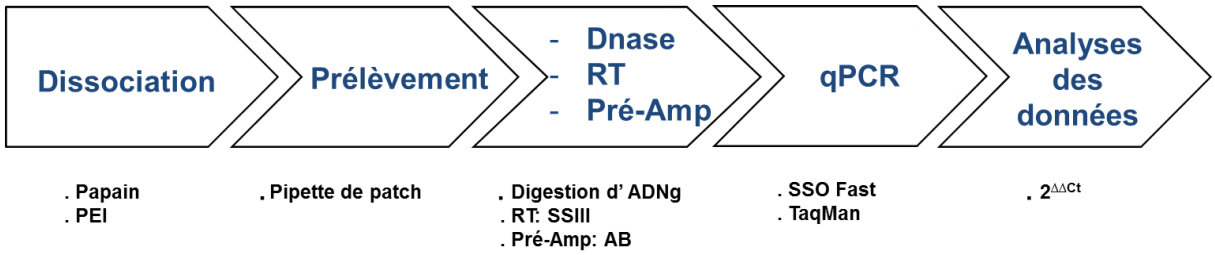


Figure 51. Diagramme récapitulatif des étapes à suivre pour analyser par qPCR les gènes d'intérêts issus de cellules dissociées.

Etude des protéines

Western Blot

Principe : Les protéines sont séparées selon leurs tailles par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide. Puis, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène à détecter, puis avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase dirigé contre l'anticorps primaire. La présence des protéines cibles est détectée par chimioluminescence.

Méthode : Les tissus olfactifs sont lysés dans 100µL de tampon de lyse (50mM Tris-Hcl pH 7.4, 1% sodium dodécyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM sodium fluoride (NaF), 1mM orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem ©)) en utilisant des billes sous agitation au « *Tissu Lyser* » (2 fois $20H_z$). Après dosage des protéines (595nm) selon la méthode de Lowry (Bio-Rad, Protein Assay), 25µg de protéines sont additionnés de tampon de charge 2X (Sigma) et finalement dénaturés (5min, 95°C). Les échantillons protéiques sont séparés en gel dénaturant SDS-PAGE (4 et 12%) dans le tampon de migration (Tris-base 25mM, Glycine 96mM, SDS 0,1%). Les protéines contenues dans le gel d'acrylamide sont transférées par un système de transfert rapide "Trans-Blot® Turbo™ BIO-RAD" (25 Volts, 1,3 A pendant 7 minutes) sur membrane de nitrocellulose entourée de feuilles de papier Whatmann (Trans-Blot transfert pack, BIO-RAD) puis la membrane est colorée au rouge ponceau afin de vérifier la qualité du transfert sur membrane. Après lavage au T-TBS (TBS 1X, Tween 0,1%), la membrane est incubée dans une solution de T-TBS et caséine 0,5% (permet de saturer les sites aspécifiques) pendant 1 heure. L'anticorps primaire, (**tableau 8)** est alors ajouté pour une incubation de 16 heures à

4°C. Après lavage (3 x 10 minutes dans du T-TBS), l'anticorps secondaire (**tableau 8**) (dans du TBST + caséine 0,1%) couplé à la peroxydase est ajouté pour une incubation de 1 heure à température ambiante. Le marquage est révélé par chimioluminescence en présence de peroxyde d'hydrogène, de luminol (produisant la luminescence). Le signal est detecté a l'aide d'un acquisiteur d'image (BIO-RAD Molecular Imager® Chemidoc™ XRS+).

Anticorps primaire	Type	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti-caspase3 clivée (ASp 175) (Cell signaling®)	Monoclonal	1/200	Anti-lapin	1/2000
Anti-GFP (Abcam®)	Monoclonal	1/350	Anti-lapin	1/2000
Anti-Phospho CREB (ser133) (Cell signaling®)	Monoclonal	1/1000	Anti-lapin	1/2000
Anti-GAPDH	Monoclonal	1/3000	Anti-souris	1/3000

Tableau 8. Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour le western-bot.

Immunohistochimie

Cette partie sera consacrée à la description des différentes étapes allant de la perfusion des souris jusqu'aux analyses histologiques. Les analyses comprennent le comptage des neurones coexprimants la GFP et l'OMP ou GAP43 sur tranches d'épithéliums olfactifs et la mesure de l'épaisseur des couches de neurones marquées à l'OMP et au GAP43. L'ensemble de ces étapes, qui sera détaillé dans une première partie, comprend: la thoracotomie, la perfusion, la fixation, la mise en bloc, la coupe (cryosection), l'immunomarquage, le scannage des lames et finalement le comptage des neurones.

Thoracotomie

Après avoir fixé l'animal anesthésié par des épingles, ouvrir le thorax de la souris, dégager le diaphragme et couper la cage thoracique le long de la base des côtes.

Perfusion et fixation

Principe : La fixation des échantillons permet de préserver les tissus et les structures cellulaires, en les protégeant de l'autolyse et des attaques bactériennes. Dans le cadre de notre étude, la fixation s'est fait par le biais de fixateurs chimiques. La fixation chimique permet la création de ponts entre les protéines qui deviennent alors insolubles dans l'eau et dans les solvants organiques. Elle préserve également la structure de l'échantillon, par arrêt de l'hydrolyse. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser un agent fixateur de type aldéhyde : le paraformaldéhyde (PFA). Comme tous les aldéhydes, il permet une bonne fixation des protéines et des acides nucléiques mais, contrairement au glutaraldéhyde, c'est un monoaldéhyde qui ne crée pas de modification dans la conformation spatiale des protéines. Ceci en fait un bon fixateur pour l'immunohistochimie. Il a également l'avantage de pénétrer rapidement les échantillons (10 mm par heure).

Méthode: Pour fixer rapidement les tissus de l'animal, nous perfusons le coeur (entrée par le ventricule gauche et sortie par l'oreillette droite) par 30ml de PFA 4%, après l'avoir lavé avec 20 ml de PBS. Ensuite, nous le laissons reposer pendant 30 minutes avant de commencer la dissection. La dissection consiste à décapiter la tête (sans retirer le cervelet et le cerveau) , d'enlever la maxillaire inférieure (sans enlever les dents) et finalement de retirer le palais.

Ensuite nous post-fixons la tête, par immersion, dans du PFA 4% pendant 2 heures. Les têtes sont ensuite placées dans du décalcifiant osseux (EDTA) pendant 16 heures avant de subir deux immersions successives dans des bains de sucrose à concentrations différentes (respectivement sucrose 15% et 30%) pendant une durée de 16 heures. Le sucrose rend le milieu hypertonique par rapport aux tissus, ce qui entraîne la sortie de l'eau et l'entrée du cryoprotecteur.

Inclusion en congélation (OCT)

Principe : L'inclusion consiste à enrober et à infiltrer le tissu dans un milieu assez dur pour être coupé. Pour des coupes en congélation, l' « *optimal cutting congelation* » (OCT) est le milieu d'enrobage classique. L'OCT est un milieu de congélation à base de polyéthylène glycol/sucrose qui préserve l'ultrastructure et protège le tissu de la dessiccation et de la dégradation. A température ambiante, il se trouve sous forme de gel, qui devient dur en dessous de -10°C.

Méthode: Après avoir retiré toutes les dents et coupé le cervelet, nous immergeons les têtes dans trois bains d'OCT (Tissue Tek) pendant 5 minutes chacun. Lorsque l'imprégnation est terminée, nous injectons de l'OCT dans la cavité nasale, à travers les choanes pour assurer une bonne pénétration de l'OCT dans le tissu olfactif. Ensuite, nous plaçons la tête dans un moule d'aluminium et nous coulons de l'OCT à l'intérieur. Une fois le bloc refroidi et l'OCT polymérisé, nous pouvons démouler les blocs et commencer à réaliser des coupes au cryostat.

Coupes des blocs

Principe : En inclusion, on peut réaliser des coupes d'une épaisseur de 4-5 µm sur un microtome. Le cryostat est un microtome placé dans une enceinte réfrigérée qui permet de réaliser des coupes congelées d'une épaisseur 8 à 14 µm en général.

Méthode : Les coupes des blocs se font à -18°C, à l'aide d'un microtome de type LEICA CM 3050S. En premier lieu, nous taillons en cubes les blocs d'OCT à l'aide d'une lame de rasoir afin d'éliminer l'excès d'OCT qui entoure les têtes. Nous fixons ensuite les blocs taillés sur un porte objet métallique sur lequel nous avons préalablement déposé une petite quantité d'OCT pour obtenir une bonne adhérence du bloc. Les coupes réalisées ont une épaisseur de 14µm. Les premières coupes servent de contrôle de localisation et de qualité des coupes.

Immunomarquage

Principe : L'immunohistochimie est une technique qui permet la détection, à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule, d'un antigène donné. L'antigène possède plusieurs épitopes qui sont des sites de liaison aux anticorps. Après une étape de perméabilisation membranaire facilitant le passage des anticorps, les préparations histologiques sont incubées en présence d'anticorps. Dans le cas de l'immunohistochimie directe, l'anticorps porte le fluorochrome (marqueur fluorescent). Dans le cas de l'immunohistochimie indirecte, le fluorochrome est porté par l'anticorps secondaire. Cette technique (utilisée durant ma thèse pour le comptage des neurones) permet d'avoir un meilleur rapport qualité signal détecté / bruit de fond.

Méthode : Certains fixateurs comme les aldéhydes provoquent des pontages intermoléculaires, à l'origine d'un masquage des épitopes. Il est donc souvent nécessaire de passer par une étape de démasquage. De ce fait, nous immergeons nos lames successivement dans un bain de méthanol à -20°c pendant 10 minutes et dans un bain de SDS 1% après trois lavages de 5 minutes dans du PBS. Ensuite, nous ajoutons sur les lames 200µl de solution de blocage (10% NDS dans du PBST). 1heure et demi après, nous incubons les coupes dans une solution d'anticorps primaires (150µl/lame) pendant toute la nuit, à température ambiante. Le lendemain, nous lavons les lames (3 bains de PBS-T) et incubons les coupes dans une solution (150µl/lame) d'anticorps secondaires (les anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes) (**tableau 9**). Finalement après incubation des lames au DAPI (marqueur nucléaire), nous montons les lames.

Anticorps primaire	Type	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution	Couleur du signal
Anti-OMP (Wako®)	polyclonal	1/500	Anti-chèvre	1/250	Bleu (Cy5)
Anti-GAP43 (CHEMICON®)	Polyclonal	1/250	Anti-lapin	1/500	Rouge (Alexa 555)

Tableau 9. Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour le comptage des neurones matures et immatures par immunohistochimie.

Montage des lames

Principe : Le milieu de montage (incolore et dont l'indice de réfraction est proche de celle du verre) joue plusieurs rôles : il permet d'assurer une bonne conservation des préparations histologiques et de pallier au problème de photo-destruction « f*ading* » ou de photo-dégradation « *bleaching* » dans les techniques de microscopie à fluorescence.

Méthode : Nous déposons sur chacune des lames 50µl de milieu de montage (Mowiol). Ces lames sont laissées à l'air libre durant toute la nuit pour leur permettre de sécher.

Observation des coupes

Trois lames comptant chacune 14 coupes de l'EO sont choisies parmi les 30 lames réalisées pour un épithélium olfactif entier. Les lames sélectionnées représentent l'EO dans sa totalité, c'est à dire de sa partie antérieure à sa partie postérieure. Pour chaque lame, 14 coupes sont analysées. Les mesures réalisées sur l'épithélium olfactif sont les suivantes: l'épaisseur de la couche des neurones exprimants OMP et des neurones exprimants GAP43 dans les trois zones (postérieure, médiane et antérieure) et le comptage des neurones MOR23 matures (neurone GFP coexprimant OMP) et des neurones MOR23 immatures (neurone GFP coexprimant GAP43) (**Figure 52**).

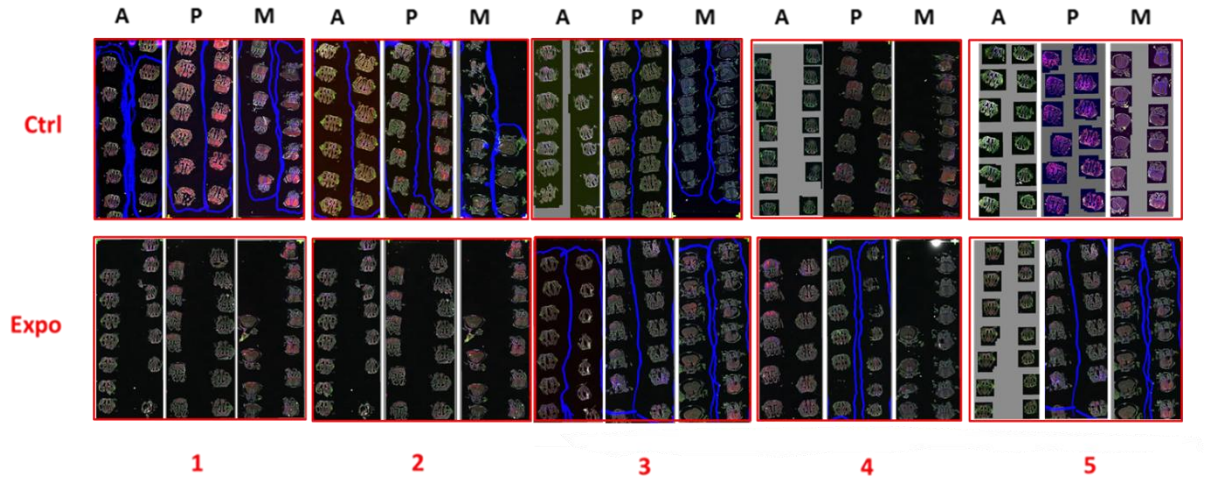


Figure 52. Présentation des lames sélectionnées pour l'analyse histologique de l'épithélium olfactif.

La première ligne correspond aux différentes lames issues de souris contrôles (non exposées). Dans chaque encadré rouge se trouve 1 lame des trois zones (de gauche à droite: antérieure, médiane et postérieure) de l'épithélium olfactif d'une souris donnée. La deuxième ligne correspond aux lames issues de souris exposées au Lyral. 5 souris ont été utilisées pour la quantification des neurones MOR23. A: antérieure; M: médiane; P:postérieure.

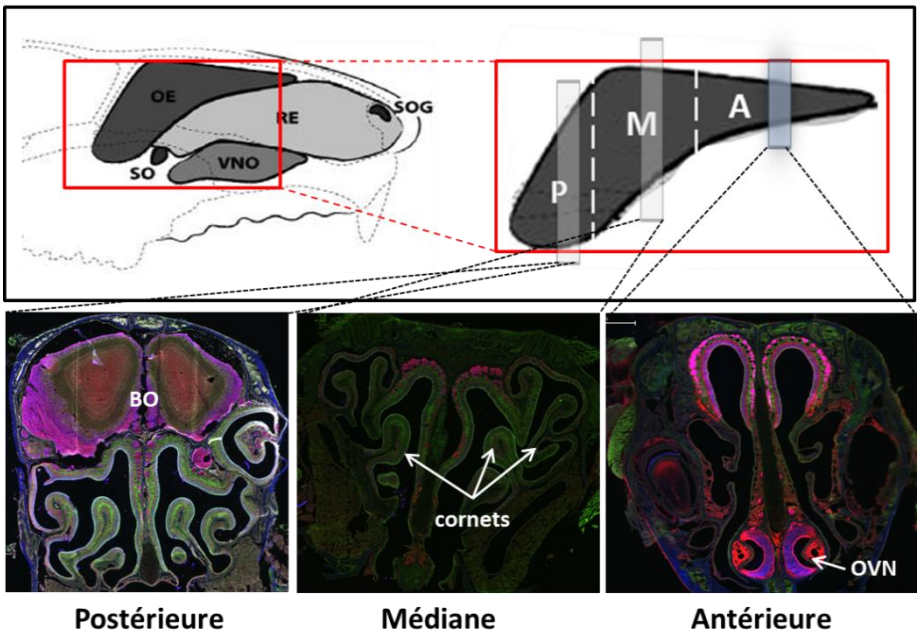


Figure 53. Coupe sagittale de la cavité nasale de murin présentant les différentes zones étudiées de l'épithélium olfactif.

Zone postérieure (P) où l'on peut apercevoir le bulbe olfactif (BO), zone médiane (M) où l'on voit les cornets et la zone antérieure (A) et où l'on peut voir l'organe voméronasale (OVN). OE (Epithélium olfactif) ; RE (Epithélium respiratoire) ; SO (organe septale) ; SOG (ganglion de Grueneberg) ; VNO=OVN. Image adaptée de (Antunes, Woodworth et al. 2007).

Comptage

L'observation des lames pour le comptage des MOR23GFP se fait à l'aide d'un microscope droit équipé d'une fluorescence. En revanche, le comptage des neurones MOR23 GFP coexprimants les marqueurs OMP ou GAP43 se fait à l'aide d'un logiciel d'acquisition d'images "Pannoramic viewer" à partir d'images prises par un scanner automatique de lames (MIDI SCAN 3D HISTECH).

Epaisseur

En fonction de l'emplacement, les épaisseurs dans l'épithélium olfactif varient. C'est pourquoi, les épaisseurs sont mesurées au niveau de l'épithélium olfactif septal et dorsal dont l'épaisseur est stable. De plus les épaisseurs ne sont pas évaluées au niveau des extrémités et des "zones de courbures"(zones à épaisseur instable). L'épaisseur de la couche GAP43 est mesurée tous les 150µm depuis la lame basale jusqu'à la limite inférieure de la couche OMP. L'épaisseur de la couche OMP est mesurée tous les 150µm depuis la limite supérieure de la couche GAP43 jusqu'à l'apex de l'épithélium olfactif.

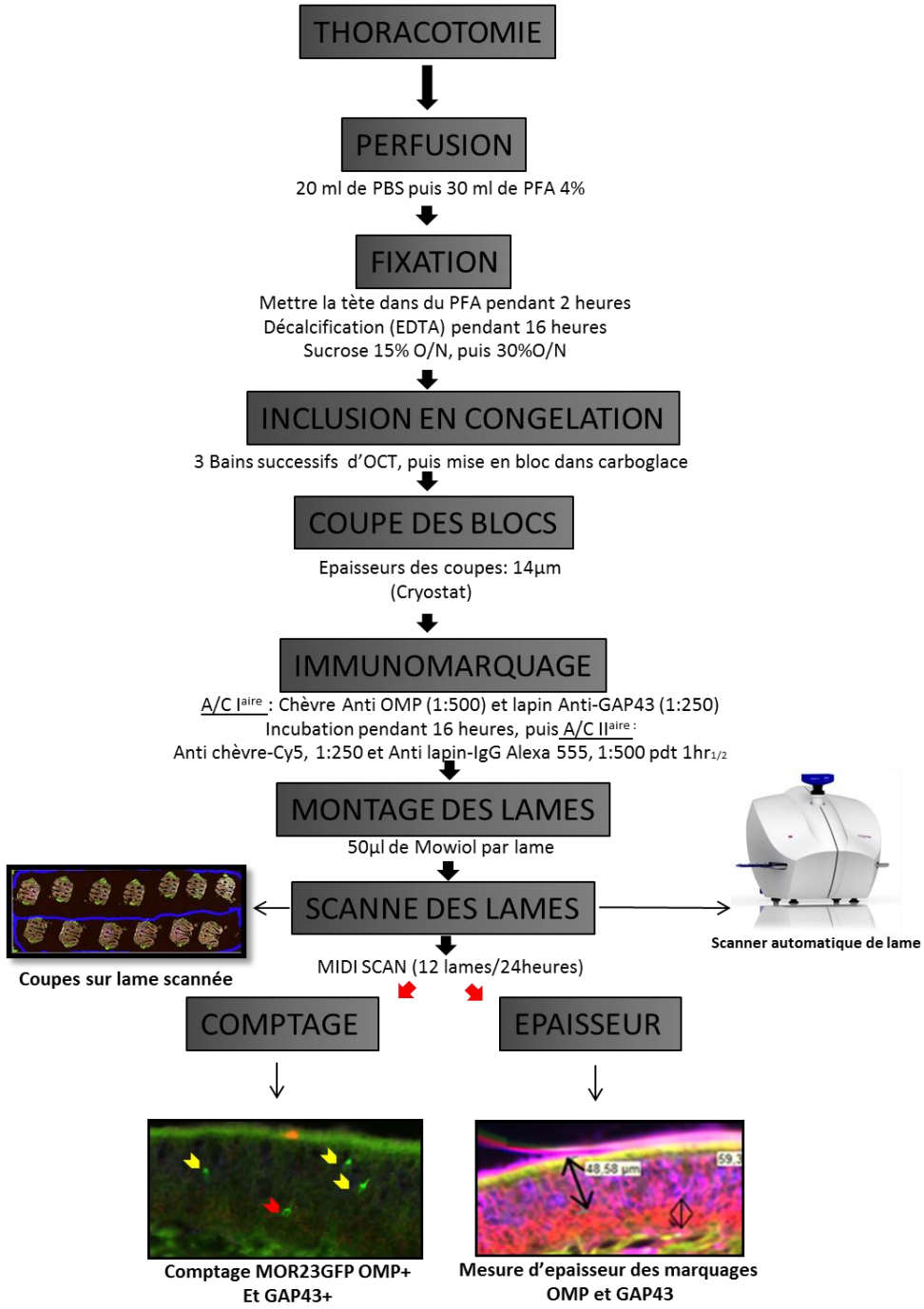


Figure 54. Récapitulatif du protocole de comptage de neurones matures et immatures par immunohistochimie.

Dans la voie de gauche, il s'agit de compter des neurones MOR23GFP OMP positifs (flèches jaunes) et les neurones MOR23GFP GAP43 positifs (flèche rouge). A droite, nous mesurons les épaisseurs des marquages OMP et GAP43.

PFA: paraformaldéhyde, PBS: tampon phosphate Salin, EDTA: acide éthylène diamine tétra acétique, O/N : toute la nuit, OCT : Optimal Cutting Temperature, A/C : anticorps, OMP : olfactory marker protein, GAP43 : anti-growth associated protein-43, NRO : neurorécepteur olfactif.

Test fonctionnel : Electroolfactogramme (EOG)

Principe: Il s'agit d'une technique qui permet de réaliser des enregistrements extracellulaires en potentiel de champ, résultant de la sommation spatiale des potentiels récepteurs des neurones de l'épithélium olfactif à proximité de l'électrode d'enregistrement.

Méthode:

Préparation de la muqueuse

Après l'anesthésie de la souris et après décapitation (sans ôter le cerveau) nous retirons la mandibule inférieure. Ensuite, de façon unilatérale, nous découpons la cavité nasale dans le plan sagittal le long du septum nasal dans le sens caudo-rostral. Cette dissection permet de retirer les cornets et de dégager l'épithélium septal. Cette préparation va être aussitôt placée dans une boîte de pétri réfrigérée, puis immobilisée et orientée à l'aide d'aiguilles, de façon à ce que la muqueuse forme un angle entre 50° et 70° par rapport à l'horizontal. La préparation est ensuite placée dans le poste d'enregistrement d'EOG. Les enregistrements sont réalisés à température ambiante.

Descriptif du poste d'enregistrement et système de stimulation

Les enregistrements EOG ont été effectués grâce à un modèle expérimental décrit dans le papier de Negroni (Negroni, Meunier et al. 2012). L'hémi-tête a été placée dans une chambre d'enregistrement sous un microscope droit Olympus SZ51 stéréo (Olympus, Rungis, FRANCE) équipé d'un objectif à faible grossissement (0,8 à 4x) et deux MX-160 micromanipulateurs (Siskiyou, Inc, Grants Pass, OR, USA). Le dispositif de stimulation d'odorants a été adapté de Scott et Brierley (Scott and Brierley 1999). L'hémi-tête est maintenue sous un flux constant d'air filtré et humidifié (~ 1000 ml / min) livré à proximité de la cloison nasale par l'intermédiaire d'un tube en verre. Ce tube est placé à 2 cm de la surface épithéliale. Les stimulations odorantes ont été réalisées par soufflage de bouffées d'air (200 ms, 200 ml / min) à travers une pipette Pasteur introduite dans le tube en verre. La pipette Pasteur contient un papier filtre imprégné de 20 µl de la substance odorante.

Les pipettes sont jetées après chaque utilisation. Les odorants ont été dilués dans de l'huile minérale (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Pour prévenir l'accumulation (variable d'un odorant à une autre) de l'odorant dans la pipette, une bouffée d'air a été

appliquée à la pipette Pasteur avant qu'il ne soit placé dans le tube en verre. Les substances odorantes utilisées sont: soit un mélange de 12 odorants (mélange équimolaire de l'anisole, le citral, l'heptanal, l'acétate d'isoamyle, le Lyral, le lilial, l'octanol, le 1-4-cinéole, isomenthone, le limonène, L-carvone et de la pyridine) dilué à une concentration finale de 10-3 M; soit l'acétophénone allant de 1:1000 à 1:10; soit le Lyral de 1:100 à 1:10. Comme la pression de vapeur du Lyral est très faible par rapport à d'autres substances odorantes (1,74 10^{-5} mmHg vs 0,326 mmHg pour acétophénone à 25 °C), nous avons dû prolonger la durée de stimulation (500 ms, 200 mL / min) et augmenter la longueur du papier filtre imprégné avec 100 µl de Lyral. Ceci nous a permis d'obtenir un signal significativement plus élevé que le signal obtenu avec de l'huile minérale. Voici le décours temporel du protocole d'enregistrement des EOG (**figure 55**):

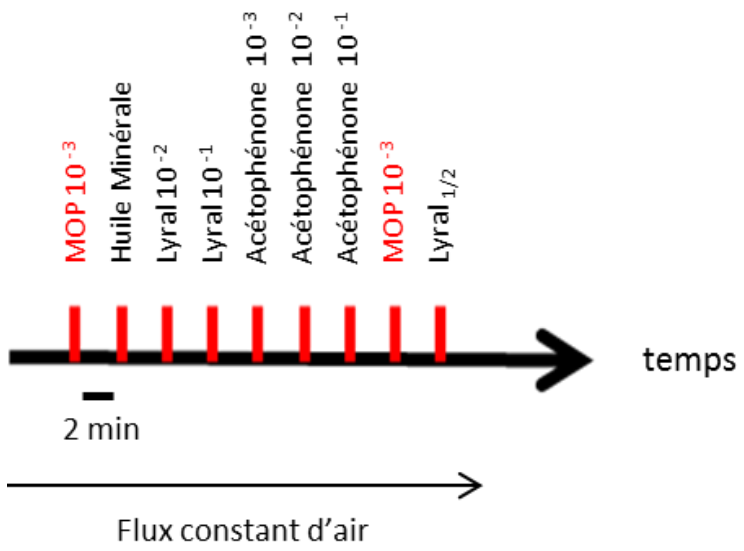


Figure 55. Déroulement temporel du protocole d'enregistrement des EOG.

Les signaux EOG ont été enregistrés en utilisant un amplificateur XtraCell 2 canaux (Dipsi, Chatillon, FRANCE) fonctionnant en courant (en configuration courant imposé) (I = 0), avec un filtre passe-bas de Bessel à 1 KHz. Les signaux amplifiés sont numérisés à une fréquence de 2 kHz à l'aide d'un Digidata 1322a convertisseur A / D (Axon Instruments, dispositifs moléculaires, Union City, CA, USA) placé dans un ordinateur et piloté par le logiciel pCLAMP 9.2 (Axon Instruments).

Une électrode de référence Ag / AgCl (argent chloruré) a été placée sur l'os frontal recouvrant le bulbe olfactif. Les enregistrements ont été effectués avec des micropipettes en

verre remplies avec une solution saline, offrant une résistance de 4-5 MΩ (**figure 56**). Les EOG ont été enregistrés à partir de deux positions séparées, localisées au centre de la cloison. Ces positions ont donné des enregistrements d'EOG robustes, reproductibles et de longue durée allant de 10 à 17 mV lorsqu'elles sont stimulées par le mélange d'odorants. Les stimulations sans odorant (avec de l'huile minérale) produisent toujours des signaux environ 1 mV d'amplitude. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Clampfit 9.2 (Axon Instruments). Nous avons mesuré l'amplitude de la réponse, le temps d'attaque, la surface de la courbe, le temps de repolarisation rapide (de 100% à 50%) et le temps de repolarisation lent (de 40% à 20%) **(figure 57).**

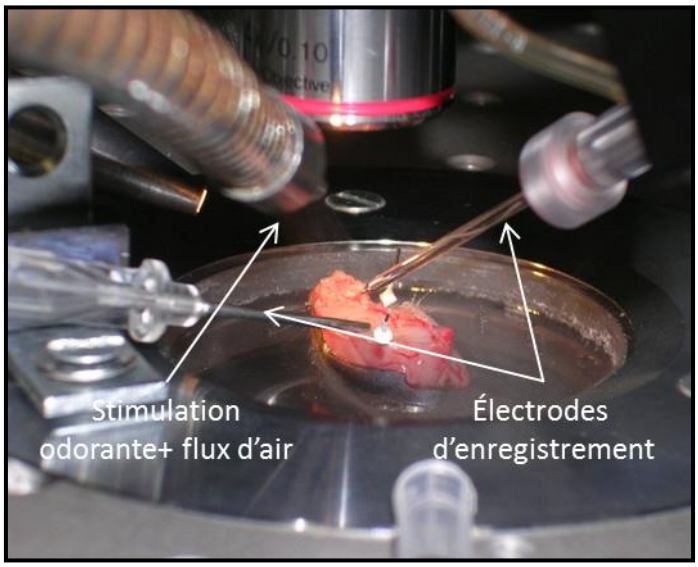


Figure 56. Photo d'une préparation placée sous le microscope du poste d'EOG.

Les électrodes d'enregistrements et la voie de sortie de la stimulation odorante sont indiquées par une flèche blanche

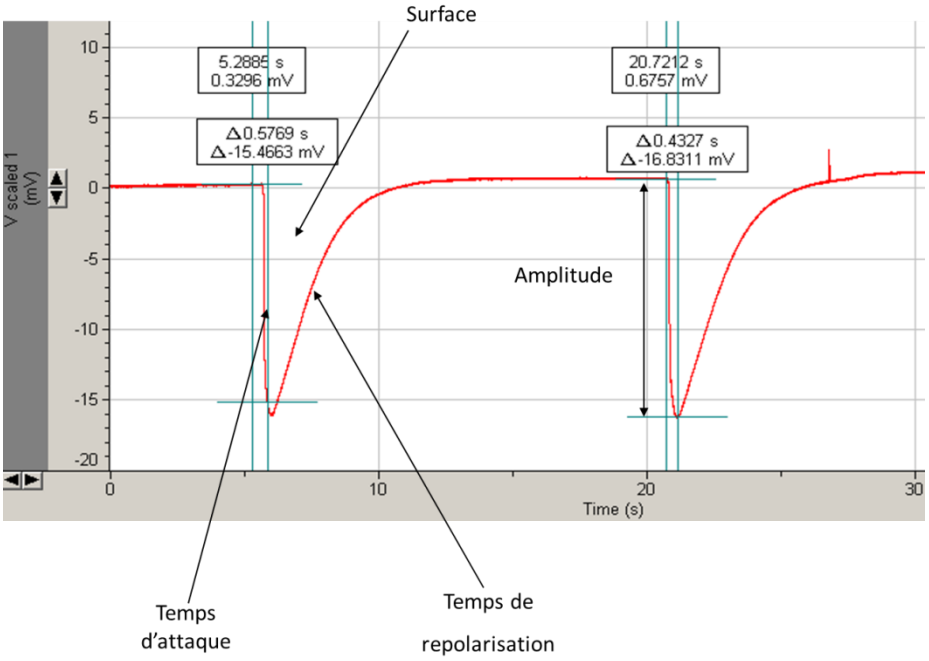


Figure 57. Variables mesurées de cinétiques de réponses EOG.

Illustration indiquant les différents paramètres cinétiques analysés (temps d'attaque en ms, temps de repolarisation en ms, surface en mv/s et amplitude en mv).

Test de comportement

Afin d'analyser les conséquences de la perturbation du système olfactif périphérique sur le comportement de l'animal, deux tests ont été réalisés : un test d'exploration du Lyral et un test de préférence. Avant d'effectuer les tests, les souris ont été habituées au dispositif comportemental.

Test d'exploration du Lyral

Principe : Il s'agit de déterminer le temps que passe la souris MOR23 exposée ou non au Lyral à sentir le Lyral. Ainsi nous pourrons savoir si l'exposition post-natale au Lyral affecte ou pas les performances olfactives de la souris.

Méthode : Le test de comportement évaluant l'exploration du Lyral de groupes de souris contrôles et de souris exposées au Lyral est réalisé à l'aide d'un dispositif de planches à trou (**figure 58**) couplé à un ordinateur d'acquisition des données (Mandairon, Sultan et al. 2009). Dans le trou est placé un récipient en verre contenant un morceau de coton sous une grille métallique recouverte par de la litière. Sur le coton sont déposés 120µl de substance. La substance testée est le Lyral dilué au 1000ème. Entre chaque passage, la planche est nettoyée à

l'alcool 70°C. Puis à chaque deuxième passage (1 passage par groupe de souris), la planche est nettoyée à l'alcool à 70°C puis séchée. Le coton contenant l'odeur est remplacé à l'extérieur de la salle d'expérimentation et un nouvel essai est effectué.

Le système de la planche à trou enregistre le temps passé par le nez de l'animal dans le trou à odeur. En effet, la présence du nez dans le trou induit une variation de capacitance. Celle-ci est détectée par un circuit intégré qui se trouve directement connecté à des électrodes recouvrant les parois du trou. Chaque essai (= un passage) dure 120 secondes.

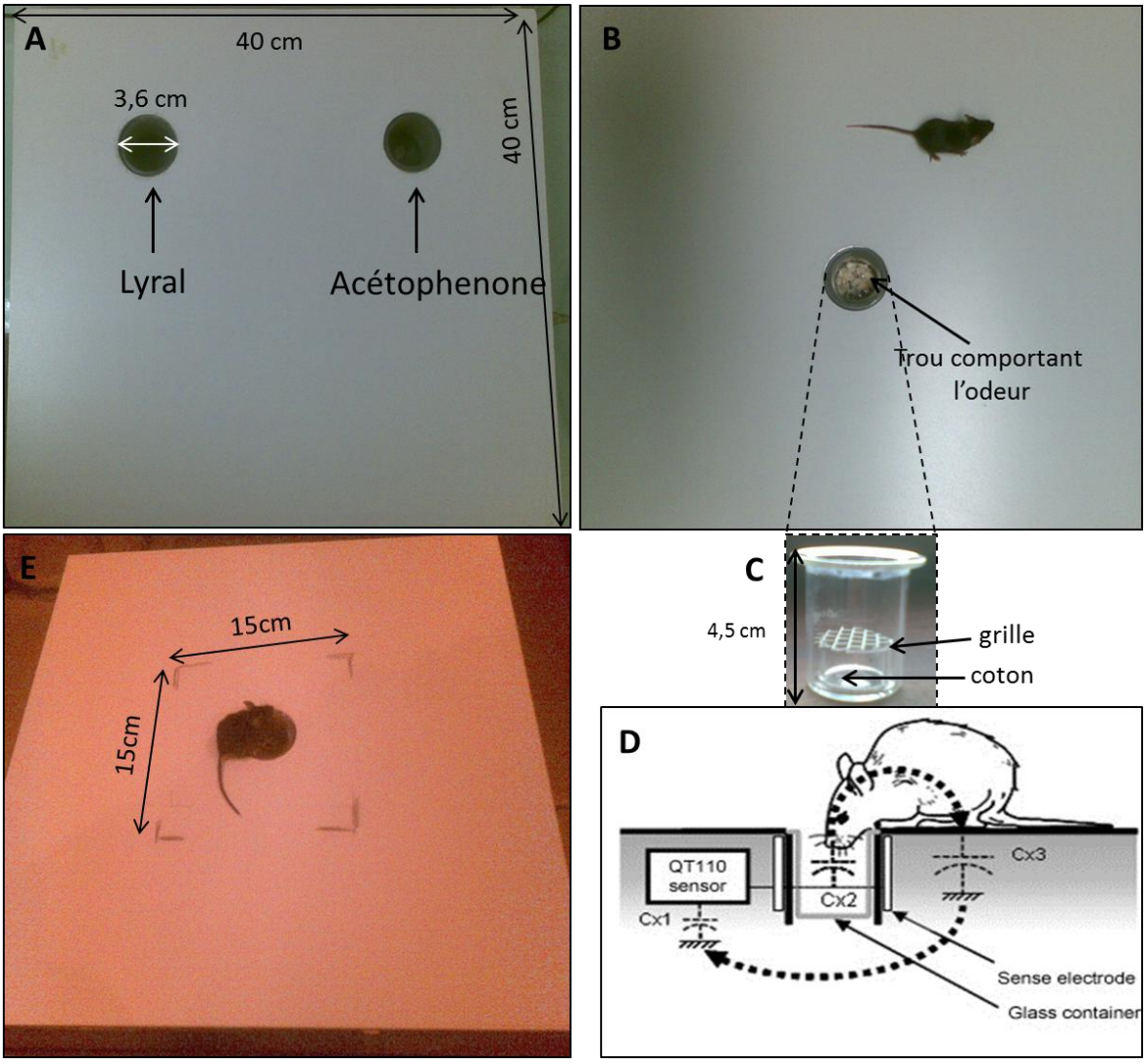


Figure 58. Planche à trou utilisée pour les mesures comportementales.

A- Configuration planche à deux trous (test de choix). **B**- Configuration planche à un trou (test d'exploration). **C**- Récipient en verre contenant l'odorant. **D**- Schéma du circuit intégré (QT110) connecté aux électrodes du trou (Mandairon, Sultan et al. 2009) . **E**- Planche à un trou avec « carré ».

Lors de ce test nous avons également mesuré à l'aide d'un chronomètre le temps passé à l'intérieur du carré (**figure 58 E**).

Test de préférence (discrimination)

Principe : Il s'agit de déterminer si les souris exposées développent une préférence pour le Lyral (éventuellement de comparer leur capacité à discriminer le Lyral Vs., une autre odeur).

Méthode : Pour cette étude comportementale, nous avons présenté au souris deux odeurs différentes (configuration planche à deux trous : **figure 58 A**) : le Lyral et l'acétophénone.

Le choix des concentrations des deux odorants s'est basé sur une méthode de calcul (Busto, Elie et al. 2009) permettant d'obtenir des solutions à pressions de vapeur égales. Ensuite nous mesurons le temps passé par la souris autour des trous. Le temps de l'essai est de 300 secondes.

Partie 2 : L'exposition postnatale au Lyral induit une modulation anatomique, moléculaire et physiologique des neurones MOR23.

Dans cette partie, nous évaluerons les conséquences anatomiques, moléculaires et physiologiques de l'exposition postnatale au Lyral sur le système olfactif.

Une étude de comptages de neurones MOR23 sur tout l'épithélium olfactif (septum + cornets), combinée à des résultats antérieurs d'analyse de densité de MOR23 sur la partie septale et dorsale de l'EO, nous permettra de constater l'effet de l'exposition sur le nombre de neurones MOR23.

Une analyse moléculaire globale et ciblée des neurones MOR23 nous montrera que l'odorisation des souris au Lyral pendant leur période de développement modifie le niveau d'expression de l'ARNm par neurone MOR23.

Et finalement, nous constaterons, à travers des analyses électrophysiologiques (à l'échelle unitaire et populationnelle), que l'exposition au Lyral induit des changements physiologiques des neurones MOR23, sans affecter celle de la population des neurones sensibles au Lyral.

Modifications anatomiques

Lors de premières expériences, l'équipe a découvert que l'exposition postnatale au Lyral conduisait à une modulation anatomique de l'épithélium olfactif. Une méthode de mesure de la densité des neurones olfactifs MOR23 GFP a montré une forte diminution. Cette méthode consiste à compter les neurones MOR23 par unité de surface d'explants olfactifs mis à plat.

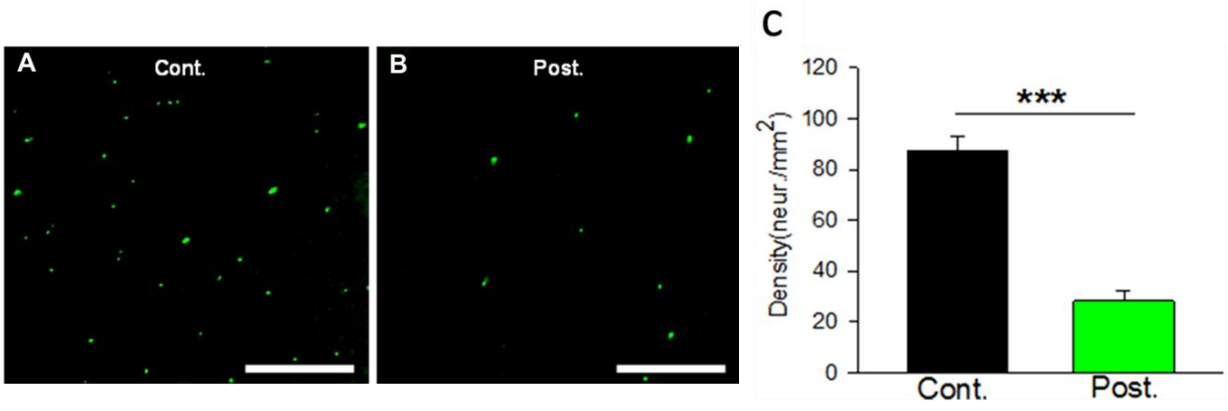
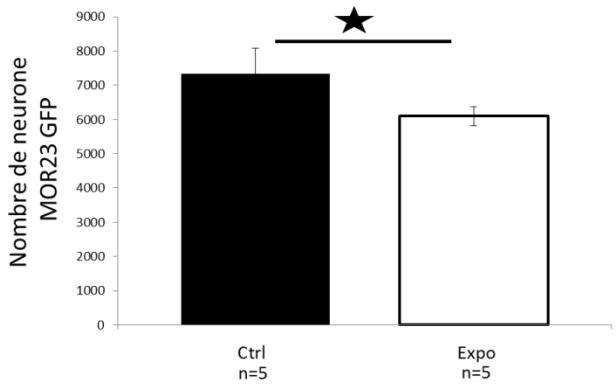


Figure 59. L'exposition au Lyral provoque une chute de la densité des neurones MOR23 GFP dans la partie septale de l'EO.

(**A**-**B**)-Images prises au confocal montrant une baisse de la densité de neurones MOR23GFP quand les souris sont exposées au Lyral entre J0 et J21. A. Contrôle (Cont.).(**B**)-Exposition postnatale (Post). Barre d'échelle : 200µm. (**C**)-histogramme montrant la baisse de la densité de neurones due à l'exposition postnatale. n=16 pour les contrôles et n=12 pour celles exposées. *** p<0,001 (Photos et histogrammes par Hervé Cadiou).

Cette observation a été confirmée par une étude de comptage de neurones MOR23GFP à partir de coupes coronales de l'épithélium olfactif. Sur un total de 30 lames recouvrant tout l'épithélium olfactif, une lame toute les 10 lames a été analysée. Soit au total 3/30 lames par souris. Chaque lame représente une zone de l'épithélium olfactif (voir matériel et méthode). J'ai donc multiplié tous mes résultats de comptage par 10.



Epithélium Entier	Ctrl	Expo	T
Nb de neurones MOR23	7336 ± 329	6098 ± 126	P=0,012

Figure 60. L'exposition au Lyral provoque une chute du nombre de neurones MOR23 GFP dans l'épithélium olfactif.

Histogramme indiquant le nombre de neurones olfactifs MOR23 de souris exposées au Lyral (Expo) ou non exposées (Ctrl). A droite de cet histogramme se trouve un tableau qui correspond aux résultats du comptage et les déviations standards (±) des neurones MOR23 GFP sur des épithéliums olfactifs entiers de souris contrôles et exposées. Les résultats de tests statistiques t de Student (T) indiquant les différences significatives (*p=0,012) et non significatives (ns) figurent sur le tableau.

Les résultats de comptage des neurones MOR23 GFP sur la totalité de l'épithélium montrent que l'exposition postnatale au Lyral (Expo) pendant 21 jours induit une diminution significative (p=0,012) du nombre de MOR23 de 16,5% par rapport aux souris non exposées (Ctrl). Nous avons 1268 neurones MOR23 en moins après exposition. Cette diminution est illustrée sur deux images de coupes histologiques de la zone médiane de l'épithélium olfactif (**figure 61 B**).

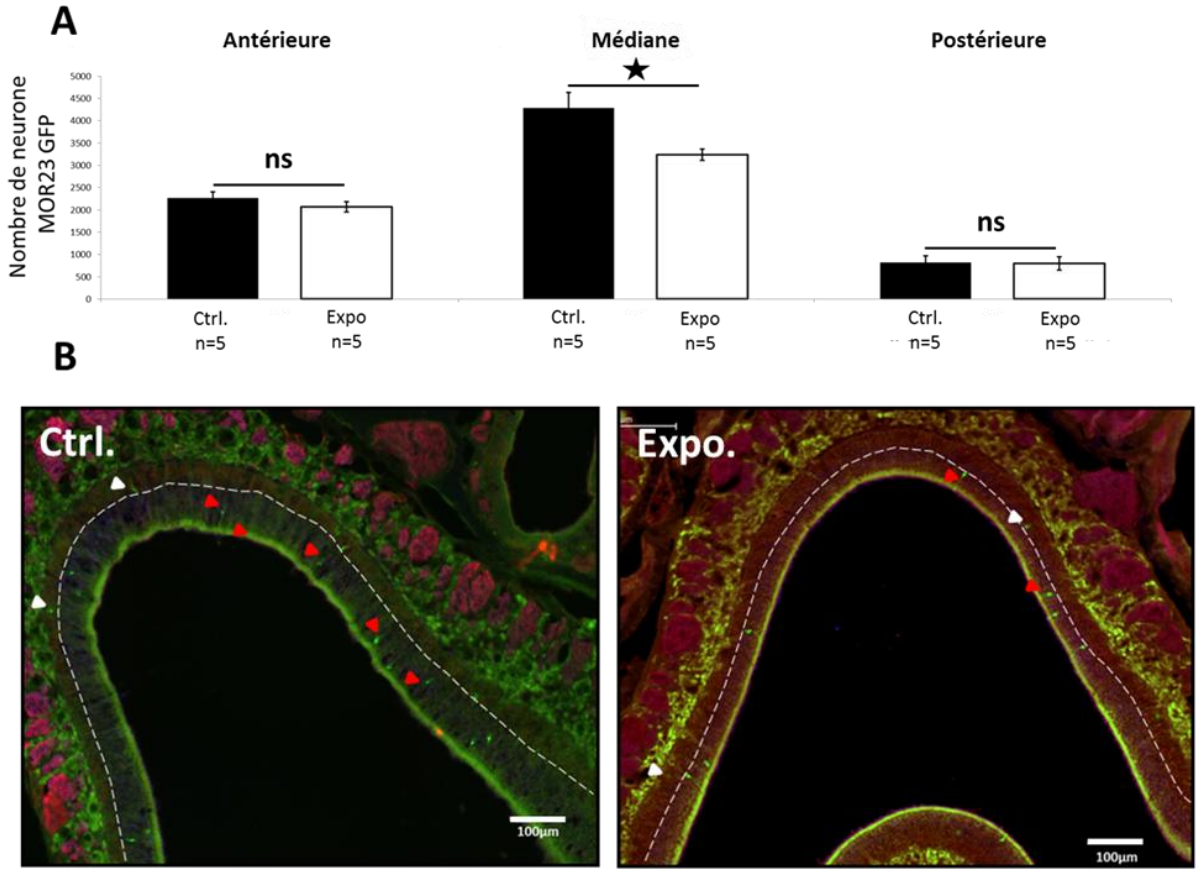


Figure 61. L'exposition au Lyral provoque une chute du nombre de neurone MOR23 GFP dans la partie médiane de l'épithélium olfactif.

A- Histogrammes indiquant le nombre de neurones olfactifs MOR23 de souris exposées au Lyral (Expo) ou non exposées (Ctrl) mesurés sur les trois parties de l'épithélium olfactif (antérieure, médiane et postérieure) **B-**. Image des coupes de la partie médiane de l'épithélium olfactif de souris non exposées (Ctrl) ou exposées (Expo) indiquant une baisse du nombre de neurones olfactifs MOR23 chez les souris exposées. Les neurones matures sont indiqués par une flèche rouge et les immatures par une flèche blanche. La limite entre la zone de neurones immatures (GAP43) et la zone des neurones matures (OMP) est indiquée par une ligne pointillée de couleur blanche.

Afin de déterminer si cette diminution est zonale, une étude de comptage de neurones MOR23 GFP a été réalisée sur les trois différentes zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane et antérieure).

Les résultats ont montré que la diminution du nombre de neurones ne concerne que la partie médiane de l'épithélium olfactif (**figure 61 A**).

Dans cette partie, l'exposition diminue le nombre total de neurones MOR23 GFP de 24% (4280±350 ***VS***. 3238±126 ; p=0,02). En revanche pour les deux autres zones (postérieure et antérieure), aucune différence significative du nombre de MOR23 n'est observée.

En résumé, ces résultats d'analyse histologique montrent que l'exposition au Lyral induit un changement anatomique de la muqueuse olfactive.
En effet notre analyse globale de comptage nous permet de conclure que l'exposition postnatale au Lyral induit une diminution du nombre de neurones MOR23. Cette diminution est localisée dans la partie médiane et fortement accentuée dans la partie septale et dorsale de l'épithélium olfactif. Le reste de l'étude a été réalisée sur la partie septale et dorsale de l'épithélium olfactif (appelé explant olfactif) pour deux raisons : 1- Facilité et reproductibilité de l'obtention de cette préparation. 2- Partie où le phénotype observé est le plus prononcé.

Face à cette diminution du nombre de neurones, nous nous sommes alors demandé si la souris était capable de pallier cette perturbation du système olfactif qui lui est vital. En d'autres termes, l'exposition induit-elle une adaptation des neurones olfactifs ? La première étape a été de vérifier, au moyen de techniques de biologie moléculaire, si la baisse de densité des neurones MOR23 est associée à une baisse de production des récepteurs MOR23.

Modifications moléculaires

Plusieurs méthodes sont possibles pour comparer le niveau d'expression du gène MOR23. 1- Le Western-Blot qui permet d'évaluer l'expression protéique. 2- La RT-qPCR qui permet de détecter des changements d'expression d'ARNm des gènes d'intérêts.
Comme l'anticorps spécifique au récepteur MOR23 n'est pour l'heure, pas disponible, nous avons réalisé une pseudo-quantification relative de l'expression de la protéine GFP. La pseudo-quantification relative consiste à comparer la densité de pixels de la bande GFP normalisée des souris exposées (Expo. ; n= 3) à des souris non exposées (CTRL. ; n=3). Nous avons mis en évidence une absence de diminution d'expression de la protéine.
Ensuite, nous avons réalisé une mesure comparative de l'expression d'ARNm du gène MOR23. La séquence du gène de MOR23 étant disponible, il est possible de comparer spécifiquement son expression à l'aide de séquences complémentaires appelées amorces. J'ai conçu des amorces ciblant spécifiquement la séquence complémentaire de l'ARNm de MOR23 (**mat & meth**). La quantification relative avec la réaction de transcription inverse suivie d'une PCR quantitative en temps réel est la méthode de choix pour mesurer le niveau

d'expression du gène MOR23. Sensible, spécifique et reproductible, la RT-qPCR permet de détecter de faibles changements d'expression des gènes (Bustin 2000).

J'ai donc effectué des RT-PCR quantitatives pour évaluer l'expression relative d'ARNm du gène MOR23 entre des souris exposées (Expo. n=12) ou non (CTRL. n=12) au Lyral.

Analyse moléculaire globale

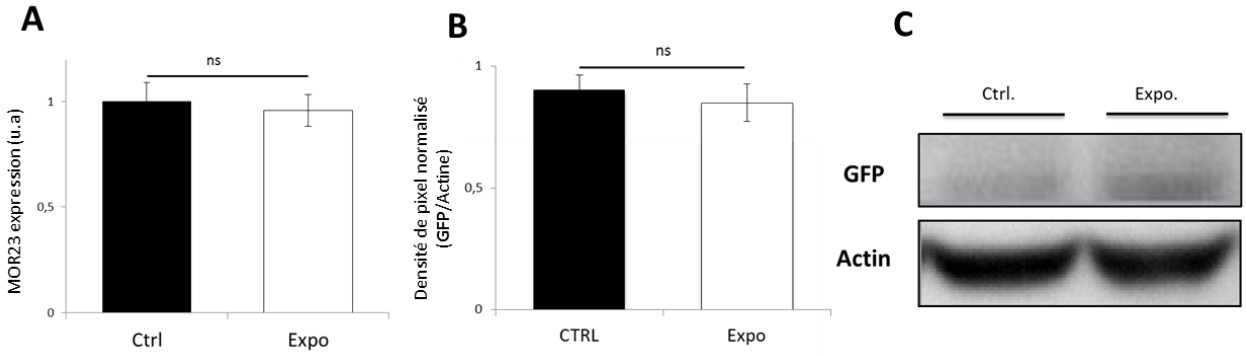


Figure 62. Conséquences de l'exposition postnatale au Lyral sur le niveau d'expression d'ARNm du récepteur MOR23 et de la protéine GFP à l'échelle du tissu.

(**A**)- Evaluation par RT-qPCR du niveau d'expression de l'ARNm de MOR23 dans l'EO de souris exposées ou non au Lyral pendant 21J. Les résultats ont été normalisés selon le niveau d'expression de Suclg et d'HPRT de chaque échantillon. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (u.a) et les valeurs obtenues pour les souris non exposées ont été arbitrairement fixées à 1 (n=12 pour les deux groupes). (**B – C**)-Etude de l'expression de la protéine MOR23 par western-blot à partir d'épithéliums olfactifs entiers de souris exposées ou non au Lyral pendant 21j.L'effet de l'exposition postnatale sur le niveau d'expression protéique du récepteur MOR23 a été évalué par la détection de la protéine GFP (n=3 pour les deux groupes). (**C**)-Les bandes de l'électrophoregramme ont été analysées par lecture densitométrique (à l'aide d'un photosenseur). (**B**)-histogramme montrant que l'exposition n'affecte pas le niveau d'expression de la protéine GFP. Les résultats sont présentés en densité de pixels de la bande GFP normalisée sur le contrôle de dépôt, l'actine.

Nos résultats montrent que sur des épithéliums olfactifs entiers, le niveau d'expression d'ARNm pour le récepteur MOR23 ne varie pas entre animaux contrôles et animaux exposés (**figure 62**).

Ensuite, j'ai analysé le niveau d'expression d'ARNm de la plupart des gènes impliqués dans la cascade de transduction olfactive par PCR en temps réel sur des plaques standardisées

fournies par « Applied biosystem ». Au total 19 gènes ont été étudiés à partir d'extraits d'épithéliums olfactifs de souris MOR23 exposées au Lyral pendant 21jours (n=4) ou non (n=4).

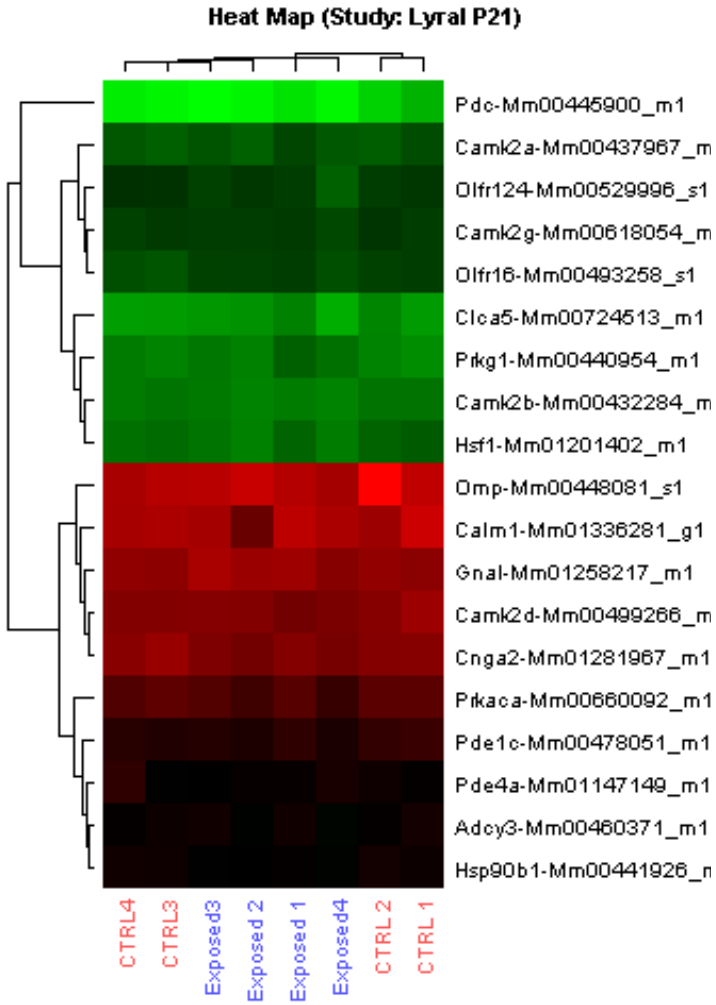


Figure 63. Groupement hiérarchique de 19 transcrits exprimé dans le neurone olfactif différentiellement exprimé lors de l'exposition postnatale au Lyral.

Chaque colonne correspond à un échantillon. Chaque ligne correspond à un gène (symbole du gène+Mus musculus + identifiant de l'essai taqman applied biosystem).
Les valeurs sont exprimées en ΔCt (3 controles endogènes : 18S, GAPDH et HPRT ont servi pour la normalisation de dépôt). Une case verte correspond à un gène sous-exprimé tandis que la case rouge correspond à un gène sur-exprimé. Les échantillons contrôles sont nommés « CTRL + numéro de la souris » et les échantillons exposés sont nommés « Exposed + numéro de la souris ». Le regroupement des transcrits s'est fait par mesure de distance euclidienne.

Une représentation très répandue en analyse des données de groupes de gènes consiste à fournir les résultats de regroupements hiérarchiques d'expression des gènes sous forme de tableau. Sur les colonnes, sont présentés les individus (souris) et sur les lignes, les variables (gènes). D'un point de vue mathématique, chaque case est considérée comme un vecteur d'un espace vectoriel muni d'un produit scalaire induisant une norme euclidienne et une distance entre ces cases. Chaque case correspond à une expression d'un gène appartenant à un échantillon (groupe de souris exposées ou souris contrôles). L'expression étant exprimée en

ΔCt (Δct= Ct gènes d'intérêts – Ct gènes endogènes). Les cases vertes correspondent aux gènes sous-exprimés tandis celles rouges correspondent aux gènes sur-exprimés.

Afin d'identifier les gènes régulés, le logiciel (Data Assist™) regroupe les gènes selon les ΔCt en utilisant la distance euclidienne.

En regardant les couleurs des colonnes des groupes exposés (exposed) et non exposés (CTRL), on ne remarque aucune variabilité de couleur. Ceci indique que l'exposition au Lyral n'induit pas de changement du niveau d'expression de l'ensemble des 19 gènes testés. Ces 19 gènes regroupent une grande partie des éléments de la cascade de transduction olfactive.

Analysis Results

Average CT | ΔCT | $2^{-\Delta CT}$ | Fold Change (RQ)

Assay	Type	CTRL (RQ)	CTRL (P-Value)	EXP (RQ)	EXP (P-Value)
18S-Hs99999901_s1	Candidate Control	1.0	1.0	1.0895	0.8563
Adcy3-Mm00460371_m1	Target	1.0	1.0	0.9253	0.7015
Calm1-Mm01336281_g1	Target	1.0	1.0	0.8086	0.6971
Camk2a-Mm00437967_m1	Target	1.0	1.0	1.1241	0.7517
Camk2b-Mm00432284_m1	Target	1.0	1.0	0.7345	0.2125
Camk2d-Mm00499266_m1	Target	1.0	1.0	0.8121	0.4311
Camk2g-Mm00618054_m1	Target	1.0	1.0	0.8859	0.6344
Clca5-Mm00724513_m1	Target	1.0	1.0	1.0626	0.8642
Cnga2-Mm01281967_m1	Target	1.0	1.0	0.7868	0.3915
Gapdh-Mm99999915_g1	Candidate Control	1.0	1.0	0.7401	0.8067
Gnal-Mm01258217_m1	Target	1.0	1.0	1.21	0.4776
Hprt-Mm01545399_m1	Selected Control	1.0		1.0	
Hsf1-Mm01201402_m1	Target	1.0	1.0	0.6567	0.4311
Hsp90b1-Mm00441926_m1	Target	1.0	1.0	0.7756	0.0267
Olfr124-Mm00529996_s1	Target	1.0	1.0	0.6711	0.4311
Olfr16-Mm00493258_s1	Target	1.0	1.0	1.14	0.7015
Omp-Mm00448081_s1	Target	1.0	1.0	0.6881	0.6971
Pdc-Mm00445900_m1	Target	1.0	1.0	0.3431	0.488
Pde1c-Mm00478051_m1	Target	1.0	1.0	0.8564	0.488
Pde4a-Mm01147149_m1	Target	1.0	1.0	0.8782	0.7015
Prkaca-Mm00660092_m1	Target	1.0	1.0	0.7819	0.4311
Prkg1-Mm00440954_m1	Target	1.0	1.0	1.811	0.4311

Tableau 10. Tableau indiquant les « RQ » et les « P-Value » des 19 gènes étudiés.

Pour avoir une vision plus exhaustive et précise du changement d'expression des gènes, les facteurs de régulation « *RQ* ou *fold change* » de chaque gène figurent sur un tableau (**tableau**). Le facteur de régulation représente le ratio des moyennes de $2^{-\Delta Ct}$ des gènes des

souris contrôles et des souris exposées, donné par la formule : $RQ = 2^{-\Delta Ct\ exposé}/2^{-\Delta CT\ contrôle}$. $2^{-\Delta CT} = 2^{-(CTgène\ d'intérêt-CTgène\ endogène)}$.

Nos résultats montrent que l'exposition n'affecte pas le niveau d'expression d'ARNm des gènes des éléments de la cascade de transduction olfactive.

En résumé : bien que la densité des neurones MOR23 diminue fortement après exposition au Lyral, le niveau d'expression des récepteurs MOR23 et des éléments de la cascade de transduction dans l'épithélium entier ne change pas. Cela nous conduit à l'hypothèse de départ suggérant une adaptation du système olfactif à l'échelle cellulaire. Est-ce que la quantité de récepteur par neurone change après exposition ? Afin de répondre à cette problématique, une analyse moléculaire ciblée sur la population de neurones MOR23 a été réalisée.

Analyse moléculaire sur population pure de neurones olfactifs d'intérêt (MOR23)

Stratégie :

Pour cette étude j'ai développé une méthode de dissociation des neurones olfactifs (**voir matériel et méthodes**).

En bref, l'épithélium fraîchement disséqué est dissocié mécaniquement et enzymatiquement. Les cellules sont déposées dans une chambre sous le microscope. Les neurones marqués par la GFP sont prélevés sous perfusion continue dans une pipette et déposés dans un tube de PCR contenant un stabilisateur d'ARN. J'ai réalisé cette étude sur de petits échantillons de 7 neurones, afin de minimiser les variations d'expression d'ARNm entre neurones.

Résultats :

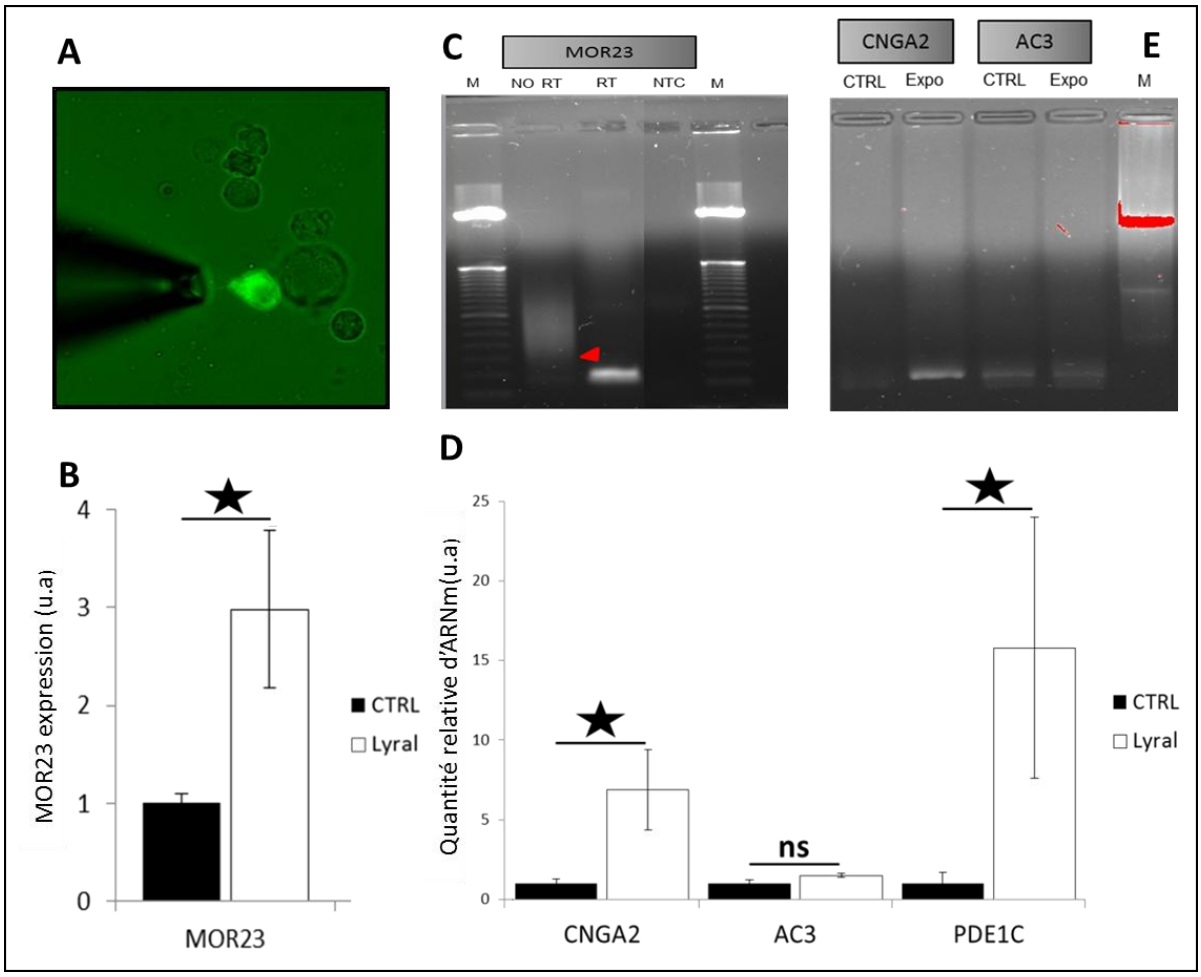


Figure 64. Evaluation des conséquences de l'exposition postnatale des souris au niveau cellulaire par RT-qPCR .

A- Illustration montrant la possibilité de discrimination entre les cellules GFP+ et les GFP- (à 488nm d'excitation) permettant le prélèvement des neurones MOR23 par pipette de patch. **B**- Histogramme montrant que l'exposition postnatale au Lyral induit une augmentation du niveau d'expression du récepteur MOR23 d'un facteur de 2,98 comparée au niveau d'expression des neurones non exposés (n=6 ; p<0,05). **C**- Cet électrophoregramme montre que l'amplification est spécifique. En effet, la piste où a été déposé le produit de réaction de RT-qPCR du milieu de dissociation (NTC) ne montre aucune bande. En revanche, la piste où a été déposé le produit de PCR à partir d'un échantillon d'ADNc (RT) issu de neurones dissociés montre une seule bande (flèche rouge). (**D, E**) De plus l'exposition postnatale induit une forte sur expression du niveau d'ARNm de CNGA2 (6,8 ; P<0,05) et de PDE1C (15,7 ; p<0,05) (n=4). En revanche le niveau d'expression d'AC3 n'est pas affecté (p = 0,13 ; n=4).

J'ai analysé le niveau d'expression du récepteur olfactif MOR23 ainsi que celui du canal couplé aux nucléotides cycliques CNGA2, de l'adénylate cyclase III, ACIII et de la phosphodiestérase 1C, pde1c, qui sont des pièces maîtresses de la transduction olfactive. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêts ont été normalisés par rapport aux niveaux

d'expression de Suclg. Le choix de ce gène normalisateur est basé sur une étude de la stabilité de l'expression des gènes entre les différents neurones MOR23 issus des deux groupes (souris contrôles Vs. souris exposées). Trois gènes couramment utilisés pour la normalisation ont été testés : Suclg (succinyl-coA ligase : ligase du cycle de Krebs), HPRT (hypoxanthine ribosyltransferase : impliqué dans le recyclage métabolique des nucléotides) et la β-actine (composant du cytosquelette). Pour cela, j'ai réalisé des RT-qPCR à partir de neurones MOR23 uniques issus de souris exposées ou pas au Lyral. Ensuite, j'ai représenté les distributions des CT de chaque gène sous forme de « box plot » (**figure 65**). Le gène de la GAPDH n'est pas représenté dans cette figure, car les 40 cycles de PCR n'ont pas suffi pour amplifier l'ADNc. En revanche nous avons constaté que les valeurs médianes des CT de Suclg (34,54 VS. 34,52 ; n=5 et n=12 ; p=0,4) sont plus stables entre les deux groupes (Ctrl *VS.* Expo) que celles de la β-actine (35,14 VS. 34,1 ; n=7 et n=5 ; p=0,1). De plus les Ct du gène Suclg entre les neurones MOR23 sont stables. Ainsi, nous avons retenu le gène suclg pour l'analyse des résultats de RT-qPCR.

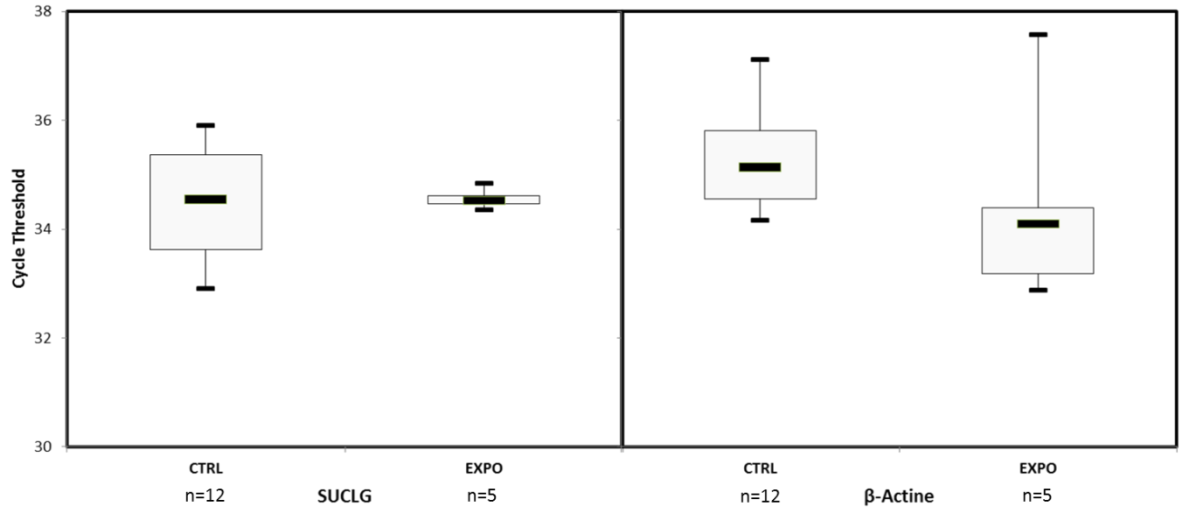


Figure 65. « boxplot » présentant les Ct des gènes de normalisation (Suclg et β-Actine) à partir de neurones MOR23 uniques.

Les deux boîtes de gauche montrent la distribution des Ct du gène suclg entre les deux groupes. Les deux boîtes de droite, présentent la distribution des Ct de la β-Actine.

Les résultats de qPCR montrent après exposition au Lyral, le niveau d'expression des ARNm du récepteur MOR23 est augmenté par un facteur de 2,98 ± 0,8 (n=6, p<0,05) et le niveau d'expression des ARNm d'AC3, de CNGA2 et de la Pde1 est respectivement augmenté par un facteur de (1,51 ± 0,53 ; n=5 ; non significatif), (6,88 ± 2,5 ; n=4 ; p<0,05) et de (15,79 ± , n=4 ; p<0,05) par rapport au niveau d'expression des neurones olfactifs non exposés. Pour contrôler la spécificité de nos réactions de PCR, nous réalisons pour chaque dissociation, des

PCR sur le milieu de dissociation. En effet, comme on peut le voir sur l'électrophoregramme (**figure 64 C**), la piste ou a été déposée le produit de RT-qPCR du milieu de dissociation (NTC : No Template Control) ne montre aucune bande. Les variables ΔCt des gènes analysés (MOR23, PDE1C, CNGA2 et AC3) utilisées pour les analyses qPCR en temps réel ont été représentées sous forme de « boxplot » (**figure 66**).

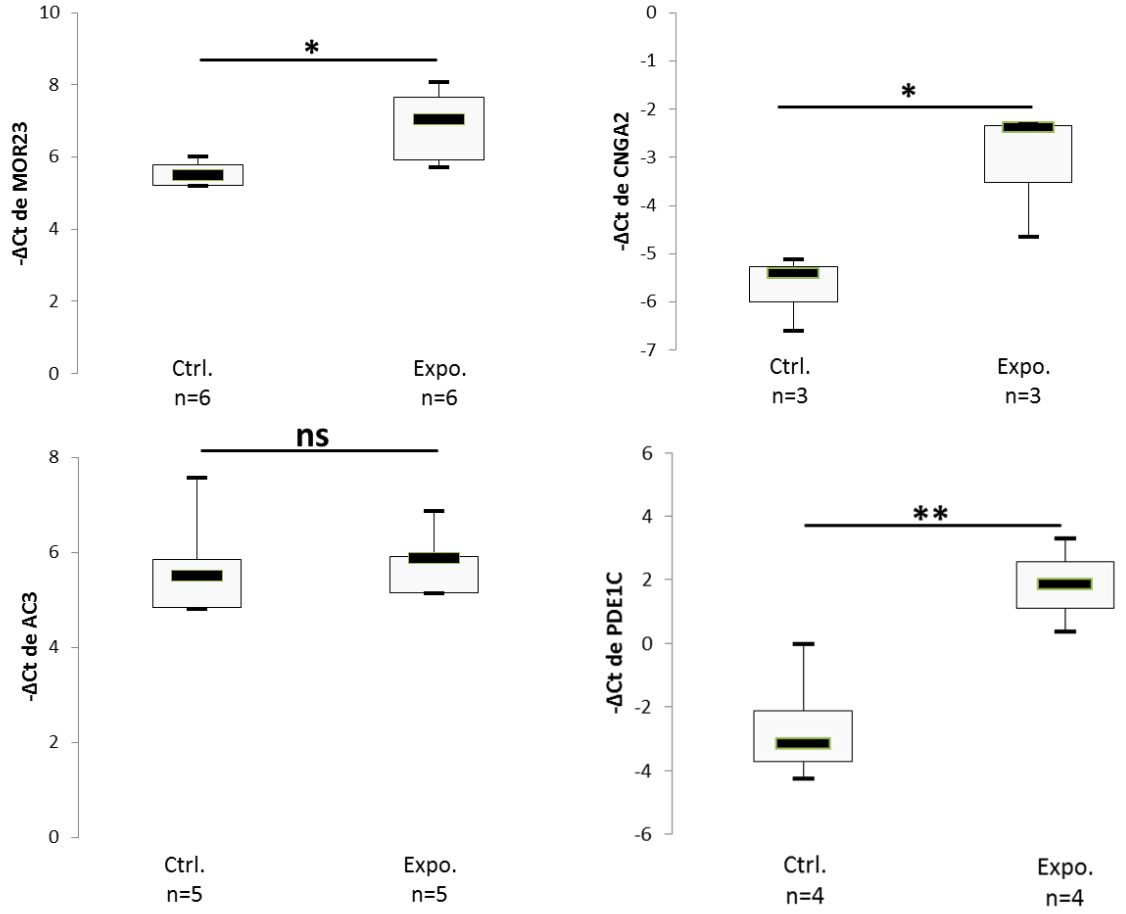


Figure 66. Diagrammes « boxplot » présentant les ΔCt des gènes analysés des neurones MOR23 entre les groupes de souris exposées et contrôles.

Les bloxplot présentent la répartition des valeurs obtenues pour les échantillons de neurones MOR23 de souris exposées (Expo.) et non exposées (Ctrl.). Les valeurs de Ct de chaque gène ont été normalisés par le Ct du gène de ménage Suclg par l'équation suivante : ΔCt= Ct [gène cible] – Ct [Suclg]. Les données de RT-qPCR des gènes (MOR23, CNGA2, PDE1C et AC3) ont été analysées en utilisant les variables ΔCt. Un test statistique de student a été utilisé pour comparer les distributions des ΔCt entre les groupes contrôles et les groupes exposés. (* : P<0,05 ; ** : <0,01 ; ns : non significatif).

La distribution des valeurs de ΔCt des gènes montrent que les variations biologiques de l'expression des gènes analysés sont faibles. D'autant plus que, pour les trois gènes (MOR23,

CNGA2 et PDE1C), les tests statistiques ont montré que les variations de la répartition des ΔCt des groupes contrôles et exposées sont significatives.

En résumé : l'exposition postnatale au Lyral conduit à une forte augmentation de la quantité d'ARNm du récepteur MOR23 exprimé par les neurones olfactifs. Cette forte augmentation n'est pas visible à l'échelle du tissu entier, du fait de la baisse de la densité des neurones MOR23 : on peut penser à une **compensation** de la diminution du nombre de neurones olfactifs par une augmentation de l'expression du récepteur par chaque neurone. Ces observations nous ont donc conduites à la question suivante : est-ce que les variations des niveaux d'expression du récepteur olfactif MOR23 et des pièces maîtresses de la cascade olfactive ont un impact sur la physiologie des neurones MOR23 et de l'épithélium olfactif ? Autrement-dit, quelles sont les conséquences physiologiques de cette surexpression de protéines indispensables au signal olfactif sur le codage olfactif des neurones MOR23 en réponse à une stimulation odorante ?

Modifications physiologiques

Contexte :

Analyse électrophysiologique à l'échelle du neurone

Pour cette étude, une approche de patch-clamp perforé a été réalisée **dans l'équipe** afin d'analyser les propriétés électriques des neurones olfactifs de souris contrôles et exposées au Lyral. Il s'agit dans cette technique d'approcher une électrode d'enregistrement sur les boutons olfactifs de neurones MOR23 marqués à la GFP et d'appliquer différentes concentration de Lyral afin de stimuler une réponse olfactive. En fonction du mode imposé (voltage ou courant), on peut soit, enregistrer des courants de réponse, soit des potentiels de membrane. Une analyse des différents paramètres cinétiques est ensuite réalisée, incluant dans notre cas, l'amplitude de courant, le temps que met le courant pour atteindre 90% de réponse (qui traduit la rapidité ou l'attaque de la réponse), le temps de repolarisation et la surface de courant sous la courbe. Le temps de repolarisation et la surface de courant sous la courbe reflètent le temps de réponse.

Cette étude a montré que les neurones deviennent plus sensibles aux odorants puisque les neurones MOR23 de souris exposées (appelés cellules exposées) répondent à des concentrations plus basses, comme on peut le voir dans les courbes dose-réponse (10^{-8} M *versus* 10^{-7} M pour les contrôles) (figure C). De plus, les cellules exposées ont un temps de repolarisation et une surface de courant moins importante que les neurones MOR23 non exposés (appelé cellules non exposées). Cela signifie que les cellules exposées ont un temps de réponse plus long que celui des cellules non exposées. Et finalement, l'analyse du temps d'attaque de la réponse montre que les neurones exposés répondent plus rapidement que les neurones contrôles.

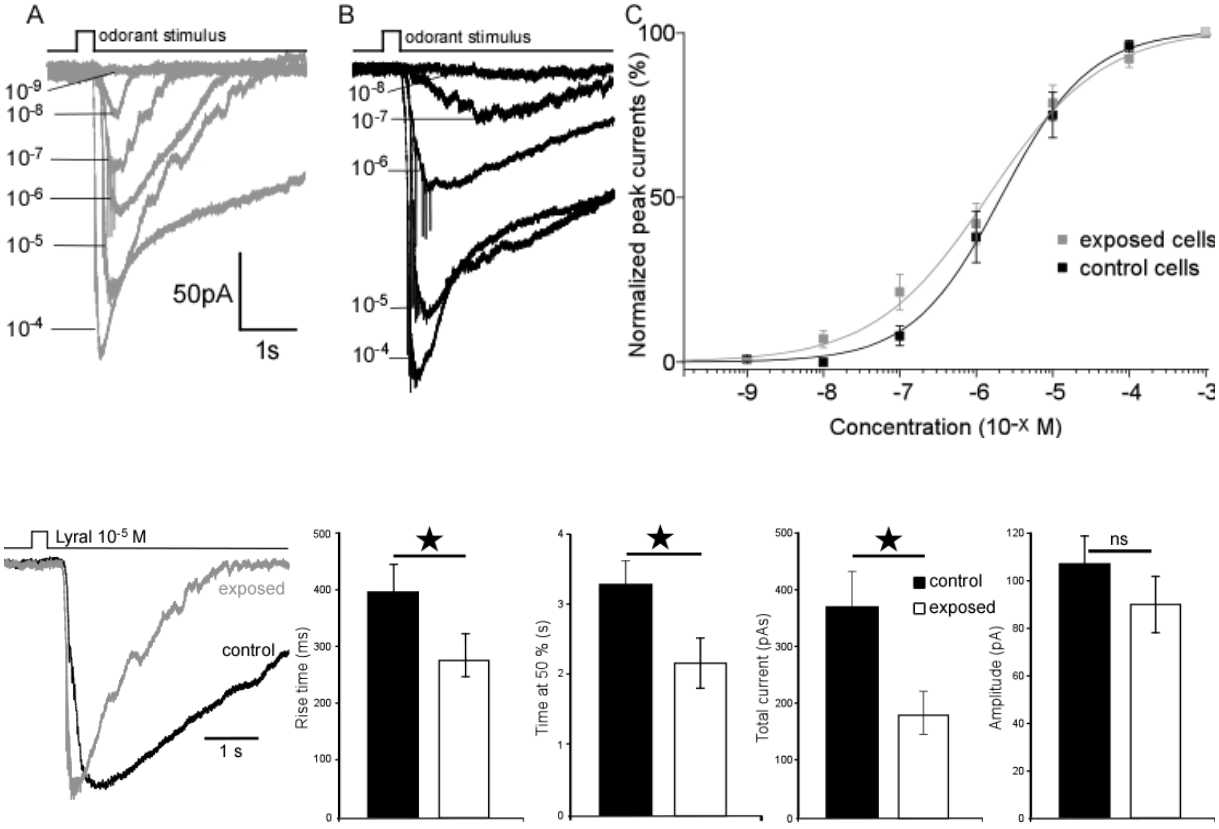


Figure 67. Conséquences de l'exposition sur les propriétés électriques des neurones MOR23.

Exemples d'enregistrements de courants de neurones MOR23 issus de souris exposées (**A**) ou non (**B**) au Lyral. **C**- Courbes dose-réponse des courants normalisés à l'amplitude du courant maximal. Les histogrammes indiquent les changements du temps d'attaque (rise time), du temps de repolarisation (time at 50%) et de la surface totale de courant (Total current) en réponse à une stimulation de 10µM de Lyral observée chez les neurones de souris exposées au Lyral. L'amplitude de réponse au Lyral ne varie pas entre les deux groupes.

En résumé, cette étude électrophysiologique à l'échelle des neurones olfactifs a montré que l'exposition au Lyral augmente la sensibilité des neurones et leur rapidité de réponse au Lyral. Ceci peut être lié à l'augmentation du niveau de récepteur et des élements de la cascade tel

(CNGA2) par neurone. De plus on a pu voir que les neurones exposés ont un temps de repolarisation plus court ce qui peut être corrélé à une augmentation du niveau d'expression de la phosphodiestérase. La phosphodiéstérase est impliquée dans la terminaison de la réponse olfactive.

Ainsi, on a pu voir, grâce à cette étude électrophysiologique à l'échelle de la cellule unique, que non seulement la baisse de densité des neurones MOR23 est accompagnée par une modulation de l'expression des molécules d'ARNm des neurones MOR23, mais aussi par une modification de leur physiologie.

Face à ces observations, nous nous sommes demandés si cette augmentation de la sensibilité des neurones est en quelque sorte un moyen de maintenir l'état de sensibilité de l'épithélium olfactif au Lyral. En vue de répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences d'électroolfactogramme (EOG). Cette technique permet d'évaluer les propriétés électriques (sommation des potentiels récepteurs des neurones olfactifs) de l'ensemble des neurorécepteurs sensibles au Lyral. Il faut noter, que parmi ces neurones olfactifs sensibles au Lyral, certains d'entre eux n'expriment pas le récepteur MOR23.

Analyse électrophysiologique à l'échelle du tissu

Stratégie :

Afin d'évaluer les conséquences de l'exposition postnatale au Lyral durant la période postnatale sur les propriétés électriques des neurones sensibles au Lyral, nous avons réalisé des enregistrements d'EOG (**figure 68**) en phase gazeuse sur la partie septale de la muqueuse olfactive. 11 souris exposées et 5 souris non exposées ont été analysées. Différents odorants ont été appliqués sur ces muqueuses olfactives, dont le Lyral. Dans cette partie, je n'aborderai que les résultats obtenus suite à l'application du Lyral.

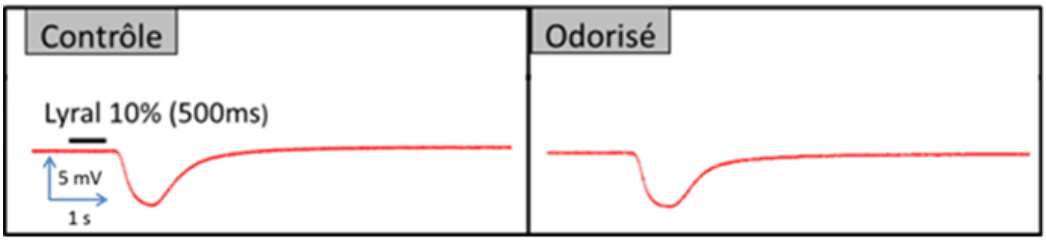
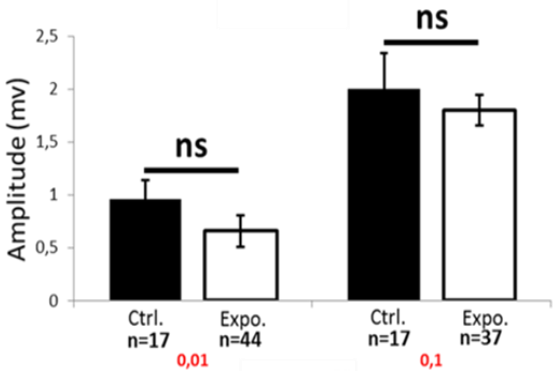


Figure 68. Illustration indiquant les enregistrements extracellulaires en potentiel de champ.

Analyse d'amplitudes de réponses

L'analyse d'amplitudes (brute), à partir des enregistrements de réponses a révélé que l'exposition postnatale au Lyral n'affecte pas l'amplitude de réponses au Lyral. En effet les différences d'amplitude de réponses aux concentrations de Lyral dilué au 10ème (Lyral 10%) et au 100ème (Lyral 1%) entre les souris contrôles (17 enregistrements) et les souris exposées (44 enregistrements pour 0,01 et 37 pour 0,1) sont non significatives (**figure 69**).



	Lyral 1%		Lyral 10%	
Groupe	Ctrl.	Expo.	Ctrl.	Expo.
Amplitude (mv)	0,95	0,65	2	1,8
SEM (mv)	0,17	0,15	0,33	0,4
Test –t Student	P=0,18		P=0,5	

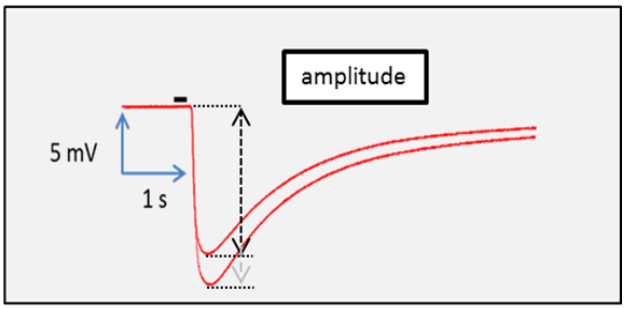


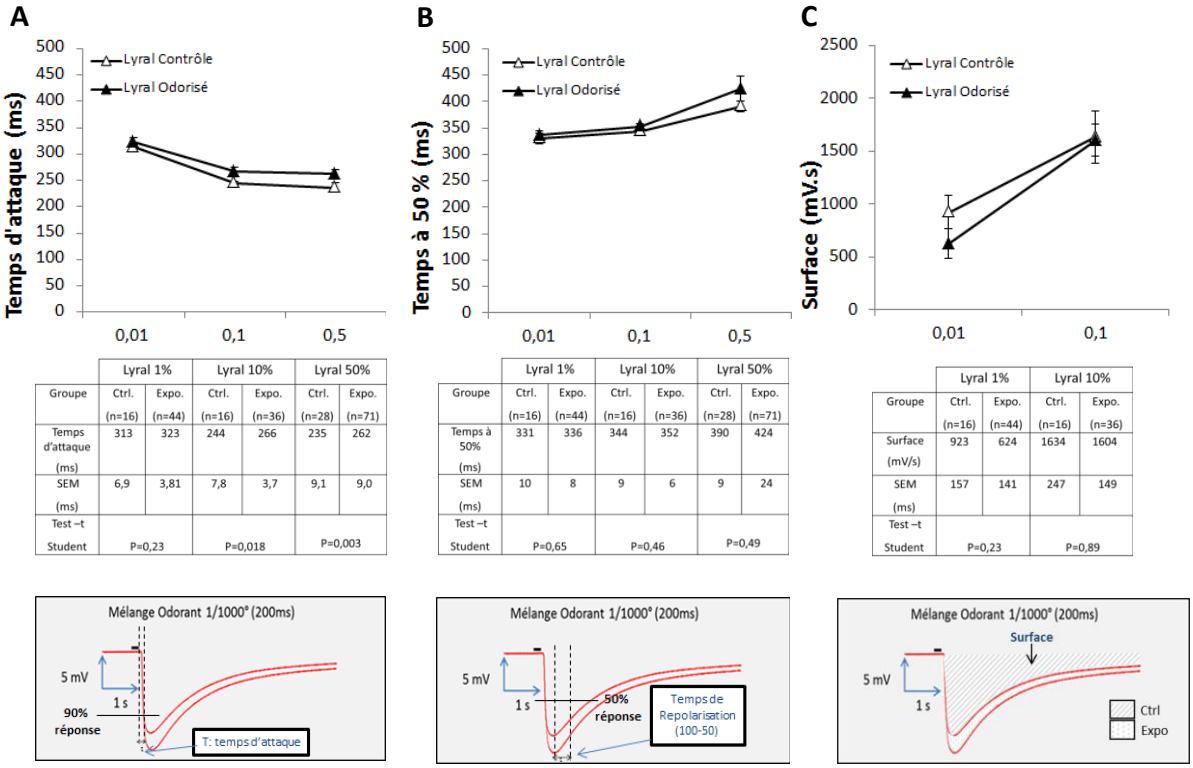
Figure 69. Conséquence de l'exposition sur l'amplitude de réponse au Lyral.

Histogrammes indiquant les amplitudes de réponses à deux concentrations de Lyral (dilué 10X et 100X) sur des souris exposées ou pas au Lyral. (ns= différence non significative).
A droite, se trouve un schéma montrant la façon de mesurer l'amplitude à partir d'enregistrements.

Conclusion :

L'exposition de la muqueuse au Lyral induit une modification de la densité des neurones MOR23 et de leur physiologie. Toutefois, nous avons montré en EOG que l'exposition ne perturbe pas la réponse de la muqueuse au Lyral. Ceci peut être dû à deux raisons. 1- La sensibilisation fonctionnelle des neurones MOR23 permet de maintenir le niveau de l'amplitude de réponse au Lyral, en compensant la baisse des neurones. Il est cependant probable que tous les neurones n'exprimant pas le récepteur MOR23, mais sensibles au Lyral, aient subi les mêmes changements moléculaires et physiologiques que les neurones MOR23. 2- Uniquement une population de neurones parmi plusieurs populations de neurones sensibles au Lyral (MOR23) est affectée par l'exposition.

Analyse de la cinétique de réponse :



Groupe	Lyral 1% Ctrl. (n=16)	Lyral 1% Expo. (n=44)	Lyral 10% Ctrl. (n=16)	Lyral 10% Expo. (n=36)	Lyral 50% Ctrl. (n=28)	Lyral 50% Expo. (n=71)
Temps d'attaque (ms)	313	323	244	266	235	262
SEM (ms)	6,9	3,81	7,8	3,7	9,1	9,0
Test –t Student	P=0,23		P=0,018		P=0,003	

Groupe	Lyral 1% Ctrl. (n=16)	Lyral 1% Expo. (n=44)	Lyral 10% Ctrl. (n=16)	Lyral 10% Expo. (n=36)	Lyral 50% Ctrl. (n=28)	Lyral 50% Expo. (n=71)
Temps à 50% (ms)	331	336	344	352	390	424
SEM (ms)	10	8	9	6	9	24
Test –t Student	P=0,65		P=0,46		P=0,49	

Groupe	Lyral 1% Ctrl. (n=16)	Lyral 1% Expo. (n=44)	Lyral 10% Ctrl. (n=16)	Lyral 10% Expo. (n=36)
Surface (mV/s)	923	624	1634	1604
SEM (ms)	157	141	247	149
Test –t Student	P=0,23		P=0,89	

Figure 70. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur les paramètres de cinétique de réponse au Lyral.

A- Graphes indiquant les temps d'attaque de réponses à trois concentrations de lyral (dilué 2X, 10X et 100X) obtenus sur des souris exposées ou non au Lyral. **B**- Graphes indiquant les temps de repolarisation (depuis l'amplitude maximale à 50% de l'amplitude). **C**- Graphes indiquant les surfaces de réponses à deux concentrations de lyral (10X et 100X).
En bas des graphes, se trouvent les tableaux indiquant les valeurs et les résultats des tests statistiques. En dessous des tableaux se trouvent des schémas montrant la façon de mesurer les différents paramètres cinétiques à partir des enregistrements.

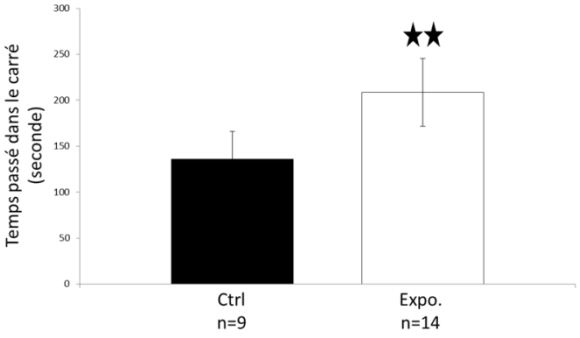
L'évaluation des paramètres cinétiques de réponses au Lyral, incluant le temps de repolarisation (100-50), la surface de réponse et le temps d'attaque de réponses, a ensuite été analysée. Nos résultats montrent qu'aucun des paramètres cinétiques n'a été modifié par l'odorisation des souris, excepté le temps d'attaque. En effet le temps d'attaque de réponses à deux concentrations de Lyral 10% et 50% est significativement plus important chez les souris exposées que les souris contrôles (respectivement 266 ± 3,7 ms *Vs.* 244 ± 7,8 ms avec p = 0,018 et 262 ± 9 ms *Vs.* 235 ± 9,1 ms avec P = 0,003). Toutefois, l'acétophénone très concentré (1%) semble quasiment toxique pour la muqueuse et donc, les réponses réalisées après et obtenues pour le Lyral le plus concentré (Lyral 50%), sont à prendre avec précaution.

L'ordre d'application des odorants étant : MOP1‰, HM, LY1%, LY10%, ACE 1‰, ACE1%, ACE 10%, Re MOP 1‰ (contrôle de « survie » de la préparation) et LY 50% **(figure 70)**.

Modifications comportementales

Deux groupes de souris (souris exposées et non exposées) ont été soumis à un test d'exploration. Le groupe contrôle est constitué de 10 souris tandis que le groupe exposé est constitué de 15 souris. La solution de Lyral employée dans le test est diluée 1000 fois dans de l'huile minérale. Pour chaque essai (un essai = une souris), nous enregistrons les durées des visites ainsi que le temps passé dans le carré. La solution de Lyral diluée est placée dans le trou.

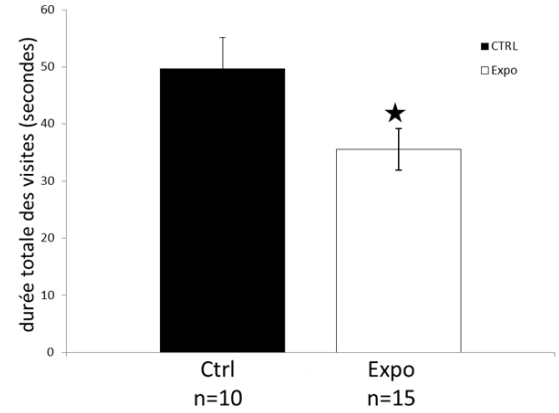
Nos données montrent que les souris exposées passent plus de temps dans le carré mais moins de temps à mettre leur nez dans le trou (**figure 71** et **72**).



Temps passé (seconde)	Ctrl	Expo	T
Lyral (1/100)	136± 30	208 ± 36	P=0,0003

Figure 71. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur le temps d'exploration du Lyral (dilué au 100ème).

Histogramme indiquant les temps d'exploration du Lyral (dilué 100X) par les souris contrôles (n=9) et les souris exposées (n=14). A droite, figure le tableau des valeurs.

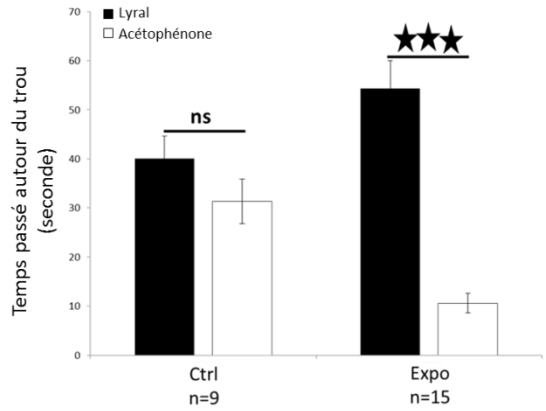


Temps passé (seconde)	Ctrl	Expo	T
Lyral (1/100)	49± 5,4	35 ± 3,6	P=0,04

Figure 72. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur le temps passé dans le carré (dilué au 1000ème).

Histogramme indiquant les temps passés dans le carré (dilué 100X) par les souris contrôles (n=10) et les souris exposées (n=15).

Ensuite nous avons réalisé un test de choix entre deux odeurs (le Lyral et l'acétophénone), afin de savoir si les souris exposées développent une préférence pour le Lyral. De plus, nous voulions savoir si leur capacité à discriminer le Lyral, versus une autre odeur, est modifiée.
En effet nos résultats suggèrent soit: que les souris préfèrent l'odeur à laquelle elles ont été exposées, soit qu'elles discriminent mieux les deux odeurs. Elles passent significativement 40 secondes de plus à sentir le Lyral que l'acétophénone (54s ± 5,7 VS 10s ± 2 ; $p=1.10^{-6}$). En revanche les souris contrôles passent autant de temps à sentir le Lyral qu'à sentir l'acétophénone.



Temps passé (seconde)	Lyral	Acéto	T
CTRL	40± 4,5	31 ± 4,6	P=0,1
Expo	54 ± 5,7	10 ± 2	$P=1.10^{-6}$

Figure 73. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur la préférence entre deux odeurs.

Histogrammes indiquant que les souris exposées passent plus de temps à sentir le Lyral (Contrôles : n=9 et Expo : n=15).

Conclusion (partie II) :

En résumé, la baisse du nombre de neurones MOR23 GFP est accompagnée par une surexpression du récepteur olfactif MOR23 par neurone, ainsi que de certains éléments clés de la cascade de transduction du signal olfactif. L'étude électrophysiologique, à l'échelle du neurone (patch-clamp perforé), menée au laboratoire, a montré que les neurones exposés ont subi des changements de leurs propriétés électrophysiologiques. Ils sont plus sensibles au Lyral, avec à la fois une réponse plus rapide et plus courte. Les souris exposées développent soit une préférence pour le Lyral et/ou une meilleure faculté à discriminer le Lyral.

Toutefois, une étude de potentiel de champ (EOG) a montré que l'exposition ne modifie, ni l'amplitude, ni les propriétés cinétiques, de manière générale, de la réponse olfactive suite à l'application du Lyral.

Partie 3 : L'exposition au Lyral n'affecte pas l'état général du tissu olfactif

Contexte et but :

Il a été montré en EOG que certains agents à propriétés toxiques provoquent une perte de l'olfaction (Tierney, Ross et al. 2007; Little, Calfee et al. 2012).

Comme le Lyral est une substance potentiellement toxique, nous avons procédé à l'analyse d'une éventuelle toxicité de la muqueuse olfactive par la méthode d'EOG.

De plus, d'autres récentes études (Xie, Zhou et al. 2010; Xie, Zhou et al. 2011) ont montré que la toxicité de la muqueuse olfactive est accompagnée par l'induction de certaines enzymes de métabolisation. Ces enzymes pourraient être des marqueurs de la toxicité de la muqueuse olfactive dans le cas de l'exposition au Lyral. C'est pourquoi, j'ai analysé par RT-qPCR l'expression de certains de ces gènes de détoxification. D'autres gènes spécifiquement exprimés au niveau de l'épithélium olfactif ont été analysés dans le but d'avoir une indication sur l'état « transcriptomique » du tissu. Ces gènes candidats ont été montré comme étant régulés par l'exposition à l'odeur (Barbour, Neuhaus et al. 2008) et par la privation sensorielle (Coppola and Waggener 2012).

Il a aussi été montré que l'une des conséquences de la toxicité du tissu olfactif est une modification de son aspect histologique (Woutersen, Appelman et al. 1984). Ainsi, dans cette partie, seront abordés les résultats d'analyses histologiques de la muqueuse olfactive de souris exposées ou non au Lyral.

Le but de cette partie est d'écarter tout effet aspécifique inhérent à une toxicité du tissu provoquée par l'exposition au Lyral.

Analyse fonctionnelle (Electroolfactogramme)

Analyse de l'amplitude de réponses

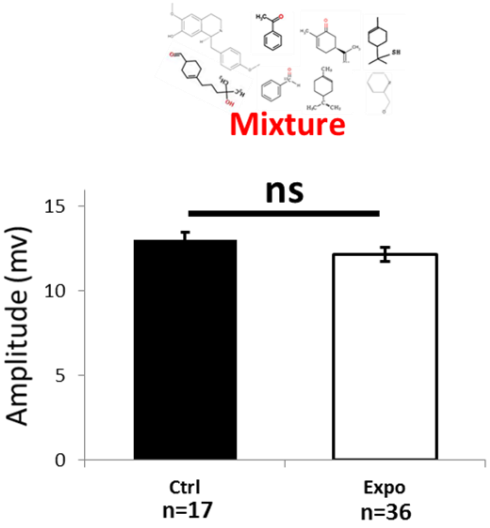


Figure 74. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur l'amplitude de réponses au mélange d'odorants.

Histogrammes indiquant les amplitudes de réponses au mélange d'odorants (dilué 1000X) sur des souris exposées ou pas au Lyral. (ns= différence non significative).

L'analyse d'amplitudes, à partir des enregistrements de réponses, a révélé que l'exposition postnatale au Lyral n'affecte pas l'amplitude de réponses à un mélange d'odorants. En effet, les différences d'amplitude de réponses entre les souris contrôles (13,03 ± 0,45 mV ; n=17) et les souris exposées (12,16 ± 0,39 mV ; n=36) sont non significatives (P=0,156) (**figure 74**).

Analyse de la cinétique de réponse.

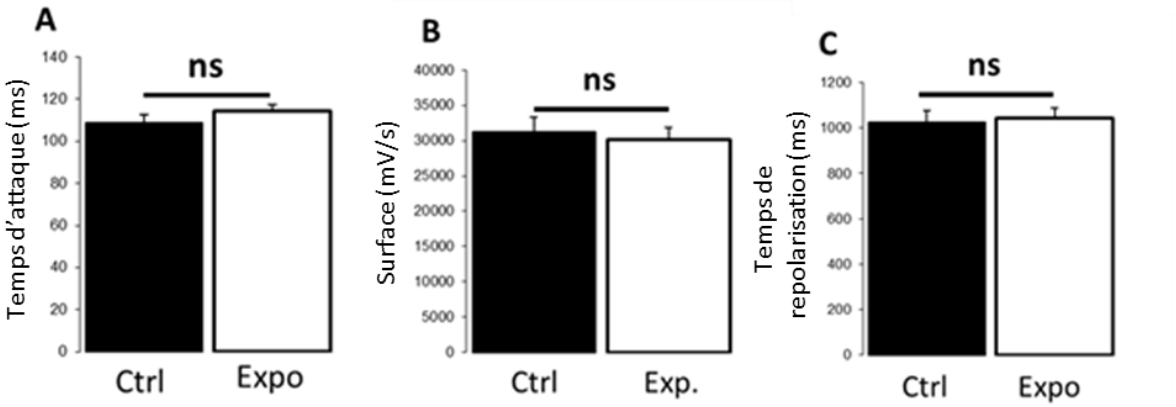


Figure 75. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur les paramètres de cinétique de réponses au mélange d'odorants.

Ces histogrammes indiquent les temps d'attaque de réponses au mélange d'odorants (dilué 1000X) obtenus sur des souris exposées ou pas au Lyral **(A)**, les surfaces de réponses au mélange d'odorants (1000X dilué) (**B)** et les temps de repolarisation (depuis l'amplitude maximale à 50% de l'amplitude) (**C**).

L'évaluation des paramètres cinétiques de réponses à la mixture d'odorants incluant : le temps de repolarisation (100-50), la surface de réponse et le temps d'attaque de réponse ont ensuite été analysés. Nos résultats montrent qu'aucun de ces paramètres n'a été modifié par l'odorisation des souris au Lyral pendant 21 jours (**figure 75**).

En résumé, de manière générale, les propriétés électriques de l'épithélium olfactif sont inchangées suite à l'exposition postnatale à l'odeur. Ces résultats laissent penser que l'état fonctionnel du tissu est intact après exposition au Lyral.

Analyse moléculaire (RT-qPCR)

Dans le but d'évaluer « l'état transcriptionnel » de la muqueuse olfactive de souris exposées, j'ai effectué une étude comparative de 41 gènes par RT-PCR quantitative. 4 souris de chaque groupe ont été utilisées pour cette étude. Les données sont présentées sous forme de « Heat Map » et de tableaux de valeurs.

L'analyse des transcrits des gènes impliqués dans la neurogénèse olfactive comme IGF1 (Quantité relative (RQ) : 1,5 ; P-value (p-v) : 0,28 ; n=4) (impliqué dans la survie et la différenciation des cellules basales en neurones olfactifs : (McCurdy, Feron et al. 2005), LIF

(RQ : 0,7 ; p-v : 0,4 ; n=4) (facteur anti-apoptotique et mitotique (Mathonnet, Cubertafond et al. 2001) et d'autres (TGF alpha, HSF-1 et NGF), n'a montré aucune différence significative des niveaux d'expressions d'ARNm entre le groupe contrôle et le groupe exposé (**figure 76**).
Il en est de même 1- pour les filaments intermédiaires (cytokératine, gelsoline, vimentine) impliqués dans le maintien de la structure de neurones olfactifs et de l'épithélium. 2- La gelsoline impliquée dans plusieurs autres processus cellulaires, comme dans l'apoptose. 3- En outre la vimentine, qui est un marqueur des cellules souches (que l'on trouve également exprimé dans les neurones olfactifs matures), joue un rôle important dans la régénération des neurones (**figure 76**).

L'analyse des gènes induits par des polluants exogènes (toxiques) comme les enzymes de métabolisation (1ère phase de detoxification) de la famille des cytochromes P450, en particulier CYP1A2 (RQ : 0,9 ; p-v : 0,64 ; n=4) et CYP2A5 (RQ : 0,8 ; p-v : 0,4 ; n=4) et des enzymes de la deuxième phase de détoxification (Gst m, alpha et pi) n'ont montré aucune différence entre les deux groupes (Wardlaw, Nikula et al. 1998; Xie, Zhou et al. 2010). CYP1A2, dont l'abondance est unique en dehors du foie et CYP2A, sont les formes majeures des enzymes de métabolisation présentes dans la MO. CYP2A5 représente 30% des CYP de la MO. En effet, il a été montré que le 2,6-dichlorobenzonitril (DCBN) induit une toxicité dans la MO, à travers l'induction du cytochrome CYP2A5 (Xie, Zhou et al. 2010). CYP1A2 est une forme inductible dans la muqueuse par la fumée de cigarette (Wardlaw, Nikula et al. 1998).

Les gènes candidats de la liaison de l'odorant (OBP1A et MUP-5) ne montrent également pas de modification du niveau d'expression des transcrits lors de l'exposition au Lyral (**figure 76**)
Et finalement, l'analyse de quelques gènes responsables de la liaison du calcium (Annexine A5, calbinding 2 et Gp96) montre une différence significative d'expression de la calbinding 2 et de la GP96. Ces deux protéines sont impliquées dans la modulation du calcium intracellulaire. L'annexine A5 est classiquement connue comme étant un marqueur d'activité apoptotique.

Le « Heat Map » (**figure 76**) ne montre pas de variabilité de couleur d'expression des gènes entre les différents échantillons.
Afin d'avoir une représentation plus précise du niveau d'expression de chaque gène dans le tissu olfactif, j'ai dressé un tableau avec les valeurs ΔCt de chaque gène.

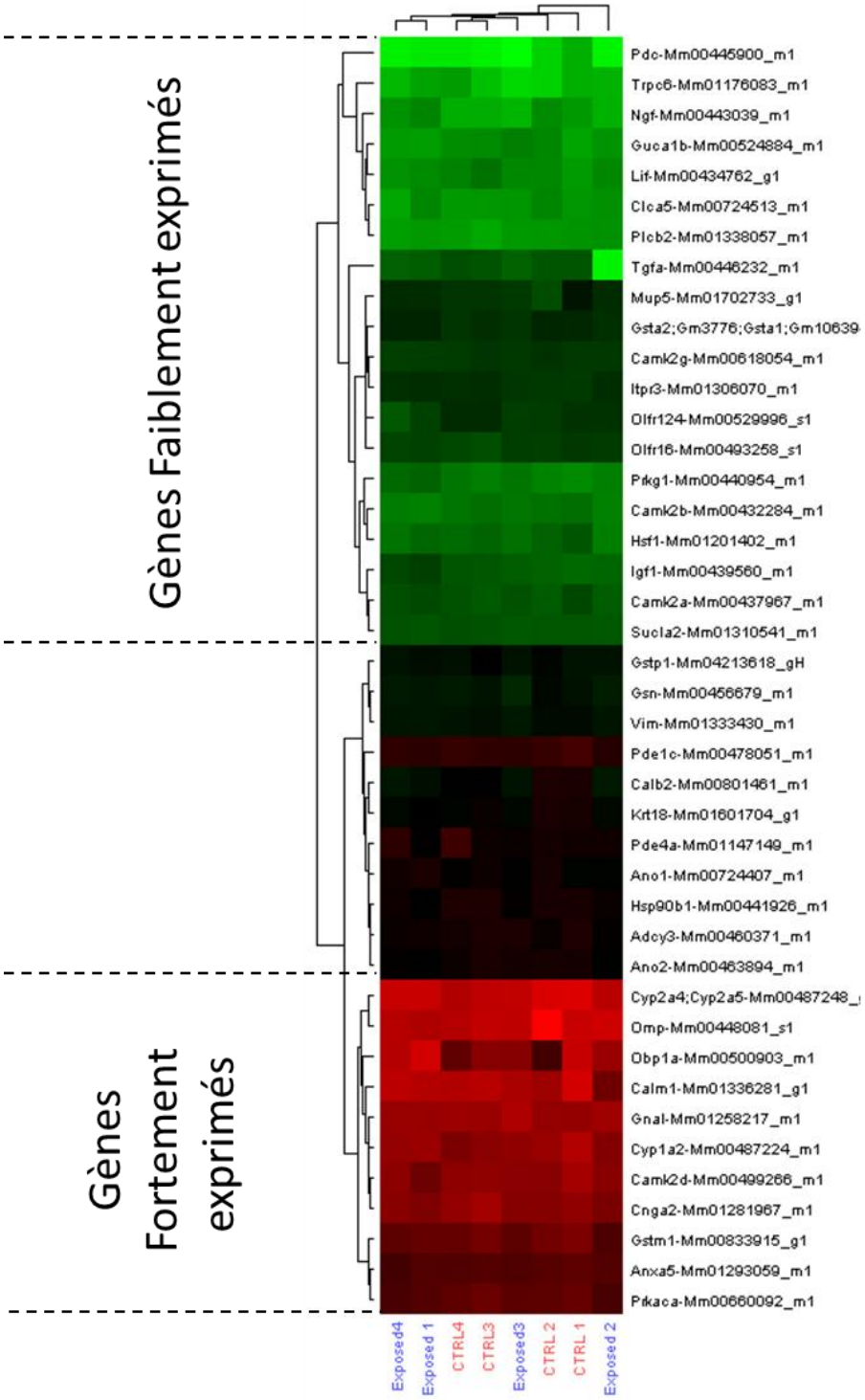


Figure 76. Groupement hiérarchique de 41 transcrits exprimé dans l'épithélium olfactif.

Chaque colonne correspond à un échantillon. Chaque ligne correspond à un gène.

Les valeurs sont exprimées en ΔCt (3 contrôles endogènes : 18S, GAPDH et HPRT ont servi pour la normalisation de dépôt). Une case verte correspond à un gène faiblement exprimé dans l'épithélium, tandis que la case rouge correspond à un gène fortement exprimé. Les échantillons contrôles sont nommés « CTRL + numéro de la souris » et les échantillons exposés sont nommés « Exposed + numéro de la souris ». Le regroupement des transcrits s'est fait par mesure de distance euclidienne.

En résumé, l'analyse de 41 transcrits de l'épithélium olfactif a montré que l'exposition postnatale au Lyral n'affecte pas de manière générale le niveau des transcrits des gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires de l'épithélium olfactif tels, l'apoptose et la génèse olfactive. De plus, notre protocole d'exposition ne semble pas induire une toxicité du tissu olfactif puisque certains marqueurs de toxicité de la muqueuse olfactive ne sont pas induits. Ce qui indique que l'exposition au Lyral n'affecte pas l'état général du tissu.

Analysis Results

Average CT | ΔCT | $2^{-\Delta CT}$ | Fold Change (RQ)

Assay	Type	CTRL 1	CTRL 2	CTRL3	CTRL4	Exposed 1	Exposed 2	Exposed3	Exposed4
Pdc-Mm00445900_m1	Target	8.043 ± 0.0	9.5302 ± 0.0	10.8937 ± 0.0	10.4966 ± 0.0	10.5285 ± 0.0	10.9941 ± 0.0	11.4454 ± 0.0	10.8446 ± 0.0
Trpc6-Mm01176083_m1	Target	8.043 ± 0.0	9.5302 ± 0.0	8.7867 ± 0.0	7.1969 ± 0.0	7.4884 ± 0.0	8.1647 ± 0.0	9.8271 ± 0.0	8.4527 ± 0.0
Ngf-Mm00443039_m1	Target	7.0923 ± 0.0	6.4389 ± 0.0	7.901 ± 0.0	7.9595 ± 0.0	6.1655 ± 0.0	8.1384 ± 0.0	8.3188 ± 0.0	6.757 ± 0.0
Plcb2-Mm01338057_m1	Target	6.8663 ± 0.0	7.0079 ± 0.0	7.6816 ± 0.0	7.1796 ± 0.0	7.053 ± 0.0	6.7407 ± 0.0	7.0328 ± 0.0	7.3056 ± 0.0
Clca5-Mm00724513_m1	Target	6.9751 ± 0.0	6.1654 ± 0.0	6.9792 ± 0.0	7.086 ± 0.0	6.212 ± 0.0	6.6544 ± 0.0	6.8991 ± 0.0	7.6489 ± 0.0
Lif-Mm00434762_g1	Target	7.1414 ± 0.0	6.3284 ± 0.0	5.3392 ± 0.0	6.0746 ± 0.0	6.4627 ± 0.0	6.3631 ± 0.0	6.3765 ± 0.0	6.757 ± 0.0
Guca1b-Mm00524884_m1	Target	7.5672 ± 0.0	6.2873 ± 0.0	6.4515 ± 0.0	6.57 ± 0.0	7.2748 ± 0.0	6.8352 ± 0.0	5.9167 ± 0.0	7.1494 ± 0.0
Camk2b-Mm00432284_m1	Target	5.2068 ± 0.0	5.3739 ± 0.0	5.2116 ± 0.0	5.5281 ± 0.0	6.0008 ± 0.0	6.0198 ± 0.0	5.561 ± 0.0	5.7804 ± 0.0
Prkg1-Mm00440954_m1	Target	6.4232 ± 0.0	6.1476 ± 0.0	5.9111 ± 0.0	5.5372 ± 0.0	4.7291 ± 0.0	5.9484 ± 0.0	5.5153 ± 0.0	4.9519 ± 0.0
Hsf1-Mm01201402_m1	Target	4.1478 ± 0.0	4.6875 ± 0.0	4.7863 ± 0.0	5.0737 ± 0.0	4.9037 ± 0.0	5.8782 ± 0.0	5.3146 ± 0.0	5.4098 ± 0.0
Tgfa-Mm00446232_m1	Target	4.1419 ± 0.0	4.1326 ± 0.0	4.0596 ± 0.0	3.8608 ± 0.0	4.4375 ± 0.0	10.9941 ± 0.0	4.7185 ± 0.0	4.6496 ± 0.0
Igf1-Mm00439560_m1	Target	5.0001 ± 0.0	4.7021 ± 0.0	4.1866 ± 0.0	4.1155 ± 0.0	3.1463 ± 0.0	4.8694 ± 0.0	4.4684 ± 0.0	3.5122 ± 0.0
Sucla2-Mm01310541_m1	Target	4.1715 ± 0.0	4.1878 ± 0.0	3.9685 ± 0.0	3.8545 ± 0.0	4.1647 ± 0.0	4.2557 ± 0.0	4.2174 ± 0.0	3.9597 ± 0.0
Camk2a-Mm00437967_m1	Target	3.4988 ± 0.0	4.4121 ± 0.0	4.3342 ± 0.0	3.9194 ± 0.0	3.5677 ± 0.0	4.4942 ± 0.0	3.9229 ± 0.0	3.8464 ± 0.0
Olfr 124-Mm00529996_s1	Target	2.5445 ± 0.0	2.9835 ± 0.0	2.3018 ± 0.0	2.2205 ± 0.0	3.2033 ± 0.0	2.601 ± 0.0	3.0914 ± 0.0	4.2192 ± 0.0
Olfr 16-Mm00493258_s1	Target	2.8297 ± 0.0	3.1709 ± 0.0	3.8422 ± 0.0	3.5167 ± 0.0	3.1874 ± 0.0	3.0308 ± 0.0	3.0875 ± 0.0	3.378 ± 0.0
Mup5-Mm01702733_g1	Target	1.3436 ± 0.0	3.7565 ± 0.0	2.7021 ± 0.0	2.6625 ± 0.0	2.3499 ± 0.0	2.3454 ± 0.0	2.9556 ± 0.0	2.2968 ± 0.0
Camk2g-Mm00618054_m1	Target	2.8339 ± 0.0	2.5938 ± 0.0	2.6594 ± 0.0	2.9645 ± 0.0	3.0609 ± 0.0	2.9066 ± 0.0	2.8922 ± 0.0	3.1308 ± 0.0
Itpr3-Mm01306070_m1	Target	2.9486 ± 0.0	2.8743 ± 0.0	2.3854 ± 0.0	2.469 ± 0.0	2.3549 ± 0.0	2.4001 ± 0.0	2.791 ± 0.0	2.455 ± 0.0
Gsta2;Gm3776;Gsta1;Gm10639-M…	Target	2.1047 ± 0.0	2.0496 ± 0.0	2.4286 ± 0.0	2.7285 ± 0.0	1.9543 ± 0.0	2.461 ± 0.0	2.7025 ± 0.0	1.9869 ± 0.0
Gsn-Mm00456679_m1	Target	1.1412 ± 0.0	0.7395 ± 0.0	1.2471 ± 0.0	1.5653 ± 0.0	1.3784 ± 0.0	1.665 ± 0.0	2.1308 ± 0.0	1.4998 ± 0.0
Hprt-Mm01545399_m1	Selected Control	1.7257 ± 0.0	1.8875 ± 0.0	1.6583 ± 0.0	1.6716 ± 0.0	2.0744 ± 0.0	1.7727 ± 0.0	1.7932 ± 0.0	1.535 ± 0.0
Vim-Mm01333430_m1	Target	0.8579 ± 0.0	0.8972 ± 0.0	1.092 ± 0.0	1.237 ± 0.0	1.395 ± 0.0	1.3413 ± 0.0	1.4221 ± 0.0	1.3488 ± 0.0
Calb2-Mm00801461_m1	Target	-0.1935 ± 0.0	-0.2563 ± 0.0	0.4819 ± 0.0	0.4579 ± 0.0	1.0072 ± 0.0	1.5194 ± 0.0	1.2624 ± 0.0	1.3639 ± 0.0
Gstp1-Mm04213618_gH	Target	1.1898 ± 0.0	0.6463 ± 0.0	0.3561 ± 0.0	1.0942 ± 0.0	0.9793 ± 0.0	1.2223 ± 0.0	1.2324 ± 0.0	1.2645 ± 0.0
Krt18-Mm01601704_g1	Target	-0.1155 ± 0.0	-0.2033 ± 0.0	0.1827 ± 0.0	0.6165 ± 0.0	0.4401 ± 0.0	0.7845 ± 0.0	0.689 ± 0.0	0.7626 ± 0.0
Ano1-Mm00724407_m1	Target	0.6092 ± 0.0	-0.1162 ± 0.0	0.0719 ± 0.0	0.3207 ± 0.0	-0.2192 ± 0.0	0.5603 ± 0.0	0.4792 ± 0.0	0.0017 ± 0.0
Hsp90b1-Mm00441926_m1	Target	-0.1408 ± 0.0	-0.1445 ± 0.0	-0.2629 ± 0.0	-0.2869 ± 0.0	0.3749 ± 0.0	0.1417 ± 0.0	0.2704 ± 0.0	0.0847 ± 0.0
Pde4a-Mm01147149_m1	Target	0.025 ± 0.0	-0.0581 ± 0.0	0.1206 ± 0.0	-0.9528 ± 0.0	0.3366 ± 0.0	0.0405 ± 0.0	0.1505 ± 0.0	-0.6098 ± 0.0
Ano2-Mm00463894_m1	Target	-0.0924 ± 0.0	-0.1027 ± 0.0	-0.2086 ± 0.0	0.1236 ± 0.0	0.4801 ± 0.0	0.4946 ± 0.0	-0.0901 ± 0.0	0.294 ± 0.0
Adcy3-Mm00460371_m1	Target	-0.3142 ± 0.0	0.1841 ± 0.0	-0.2381 ± 0.0	-0.0318 ± 0.0	0.0854 ± 0.0	0.303 ± 0.0	-0.202 ± 0.0	0.1845 ± 0.0
Pde1c-Mm00478051_m1	Target	-1.1368 ± 0.0	-0.8364 ± 0.0	-0.6478 ± 0.0	-0.7908 ± 0.0	-0.5742 ± 0.0	-0.4532 ± 0.0	-0.6269 ± 0.0	-0.648 ± 0.0
Anxa5-Mm01293059_m1	Target	-1.7152 ± 0.0	-1.561 ± 0.0	-1.5185 ± 0.0	-1.3972 ± 0.0	-1.44 ± 0.0	-1.5207 ± 0.0	-1.4295 ± 0.0	-1.1057 ± 0.0
Prkaca-Mm00660092_m1	Target	-1.8884 ± 0.0	-1.6906 ± 0.0	-2.0114 ± 0.0	-1.7243 ± 0.0	-1.4392 ± 0.0	-1.2142 ± 0.0	-1.6432 ± 0.0	-1.2555 ± 0.0
Gstm1-Mm00833915_g1	Target	-2.3903 ± 0.0	-2.1678 ± 0.0	-2.2423 ± 0.0	-1.8778 ± 0.0	-1.8416 ± 0.0	-1.3402 ± 0.0	-1.702 ± 0.0	-1.6984 ± 0.0
Actb-Mm00607939_s1	Selected Control	-1.7257 ± 0.0	-1.8875 ± 0.0	-1.6582 ± 0.0	-1.6716 ± 0.0	-2.0744 ± 0.0	-1.7727 ± 0.0	-1.7932 ± 0.0	-1.535 ± 0.0
Cnga2-Mm01281967_m1	Target	-2.8446 ± 0.0	-2.6216 ± 0.0	-3.2903 ± 0.0	-2.9271 ± 0.0	-2.4337 ± 0.0	-2.3573 ± 0.0	-2.61 ± 0.0	-2.678 ± 0.0
Obp1a-Mm00500903_m1	Target	-4.0574 ± 0.0	-1.1411 ± 0.0	-2.6679 ± 0.0	-1.7934 ± 0.0	-4.3315 ± 0.0	-3.0949 ± 0.0	-2.6395 ± 0.0	-3.66 ± 0.0
Camk2d-Mm00499266_m1	Target	-3.3152 ± 0.0	-2.6846 ± 0.0	-2.8254 ± 0.0	-2.7997 ± 0.0	-2.0599 ± 0.0	-2.6909 ± 0.0	-2.7326 ± 0.0	-2.7559 ± 0.0
Cyp1a2-Mm00487224_m1	Target	-3.6295 ± 0.0	-3.0477 ± 0.0	-2.7198 ± 0.0	-2.4011 ± 0.0	-3.0716 ± 0.0	-2.5594 ± 0.0	-2.8562 ± 0.0	-2.9533 ± 0.0
Gapdh-Mm99999915_g1	Candidate Control	-4.2583 ± 0.0	-4.1011 ± 0.0	-3.0716 ± 0.0	-6.5407 ± 0.0	-3.2508 ± 0.0	-2.9507 ± 0.0	-3.0437 ± 0.0	-6.3591 ± 0.0
Calm1-Mm01336281_g1	Target	-4.3595 ± 0.0	-3.1807 ± 0.0	-3.7371 ± 0.0	-3.5998 ± 0.0	-3.6738 ± 0.0	-2.1137 ± 0.0	-3.4373 ± 0.0	-3.83 ± 0.0
Gnal-Mm01258217_m1	Target	-2.9299 ± 0.0	-2.9432 ± 0.0	-3.0283 ± 0.0	-3.112 ± 0.0	-3.013 ± 0.0	-3.2131 ± 0.0	-3.5383 ± 0.0	-3.0171 ± 0.0
Omp-Mm00448081_s1	Target	-4.1044 ± 0.0	-5.3137 ± 0.0	-3.9517 ± 0.0	-3.6373 ± 0.0	-3.5216 ± 0.0	-4.2389 ± 0.0	-3.8812 ± 0.0	-3.6871 ± 0.0
Cyp2a4;Cyp2a5-Mm00487248_g1	Target	-4.5589 ± 0.0	-4.5044 ± 0.0	-3.8675 ± 0.0	-3.5753 ± 0.0	-4.1137 ± 0.0	-3.7599 ± 0.0	-3.9267 ± 0.0	-4.0689 ± 0.0
18S-Hs99999901_s1	Candidate Control	-11.1195 ± 0.0	-10.7332 ± 0.0	-11.8024 ± 0.0	-11.8428 ± 0.0	-10.2648 ± 0.0	-10.3264 ± 0.0	-12.081 ± 0.0	-12.3686 ± 0.0

Tableau des valeurs ΔCt de 41 gènes (4 souris contrôles et 4 souris exposées)

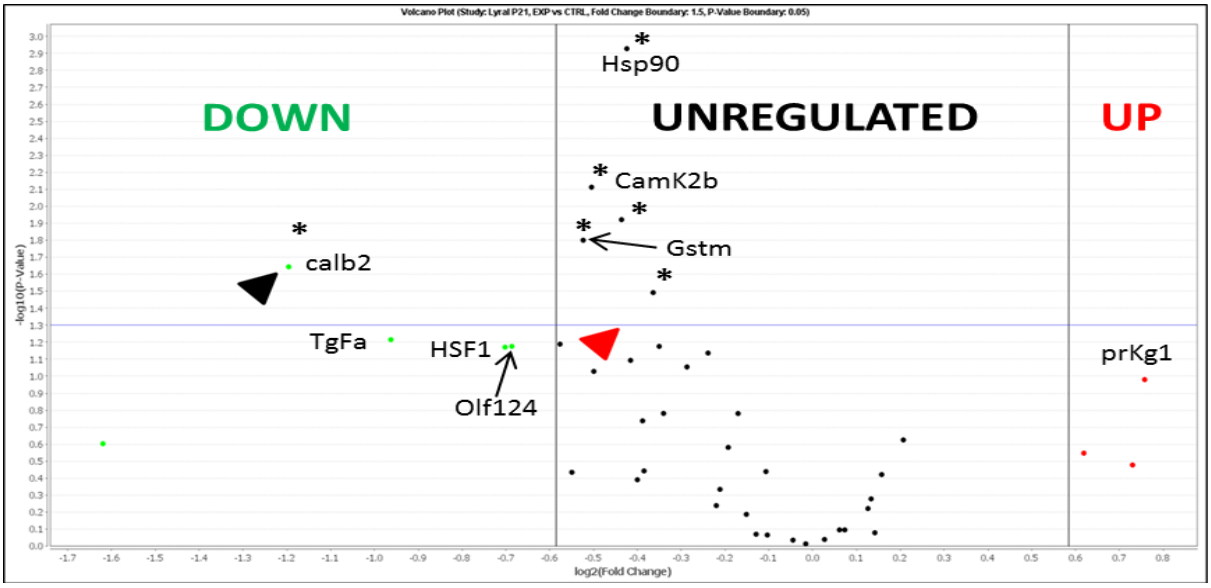


Figure 77. « Volcano plot » montrant qu'un seul ARNm est significativement exprimé parmi 41 transcrits étudiés.

(**A**)Les données ont été colléctées par étude comparative des niveaux d'expression d'ARNm d'épithelium exposés ou pas au Lyral à partir de 4 réplicats biologiques. Axe des ordonnées : $-\log_{10}$ (P-value) ; axe des abscisses : log2 (ratio $2^{-\Delta Ct}$ exposée/ $2^{-\Delta Ct}$ Controle). Les expressions différentielles d'ARNm (Ctrl Vs. Expo) qui sont statistiquements significatives sont indiquées dans les deux cadrans latéraux supérieurs (au dessus de la ligne bleue indiquée par une flèche rouge) avec un « fold change > 1,5 » et une « p-value<0,05)». Un point vert indique un niveau d'ARNm sous-exprimé, tandis qu'un point rouge indique une sur-expression. En effet seul la « Calb2 » (flèche noire) a une expression statistiquement significative.

En revanche, l'analyse de quelques gènes responsables de la liaison du calcium (Annexine A5, calbinding 2 et HSP90) montre une différence significative d'expression de la calbinding 2 (P = 0,02) et HSP90 (P =0,001) (**tableau 11**). Ces deux protéines sont impliquées dans la modulation du calcium intracellulaire et dans la repolarisation de la réponse. L'annexine A5 est classiquement connue comme étant un marqueur d'activité apoptotique.

Il est intéressant de noter que seul Calb2 est considéré selon le logiciel (data Assist) comme suffisamment sous-exprimé. En effet, une diminution d'environ 60% du niveau d'ARNm de calb2 est observée chez les souris exposées (0,43 u.a ; n = 4) comparées aux contrôles (1 u.a ; n = 4). HSP90 ne diminue que de 30% environ (0,7 u.a ; n=4) (**tableau 12**). Seul Calb2 est situé dans les cadrans supérieurs latéraux de la carte « Heat Map », indiquant une variation significative (**figure 77**).

Face à cette observation, il nous a semblé intéressant d'analyser les temps de repolarisation obtenus à partir des enregistrements d'EOG de souris exposées et non exposées.

Average CT | ΔCT | $2^{-\Delta CT}$ | Fold Change (RQ)

Assay	Type	CTRL (RQ)	CTRL (P-Value)	EXP (RQ)	EXP (P-Value)
18S-Hs99999901_s1	Candidate Control	1.0	1.0	1.0862	0.8443
Actb-Mm00607939_s1	Selected Control	1.0	1.0	1.0482	0.6167
Adcy3-Mm00460371_m1	Target	1.0	1.0	0.8747	0.2633
Ano1-Mm00724407_m1	Target	1.0	1.0	1.0192	0.9142
Ano2-Mm00463894_m1	Target	1.0	1.0	0.7848	0.0667
Anxa5-Mm01293059_m1	Target	1.0	1.0	0.8888	0.1664
Calb2-Mm00801461_m1	Target	1.0	1.0	0.4367	0.0228
Calm1-Mm01336281_g1	Target	1.0	1.0	0.7655	0.3614
Camk2a-Mm00437967_m1	Target	1.0	1.0	1.052	0.8047
Camk2b-Mm00432284_m1	Target	1.0	1.0	0.7051	0.0077
Camk2d-Mm00499266_m1	Target	1.0	1.0	0.7895	0.1653
Camk2g-Mm00618054_m1	Target	1.0	1.0	0.8476	0.0733
Clca5-Mm00724513_m1	Target	1.0	1.0	0.9895	0.9683
Cnga2-Mm01281967_m1	Target	1.0	1.0	0.7496	0.0807
Cyp2a4;Cyp2a5-Mm00487248_g1	Target	1.0	1.0	0.8635	0.4644
Gapdh-Mm99999915_g1	Candidate Control	1.0	1.0	0.7807	0.7887
Gnal-Mm01258217_m1	Target	1.0	1.0	1.1539	0.2368
Gsn-Mm00456679_m1	Target	1.0	1.0	0.7076	0.0935
Gsta2;Gm3776;Gsta1;Gm10639-M...	Target	1.0	1.0	1.043	0.8034
Gstm1-Mm00833915_g1	Target	1.0	1.0	0.6953	0.0158
Gstp1-Mm04213618_gH	Target	1.0	1.0	0.764	0.1837
Guca1b-Mm00524884_m1	Target	1.0	1.0	0.9697	0.9192
Hprt-Mm01545399_m1	Selected Control	1.0	1.0	0.9671	0.7042
Hsf1-Mm01201402_m1	Target	1.0	1.0	0.6147	0.0677
Hsp90b1-Mm00441926_m1	Target	1.0	1.0	0.7454	0.0012
Igf1-Mm00439560_m1	Target	1.0	1.0	1.536	0.2825
Itpr3-Mm01306070_m1	Target	1.0	1.0	1.1158	0.3789
Krt18-Mm01601704_g1	Target	1.0	1.0	0.6707	0.0647
Lif-Mm00434762_g1	Target	1.0	1.0	0.7579	0.4066
Mup5-Mm01702733_g1	Target	1.0	1.0	0.9304	0.8599
Ngf-Mm00443039_m1	Target	1.0	1.0	1.1036	0.8304
Obp1a-Mm00500903_m1	Target	1.0	1.0	1.6581	0.3328
Olfr124-Mm00529996_s1	Target	1.0	1.0	0.6214	0.0665
Olfr16-Mm00493258_s1	Target	1.0	1.0	1.0909	0.6025
Omp-Mm00448081_s1	Target	1.0	1.0	0.683	0.3664
Pdc-Mm00445900_m1	Target	1.0	1.0	0.3253	0.2505
Pde1c-Mm00478051_m1	Target	1.0	1.0	0.8198	0.0878
Pde4a-Mm01147149_m1	Target	1.0	1.0	0.859	0.5779
Plcb2-Mm01338057_m1	Target	1.0	1.0	1.0971	0.5261
Prkaca-Mm00660092_m1	Target	1.0	1.0	0.739	0.012
Prkg1-Mm00440954_m1	Target	1.0	1.0	1.691	0.1051
Sucla2-Mm01310541_m1	Target	1.0	1.0	0.9291	0.3629
Tgfa-Mm00446232_m1	Target	1.0	1.0	0.5134	0.0607
Trpc6-Mm01176083_m1	Target	1.0	1.0	0.9146	0.8477
Vim-Mm01333430_m1	Target	1.0	1.0	0.7773	0.0323

Tableau 11. Tableau indiquant les facteurs de régulation et les valeurs des tests statistiques de chaque gène.

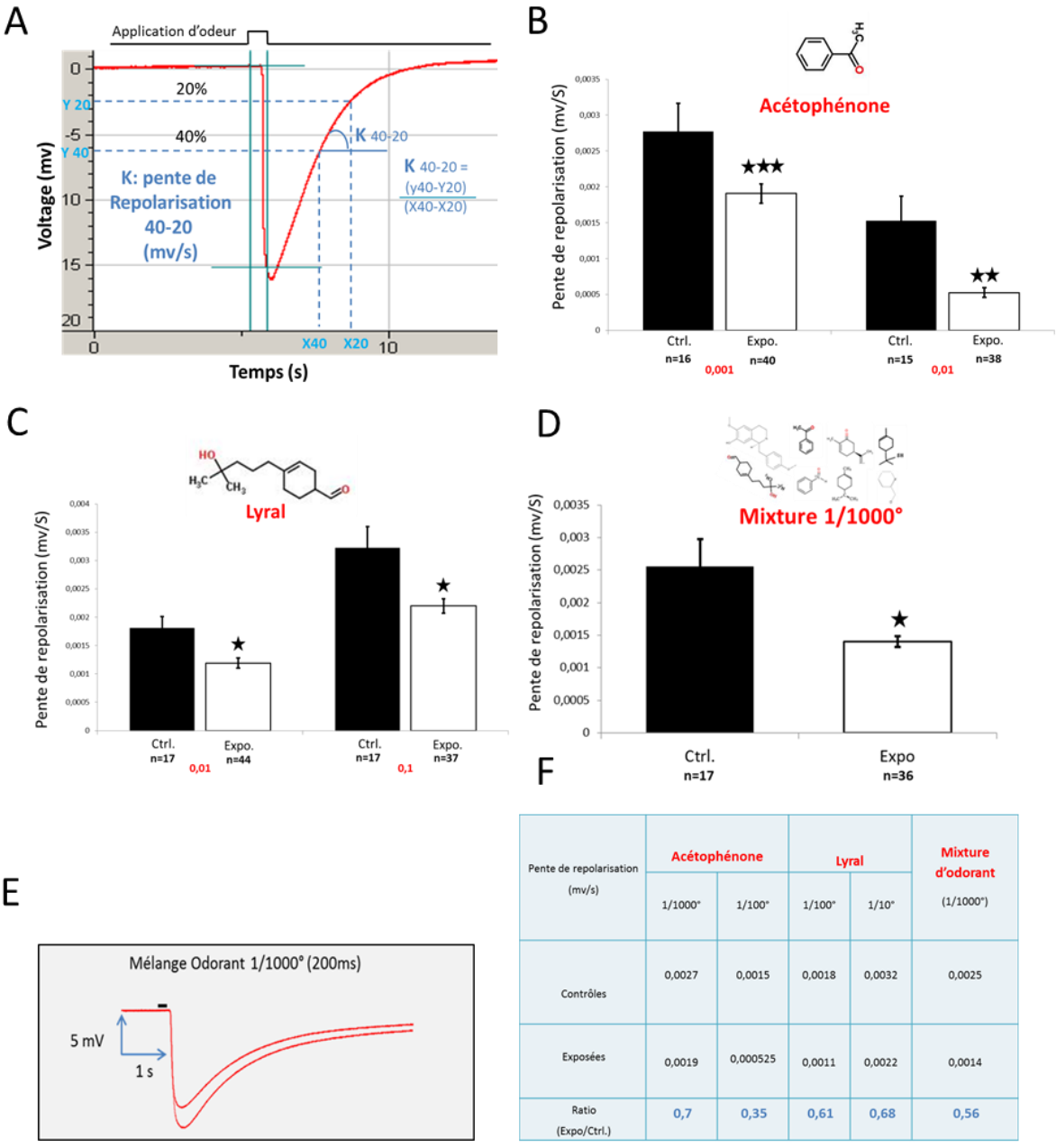
Symbole officiel du gène	Nom officiel du gène	Exposé vs. non exposé		
		Fold	P-value	
Calb2	Calbindin 2	0,43	0,02	↘
Hsp90	90-Kda Heat Shcock protein	0,74	0,001	Ø
CamK2b	Calcium calmodulin-dependent protein Kinase II	0,7	0,007	Ø
Gstm	Glutathione S-transferase M	0,69	0,01	Ø
PrKaca	Protein Kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	0,74	0,01	Ø
Vim	Vimentin	0,77	0,03	Ø
TgFa	Transforming growth factor, alpha	0,51	0,06 (NS)	↘
HSF-1	Heat Schock transcription factor	0,6	0,06 (NS)	↘
Olf124	Olfactory receptor 124 (SR1)	0,6	0,06 (NS)	↘
Pdc	Phosducin	0,3	0,2 (NS)	↘
Prkg1	Protein Kinase, cGMP-dependent type I	1,7	0,1 (NS)	↗

Tableau 12. Tableau indiquant les facteurs de régulation de l'expression des gènes dont l'expression change de manière significative et non significative. (↘) indique une diminution de l'expression et une tendance à diminuer lorsque les variations d'expressions ne

sont pas significatives tandis que (↗) indique une tendance de surexpression du niveau d'ARNm.

Dans ce tableau, figurent les résultats d'analyses statistiques (test de student). NS = résultat non significatif. Flèche vers le bas = gène sous-exprimé ; flèche vers le haut = gène sur-exprimé ; Ø = gène dont l'expression ne varie pas.

Augmentation du temps de repolarisation par exposition postnatale au Lyral



Pente de repolarisation (mv/s)	Acétophénone		Lyral		Mixture d'odorant
	1/1000°	1/100°	1/100°	1/10°	(1/1000°)
Contrôles	0,0027	0,0015	0,0018	0,0032	0,0025
Exposées	0,0019	0,000525	0,0011	0,0022	0,0014
Ratio (Expo/Ctrl.)	0,7	0,35	0,61	0,68	0,56

Figure 78. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur les pentes de repolarisation des réponses aux odorants.

A- Schéma indiquant la pente de repolarisation en mv/s « 40-20 » (depuis 40 % l'amplitude de réponse à 20% de l'amplitude) analysée à partir des enregistrements de réponses. Ces histogrammes indiquent les pentes de repolarisation « 40-20 » en réponse à l'application (**B**) de deux concentrations d'acétophénone (1% et 1‰), (**C**) deux concentrations de Lyral (1% et 10%) et (**D**) d'une mixture d'odorants (1‰). (**F**) Tableau récapitulatif des valeurs des pentes de repolarisation aux différentes applications d'odorants.

Après analyse de la pente de repolarisation lente (40-20) et rapide (100-50), nous observons une diminution de la pente de repolarisation lente pour tous les odorants testés. Toutefois la pente rapide (**p.143**) n'est pas modifiée par l'exposition au Lyral. Ainsi, nous avons montré que, bien que l'exposition n'affecte pas l'ensemble des paramètres de la cinétique de réponse olfactive, la pente de repolarisation 40-20 est affectée (**figure 78**). Ce qui traduit que les temps de réponse sont plus longs après l'exposition postnatale au Lyral. La cause peut être liée au fonctionnement des neurones olfactifs qui mettent plus de temps à se désensibiliser. Cela peut aussi être lié à la baisse d'expression des protéines de liaison du calcium comme « Calb2 », indispensables à la terminaison de la réponse olfactive. L'hypothèse d'une modification de l'environnement des neurones (moins d'OBP, donc plus de temps à éliminer les odorants) me paraît moins probable, car l'analyse de qPCR sur quelques proteines de liaison des odorants ne montre aucune modification d'expression significative.

Analyse histologique

Stratégie

Il a été rapporté que la toxicité de la muqueuse olfactive est accompagnée par des modifications de l'aspect histologique. Cette modification se traduit notamment par une hyperplasie de la partie basale de l'epithélium olfactif (Woutersen R. A, 1984).

Le but de cette analyse histologique de l'épithélium olfactif est d'évaluer les conséquences d'un composé éventuellement toxique (le Lyral) sur la muqueuse et plus particulièrement sur l'aspect histologique du tissu. Plus précisemment nous procéderons à une analyse comparative des épaisseurs des couches basales (marqués à la GAP43 : couleur rouge) et apicales (marquées à l'OMP : couleur bleue) des EO de souris exposées *vs* non exposées. Une analyse globale et zonale sera réalisée (**figure 79**).

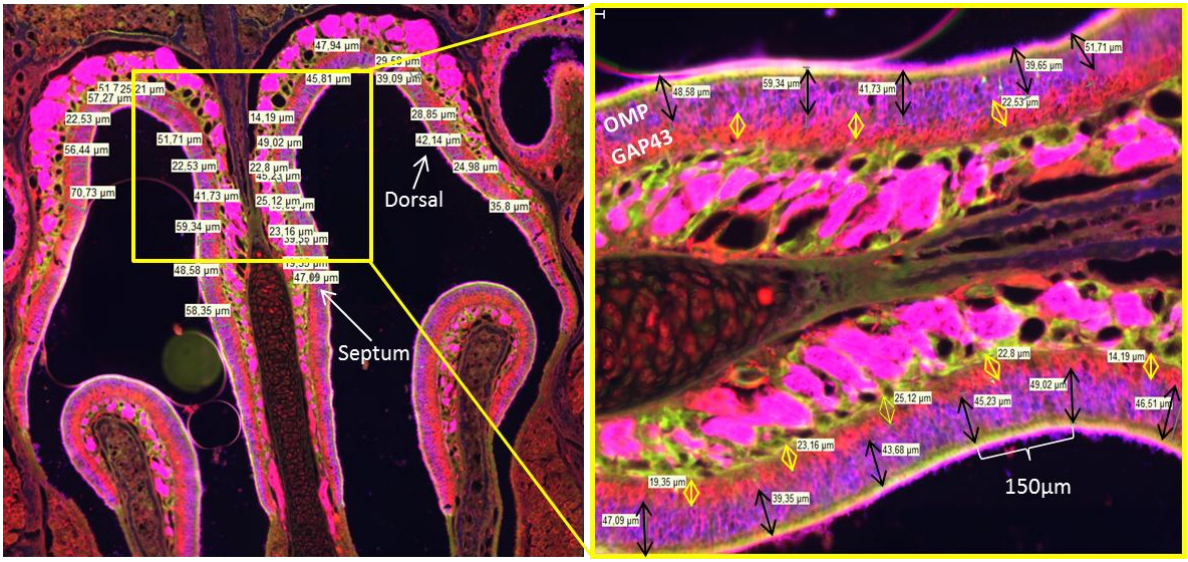
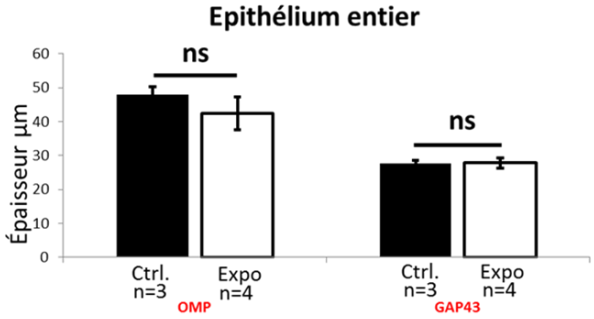


Figure 79. Images montrant les différentes mesures réalisées sur la partie septale et dorsale de l'épithélium olfactif.

A droite (image agrandie), on peut voir que les mesures d'épaisseur de la zone mature (grande flèche noire) et immature (petite flèche jaune) est réalisée à intervalle d'environ 150µm.

Analyse globale



Epithélium entier	Ctrl	Expo	T
OMP	48	42	ns
GAP43	28	28	ns

Figure 80. Mesure d'épaisseur des couches de neurones matures et immatures.

Histogramme indiquant l'épaisseur en µm de la couche des neurones matures (OMP) et immatures (GAP43) de souris non exposées (Ctrl) ou exposées (Expo) au Lyral pendant 21 jours. Le tableau correspond aux résultats des mesures d'épaisseur et aux résultats des tests statistiques indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Nos résultats d'analyses d'épaisseur sur 3/30 lames par souris montrent que l'exposition au Lyral ne modifie pas l'épaisseur des marquages de l'OMP (p-value = 0,1) et de GAP43 (p-value = 0,39). En effet, l'épaisseur du marquage OMP est en moyenne de 48 ± 2,3µm chez les contrôles (n=3), comparé à 42 ± 4,9µm chez les exposées (n=4). L'épaisseur moyenne du

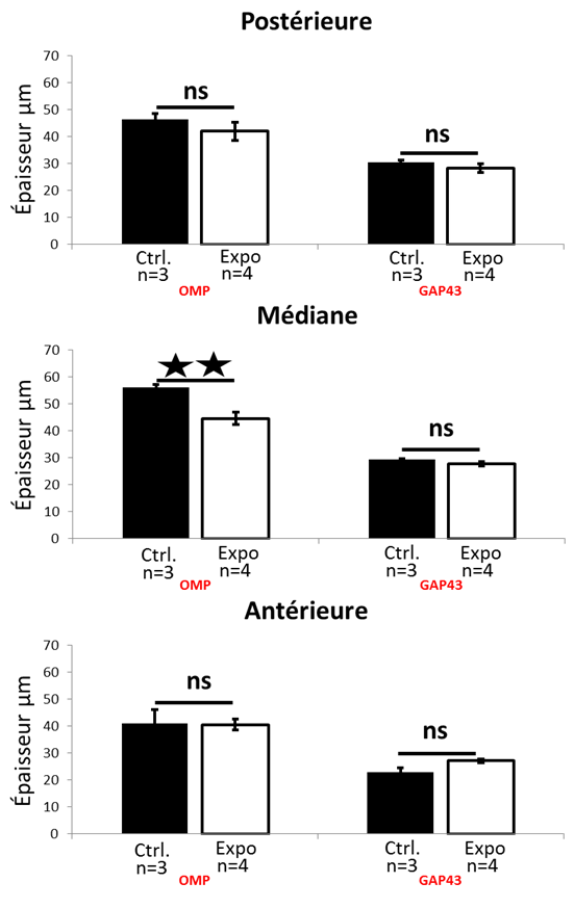
marquage GAP43 est de 28 ± 1µm chez les contrôles (n=3) *Vs* .28 ± 1,5µm chez les exposées (n=4). (**figure 80**) Cela signifie deux choses :

1- Les conditions d'exposition des souris n'induisent pas une toxicité dans la muqueuse olfactive. Ainsi, ces résultats corroborent les résultats de quantification de la caspase 3-clivée par W.B ne montrant pas de variations entre les deux groupes de souris (**voir partie 5**)

2- L'exposition au Lyral induit une baisse générale des neurones MOR23. Cette analyse histologique globale montre que l'exposition au Lyral affecte de façon ciblée la population de neurones MOR23.

Analyse zonale

L'analyse de l'épaisseur des deux couches (GAP43et OMP) nous a permis d'identifier les zones de l'épithélium olfactif affectées par l'exposition postnatale au Lyral.



Postérieure	EPAISSEUR		T
	Ctrl	Expo	
OMP (µm)	46 ± 4	42 ± 6	ns
GAP43 (µm)	31 ± 1	28 ± 3	ns

Médiane	EPAISSEUR		T
	Ctrl	Expo	
OMP (µm)	56 ± 2	45 ± 4	0,008
GAP43 (µm)	29 ± 1	28 ± 2	ns

Antérieure	EPAISSEUR		T
	Ctrl	Expo	
OMP (µm)	41 ± 9	41 ± 3	ns
GAP43 (µm)	23 ± 3	27 ± 1	ns

Figure 81. Mesure d'épaisseur zonale.

Histogrammes indiquant les conséquences de l'exposition postnatale au Lyral sur l'épaisseur des neurones MOR23 matures (OMP) et immatures (GAP43) en µm en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane et antérieure). Les tableaux situés à droite des histogrammes correspondent aux résultats des mesures d'épaisseur des couches de neurones

MOR23-OMP/GAP43 ainsi qu'aux résultats des tests statistiques indiquant si les différences sont significatives ou non (ns).

Cette analyse d'épaisseur par zone montre que l'épaisseur des couches de neurones matures (marqués à l'OMP) et des neurones immatures (marqués à la GAP43) ne varie pas dans les zones postérieures et antérieures de l'épithélium olfactif, entre les souris exposées (Expo) et les souris non exposées (Ctrl). En revanche, l'épaisseur des neurones matures se trouvant dans la zone médiane diminue de façon significative (56 ± 2 µm Vs. 45 ± 4 µm ; p-value : 0,008) lorsqu'on expose les souris au Lyral pendant 21 jours après la naissance. Toutefois l'épaisseur de GAP43, dans cette même zone, reste inchangée entre les deux groupes de souris. (**figure 81**). La figure (**figure 82**) met en évidence les conséquences de l'exposition postnatale au Lyral sur l'épaisseur des différentes couche de neurones (OMP et GAP43) en fonction des zones de l'épithélium olfactif. Dans cette illustration, on peut voir clairement que l'exposition au Lyral diminue l'épaisseur de la couche OMP de la zone médiane de l'EO.

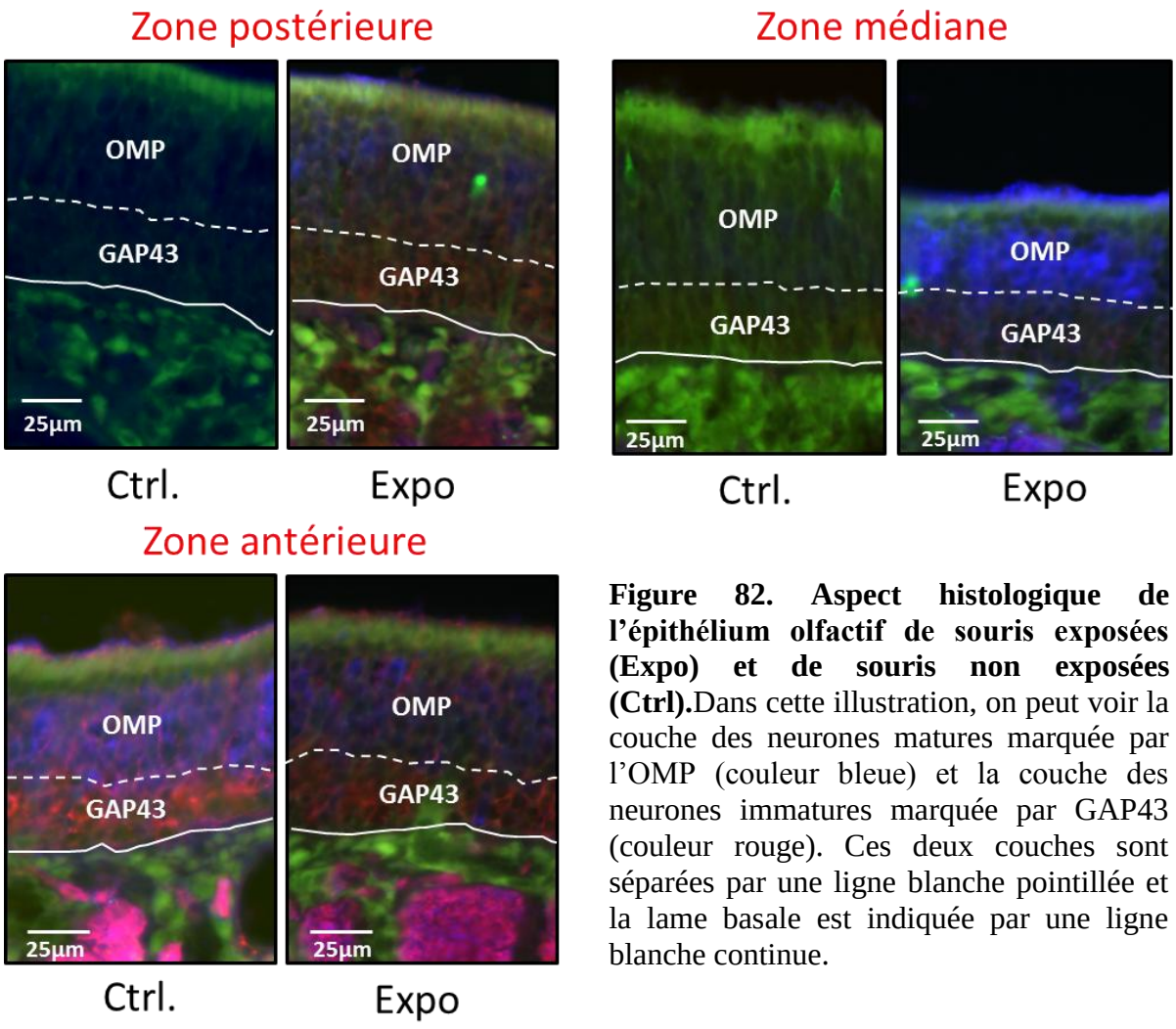


Figure 82. Aspect histologique de l'épithélium olfactif de souris exposées (Expo) et de souris non exposées (Ctrl). Dans cette illustration, on peut voir la couche des neurones matures marquée par l'OMP (couleur bleue) et la couche des neurones immatures marquée par GAP43 (couleur rouge). Ces deux couches sont séparées par une ligne blanche pointillée et la lame basale est indiquée par une ligne blanche continue.

Conclusion (partie 3) :

Nous avons montré que l'exposition postnatale au Lyral n'affecte ni les propriétés électrophysiologiques ni l'état transcriptomique du tissu olfactif. En effet, dans la partie analyse moléculaire, nous montrons que l'exposition ne modifie pas l'ensemble de l'expression des gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels que l'apoptose ou la neurogenèse olfactive. De plus certains marqueurs de toxicité de l'EO ne sont pas induits. En ce qui concerne l'analyse fonctionnelle, nous n'avons pas observé de modifications majeures des propriétés électriques de la muqueuse olfactive. Et finalement, nos données montrent que l'exposition n'induit pas de manière générale de changement de l'aspect histologique de l'EO. En effet, seule la zone médiane de l'EO est atteinte par une baisse de l'épaisseur de la couche des neurones matures accompagnée d'une baisse des neurones MOR23 exprimant l'OMP.

Partie 4 : La plasticité induite par l'exposition est transitoire

Contexte et but :

La période précoce postnatale de 21 jours est une période de plasticité accrue (Mariela Kerr, 2006). De ce fait, nous nous sommes alors demandés si les modifications apportées aux neurones MOR23 perdurent jusqu'à l'âge adulte.

Il a été montré au laboratoire, par analyse de densité de neurones MOR23, que des souris exposées ne montrent plus de différence de densité de neurones MOR23, comparées aux souris contrôles après une phase de récupération. Les souris analysées ont été soumises à une phase d'exposition au Lyral pendant 3 semaines (S3) puis à une phase sans exposition pendant 4 semaines (S7) (**figure 83**).

Dès lors, nous nous sommes demandés si cette plasticité anatomique transitoire du système olfactif était également observable au niveau des neurones olfactifs. Est-ce que le niveau d'ARNm du récepteur MOR23 par neurone change après exposition et récupération ? Afin de répondre à cette problématique, une analyse de RT-qPCR sur la population de neurones MOR23 a été réalisée.

Stratégies

Pour ce faire, j'ai réalisé une analyse de RT-PCR en temps réel à partir de neurones MOR23 de souris exposées au Lyral avec récupération et de souris non exposées. Les souris des deux groupes sont âgées de 7 semaines. Chaque échantillon contient 7 neurones MOR23.

Résultats

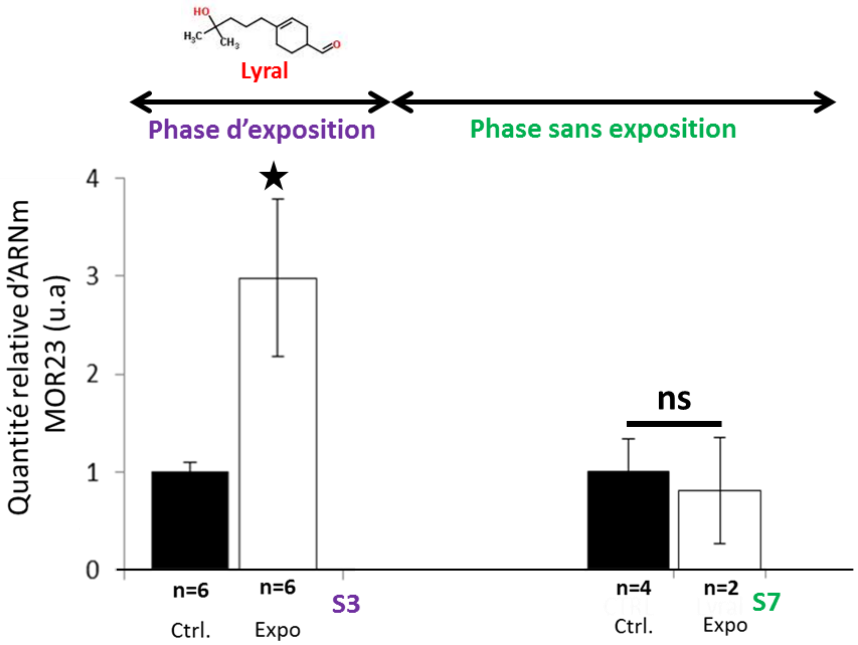


Figure 83. Conséquences de l'arrêt de l'exposition au Lyral sur le niveau d'expression d'ARNm du récepteur MOR23 par neurone MOR23.

Histogrammes indiquant le niveau d'expression d'ARNm du récepteur MOR23 analysé par RT-qPCR à partir de populations de neurones MOR23 issues de souris exposées (Expo) ou non au Lyral (Ctrl.) et à partir de souris exposées avec récupération (Expo) ou non exposées avec récupération (Ctrl.) (ns= différence non significative). Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de Suclg de chaque échantillon. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (u.a) et les valeurs obtenues pour les souris non exposées ont été arbitrairement fixées à 1.

Les résultats de RT-qPCR montrent que le niveau d'ARNm du récepteur MOR23 des souris exposées avec récupération est comparable à celui des souris contrôles (RQ = 0,81 ± 0,55 ; p-value = 0,38). Autrement-dit, 4 semaines d'arrêt d'odorisation sont suffisantes pour rétablir un phénotype normal.

Conclusion (partie IV) :

En résumé, la surexpression de récepteur par neurone observée après la phase d'exposition (S3) disparaît après une phase de récupération (S7). Ce retour à la normal de l'expression du

récepteur MOR23 par neurone est accompagné d'un retour à la normal de la densité des neurones MOR23. Ce qui appuie l'hypothèse postulant que la surexpression de récepteur par neurone est un moyen de compenser la baisse de densité de neurones.

Partie 5 : La plasticité des neurones olfactifs induite par l'exposition postnatale est couple odorant/ligand dépendant

But :

Afin de savoir si les conséquences de l'exposition à l'odeur sont couple odeur/ligand dépendant, des souris M71-GFP ont été exposées ou non à l'acétophénone. L'acétophénone est le ligand spécifique du récepteur M71. De plus, nous avons voulu savoir si l'effet du Lyral est spécifique d'une population de neurones. Pour ce faire, nous avons exposé des souris M71 au Lyral. Finalement, après 21 jours d'exposition nous avons effectué des analyses de comptage de RT-qPCR et d'EOG.

Contexte :

Les analyses de densité de neurones M71 à partir d'explants olfactifs ont montré que la densité de neurone M71 ne varie pas entre les souris contrôles (Ctrl.) et les souris exposées à l'acétophénone (Exp).

Il a également été montré, par mesure de densité de neurones, que l'exposition au Lyral n'affecte pas la densité de neurones M71. Cette dernière expérience a permis de mettre en évidence la spécificité de l'effet du lyral sur les neurones olfactifs (**figure 84**).

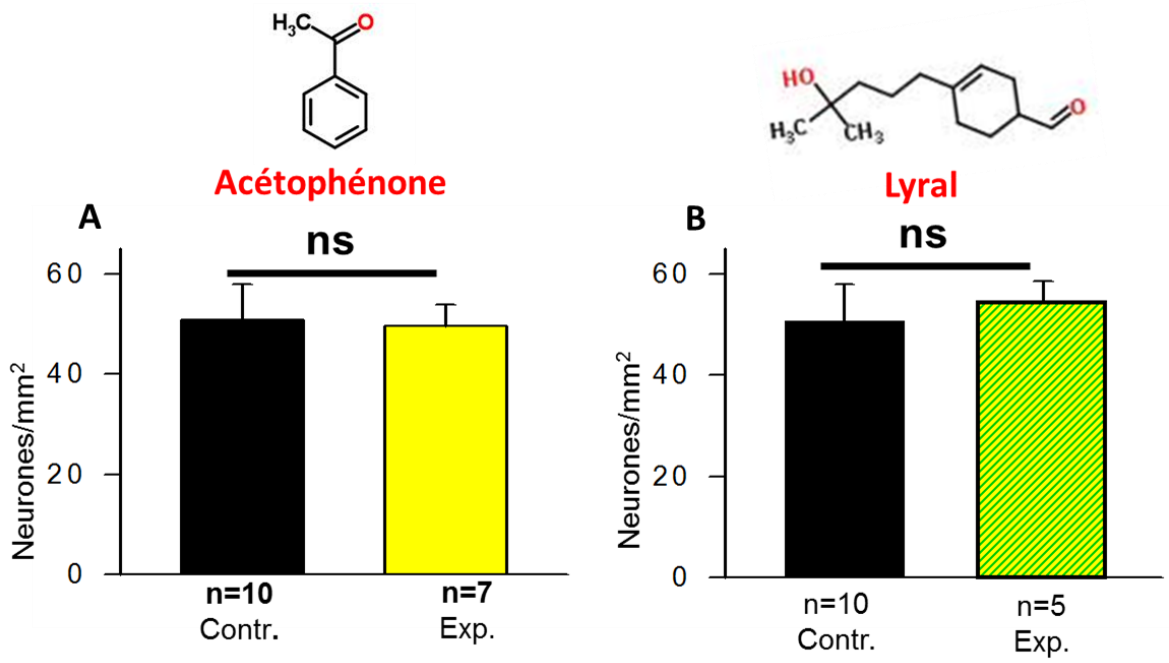


Figure 84. Conséquences de l'exposition postnatale au Lyral et à l'acétophénone sur la densité de neurones M71.

A- Histogramme indiquant la densité de neurones M71GFP (nombre de neurones par mm^2) mesurée sur la partie septale et dorsale d'épithéliums olfactifs issus de souris exposées (Exp.) ou non à l'acétophénone pendant, 21 jours suivants leur naissance (ns= différence non significative). **B**- Histogramme montrant la densité des neurones M71GFP évaluée sur l'explant olfactif de souris exposées ou pas au Lyral pendant 21 jours suivants leur naissance. (H. Cadiou).

Analyse moléculaire

Stratégies

Afin d'évaluer les conséquences moléculaires de l'exposition de souris M71GFP aux odorants (Lyral et acétophénone), j'ai donc réalisé une analyse globale de PCR en temps réel à partir d'épithéliums olfactifs de souris M71-GFP exposées ou pas à l'acétophénone ou au Lyral. Et finalement, une analyse moléculaire plus fine, au moyen de la technique de qPCR sur neurones isolés, m'a permis de mettre en évidence l'effet moléculaire de l'exposition, à l'échelle des neurones M71.

Analyse globale

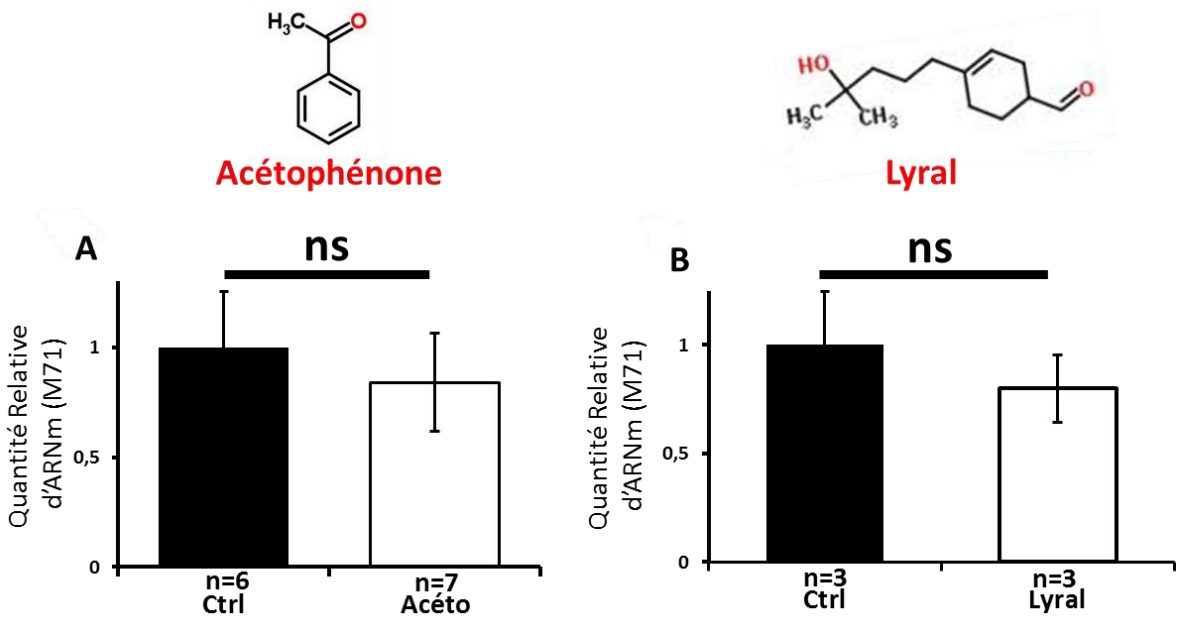


Figure 85. Conséquences de l'exposition postnatale au Lyral et à l'acétophénone sur le niveau d'expression d'ARNm du récepteur M71 à l'échelle du tissu.

Histogrammes indiquant les niveaux d'expression d'ARNm du récepteur M71 analysés par RT-qPCR à partir d'ADNc d'épithéliums olfactifs provenant de souris exposées ou non à l'acétophénone (Acéto) (**A**) ou au Lyral (**B)** pendant 21 jours dès leur naissance (ns= différence non significative). Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de Suclg et d'HPRT de chaque échantillon. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (u.a) et les valeurs obtenues pour les souris non exposées ont été arbitrairement fixées à 1.

Les résultats d'analyses globales de RT-qPCR montrent que l'exposition postnatale au Lyral ou à l'acétophénone (Expo) pendant 21jours ne modifie pas le niveau d'expression de l'ARNm du récepteur M71 (**figure 85**).

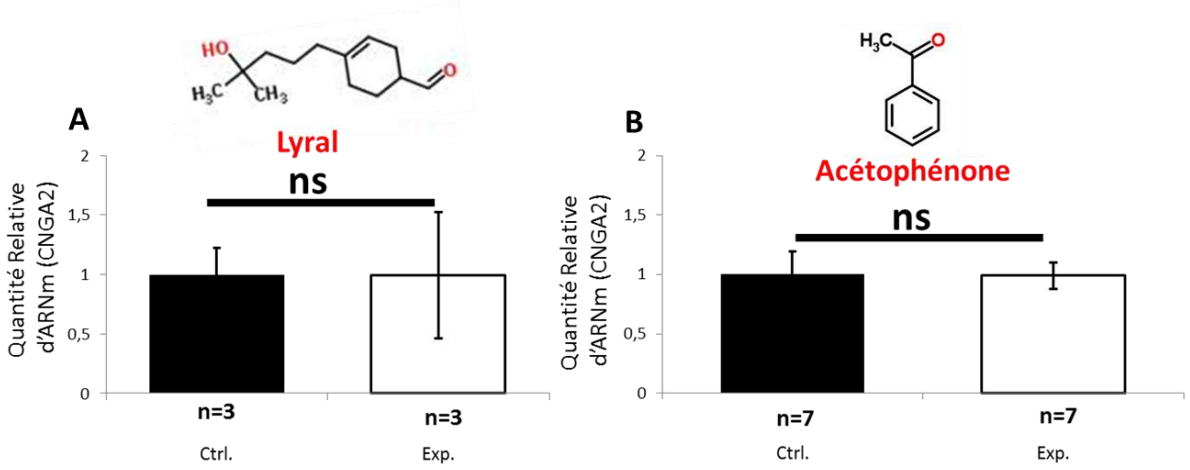


Figure 86. Conséquences de l'exposition postnatale au Lyral et à l'acétophénone sur le niveau d'expression d'ARNm des canaux cationiques nucléotides cycliques dépendants (CNGA2) à l'échelle du tissu.

A- Histogramme indiquant les niveaux d'expression d'ARNm de CNGA2 analysés par RT-qPCR à partir d'ADNc d'épithéliums olfactifs provenant de souris exposées ou pas à l'acétophénone (Acéto) pendant 21 jours dès leur naissance (ns= différence non significative). **B**- Histogramme montrant les niveaux d'expression d'ARNm de CNGA2 évalués à partir d'explants olfactifs de souris exposées ou pas au Lyral pendant 21 jours. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de Suclg et d'HPRT de chaque échantillon. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (u.a) et les valeurs obtenues pour les souris non exposées ont été arbitrairement fixées à 1.

Les résultats d'analyse globale (sur tissu entier) de PCR en temps réel montrent que l'exposition post-natale des souris M71-GFP, que ce soit au Lyral ou à l'acétophénone, ne modifie pas le niveau d'expression d'ARNm de la CNGA2 (**figure 86**).

En résumé, les résultats d'analyse histologique et de biologie moléculaire montrent que l'exposition postnatale des souris de souche M71-GFP à l'acétophénone ou au Lyral ne modifie, ni la densité de neurones M71, ni le niveau d'expression d'ARNm du récepteur M71 et d'un élément clé de la cascade de transduction, le CNGA2.

Ces observations suggèrent que l'exposition postnatale aux deux odorants n'affecte ni le niveau d'expression des éléments de la cascade, en l'occurrence CNGA2, ni celui du récepteur M71 par neurone M71. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse de deux éléments cruciaux de la cascade de transduction (CNGA2 et AC3) par RT-qPCR sur une population pure de neurones M71 a été réalisée. Puisque, le gène du récepteur M71 n'est constitué que d'un seul exon codant et que nos échantillons n'ont pas été traités à la DNase, nous avons éliminé les données relatives au gène du récepteur M71.

Analyse sur population de neurones olfactifs d'intérêts (M71)

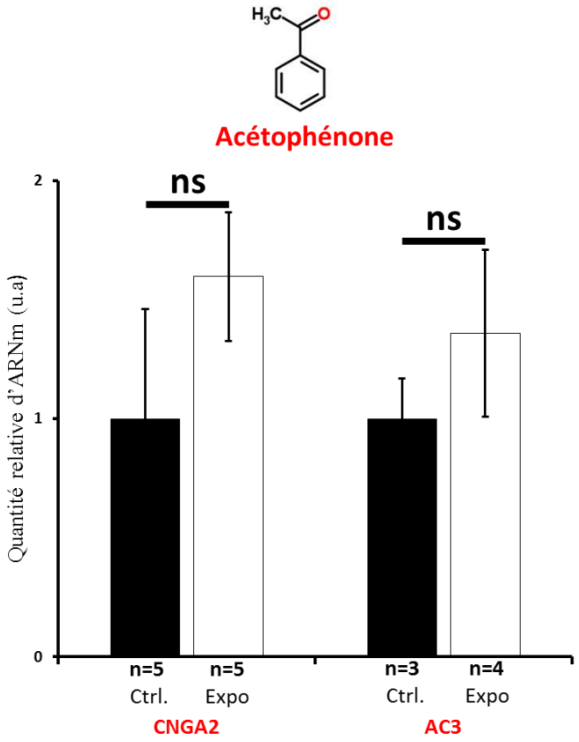


Figure 87. Conséquences de l'exposition postnatale à l'acétophénone sur le niveau d'expression d'ARNm de CNGA2 et d'AC3 par neurone M71.

Histogramme indiquant les niveaux d'expression d'ARNm de CNGA2 et d'AC3 analysés par RT-qPCR à partir de population de neurones M71 issues de souris exposées ou pas à l'acétophénone (Acéto) pendant 21 jours dès leur naissance (ns= différence non significative). Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de Suclg de chaque échantillon. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (u.a) et les valeurs obtenues pour les souris non exposées ont été arbitrairement fixées à 1.

Les résultats d'analyses sur une population pure de neurones (M71) montrent que l'exposition postnatale à l'acétophénone (Expo) pendant 21jours n'induit pas de changement du niveau d'expression d'ARNm des deux protéines clés de la cascade olfactive (CNGA2 et AC3) (**figure 87**).

Récapitulatif des conséquences moléculaires et anatomiques des expositions des souris MOR23GFP et M71GFP aux odorants.

Ce tableau (**tableau 13**) récapitule les conséquences de l'exposition des souris GFP (MOR23 et M71) aux odorants sur la densité de neurones ainsi que sur le niveau d'expression d'ARNm des RO et des éléments de la cascade de transduction.

La baisse de la densité des neurones et la diminution du niveau d'expression d'ARNm sont indiquées par (↘) tandis que les augmentations sont indiquées par (↗) et les absences de modification sont indiquées par (**Ø**).

Odorants (souche de souris)	Densité de Neurone (comptage)	ARNm Epithélium olfactif		ARNm neurones olfactifs dissociés	
		Récepteur	cascade	Récepteur	cascade
Lyral (MOR23GFP)	↘	Ø	Ø	↗	↗
Lyral (M71GFP)	Ø	Ø	Ø	ne	ne
Acétophénone (M71GFP)	Ø	Ø	Ø	ne	Ø

Tableau 13. Tableau récapitulatif des conséquences anatomiques et moléculaires des expositions des souris MOR23GFP et M71GFP aux odorants.

(ne= non évalué).

Les analyses histologiques de l'EO ont permis de mettre en évidence que l'exposition postnatale au Lyral induit une diminution de la densité des neurones MOR23 sans affecter celle des neurones M71. La diminution des MOR23 est accompagnée d'une surexpression du récepteur MOR23 par neurone, ainsi que certaines protéines de la cascade de transduction. Toutefois, l'exposition postnatale à l'acétophénone n'affecte ni la densité des neurones M71 ni le niveau d'expression des éléments de la cascade par neurone M71. En conclusion ces résultats suggèrent que la plasticité anatomique et moléculaire des neurones olfactifs est dépendante du couple ligand-récepteur.

Analyse fonctionnelle (Electroolfactogramme)

Analyse de l'amplitude de réponse

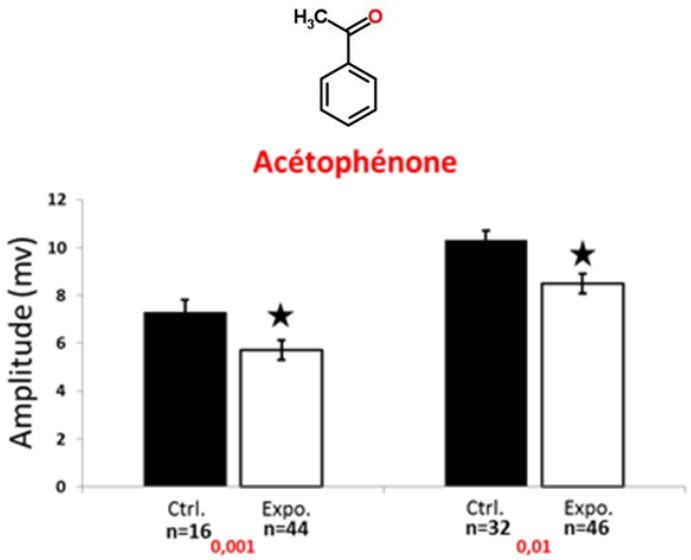


Figure 88. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur l'amplitude de réponse à l'acétophénone. Histogrammes indiquant les amplitudes de réponses aux deux concentrations d'acétophénone (dilué 100X et 1000X) sur des souris exposées ou pas au Lyral. (ns= différence non significative).

Les résultats d'analyse d'amplitudes, à partir des enregistrements de réponse, ont révélé que l'exposition postnatale au Lyral diminue significativement l'amplitude de réponse aux deux concentrations d'acétophénone (dilué au 100ème et au 1000ème). En effet les différences d'amplitudes de réponse entre les souris contrôles et les souris exposées sont significatives (**figure 88**).

Analyse de la cinétique de réponse

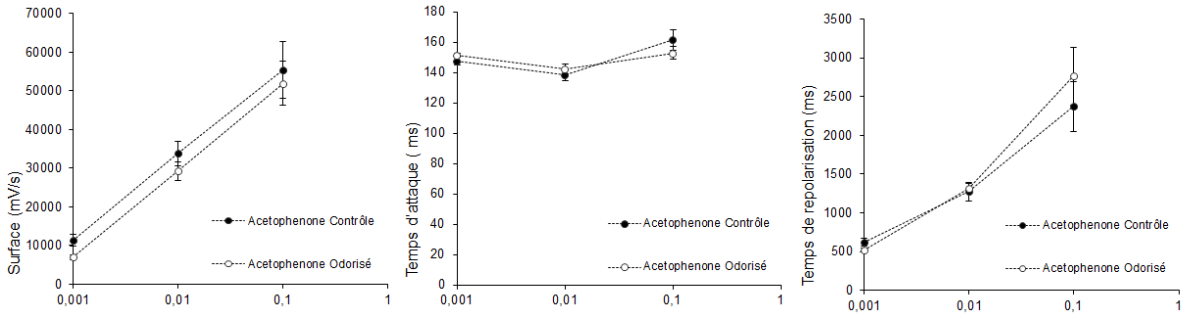


Figure 89. Conséquence de l'exposition postnatale au Lyral sur les paramètres de cinétique de réponse à l'acétophénone.

Histogrammes indiquant la surface de réponses à l'acétophénone (dilué 10X, 100X et 1000X) obtenues sur des souris exposées ou pas au Lyral **(A),** les temps d'attaque de réponses à l'acétophénone (dilué 10X, 100X et 1000X) **(B)**, les temps de repolarisation (depuis l'amplitude maximale à 50% de l'amplitude) (**C)**.

L'évaluation des paramètres cinétiques de réponse à l'acétophénone (dilué 10X, 100X et 1000X) incluant : le temps de repolarisation (100-50), la surface de réponse et le temps d'attaque de réponse a ensuite été analysée. Nos résultats montrent qu'aucun de ces paramètres n'a été modifié par l'odorisation des souris au Lyral pendant 21 jours (**figure 89**).

Conclusion (partie V) :

Nous avons vu que l'exposition au Lyral n'affecte pas la densité de neurones M71. De plus, aucun changement d'expression des niveaux des gènes de la cascade de transduction par neurone M71 et du niveau d'expression d'ARNm du récepteur M71 n'a été observé par analyse globale du tissu.

Ce qui suggère que le niveau d'ARNm de M71 par neurone ne varie pas entre le groupe contrôle et le groupe exposé.

En revanche, nous avons montré, par EOG, que l'amplitude de réponse à l'acétophénone est diminuée chez les souris exposées. Ceci peut être dû à une baisse de densité d'autres populations de neurorécepteurs sensibles à l'acétophénone.

Partie 6 : L'exposition au Lyral induit une baisse du nombre de neurones MOR23 matures

Nous avons montré, grâce à la quantification d'expression protéique par la technique de western-blot, que l'exposition des souris au Lyral n'induit pas de changement du niveau d'expression de la caspase-3 clivée, comparé aux souris contrôles (0,6 ± 0,17 u.a vs. 0,9 ± 0,21 ua ; n = 3 et p-value = 0,21) (**figure 90**). Ces résultats suggèrent que l'exposition n'induit pas d'apoptose dans le tissu olfactif. Cependant, la limite de cette technique est qu'elle est globale. Elle n'est pas assez sensible pour détecter un faible signal apoptotique provenant d'une population de neurones, en l'occurrence, celle des neurorécepteurs MOR23. De plus, cette méthode ne nous permet pas de localiser les protéines sur le tissu. En revanche, l'immunohistochimie nous permet de surmonter les limites de la technique de western-blot.

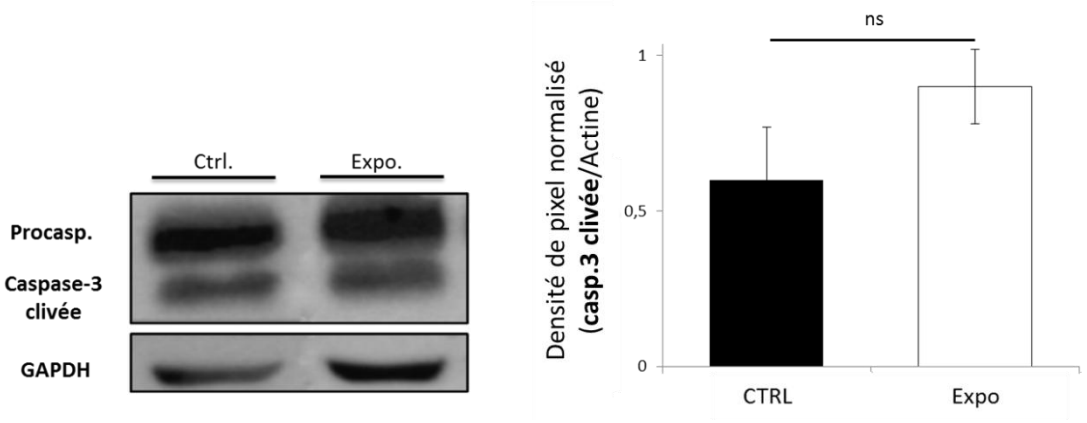


Figure 90. Conséquences de l'exposition postnatale au Lyral sur le taux d'expression de la protéine caspase-3 clivée à l'échelle du tissu olfactif.

Etude de l'expression de la protéine caspase-3 clivée par western-blot, à partir d'épithéliums olfactifs entiers de souris exposées ou non au Lyral pendant 21j. L'effet de l'exposition postnatale sur l'état apoptotique du tissu a été évalué par la détection de la caspase-3 clivée. Les bandes de l'électrophoregramme (à gauche de l'histogramme) ont été analysées par lecture densitométrique (à l'aide d'un photosenseur). L'histogramme indique que l'exposition n'affecte pas le niveau d'expression de la caspase-3 clivée. Les résultats sont présentés en densité de pixels de la bande GFP normalisée sur le contrôle de dépôt, GAPDH (n=3 ; p-value = 0,21).

Stratégie :

Une étude de l'apoptose/prolifération des neurones MOR23 sur tranche par immunohistochimie (marquage à la caspase 3 clivée +Brdu) nécessite des marquages à différents temps du développement, dans le but de cerner le jour auquel l'éventuel apoptose/prolifération est déclenchée/perturbée.

Faute de temps, nous avons réalisé des marquages de neurones matures et immatures, à l'aide d'anticorps anti-OMP et anti-GAP43. L'anti-OMP reconnaît spécifiquement un marqueur spécifique de neurones olfactifs matures. Tandis que GAP43, reconnaît un marqueur des neurones olfactifs immatures.

Ainsi une étude de comptage de neurones matures et immatures donne une indication sur la neurogénèse (prolifération/apoptose) des neurones MOR23. En effet, cela nous permettrait de savoir à quel type de neurones (mature ou immature), la baisse de densité de neurones MOR23 est liée.

Comptage du nombre de neurones MOR23 matures et immatures de l'épithélium olfactif

Mesure Histologique Globale

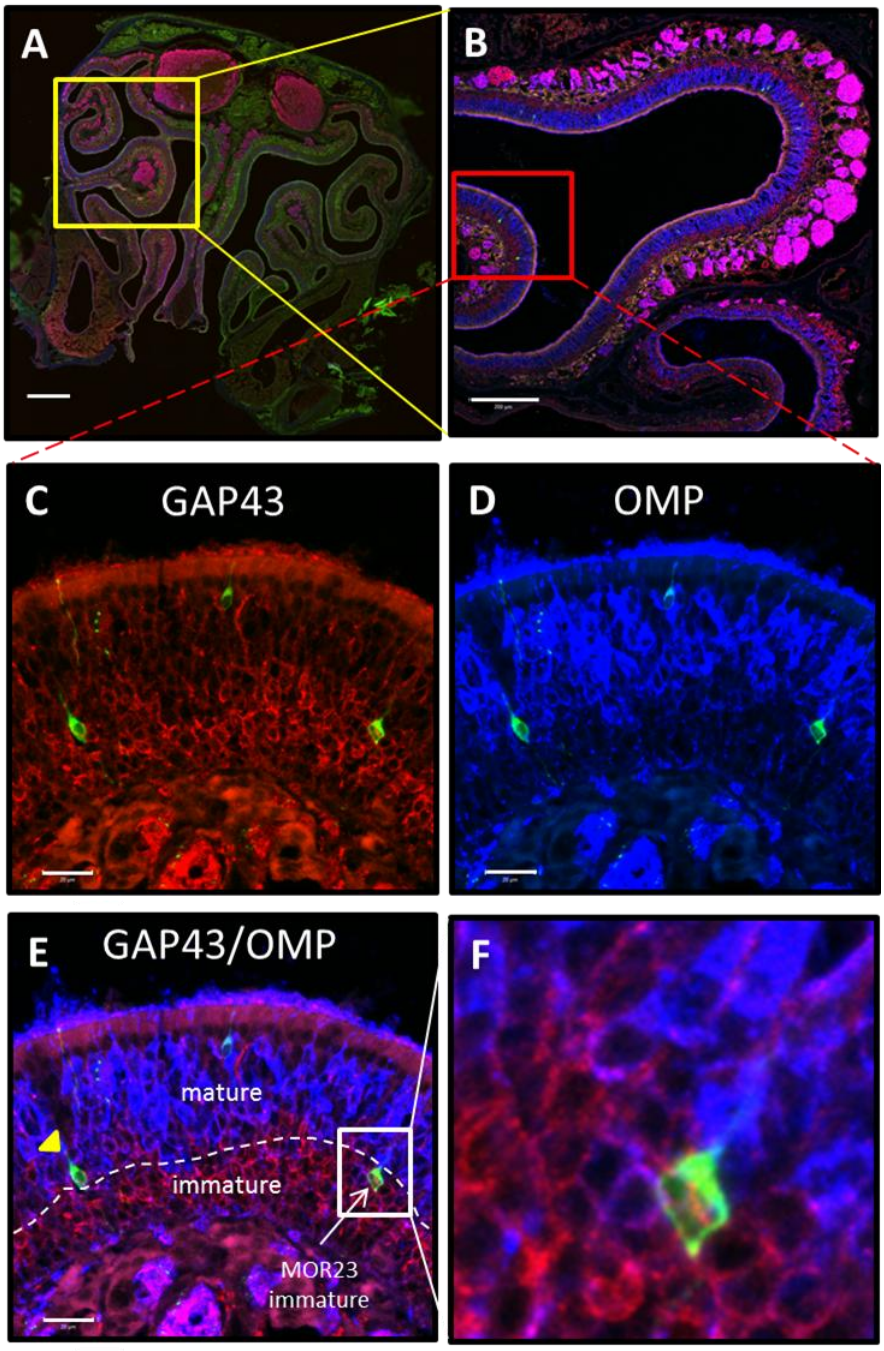
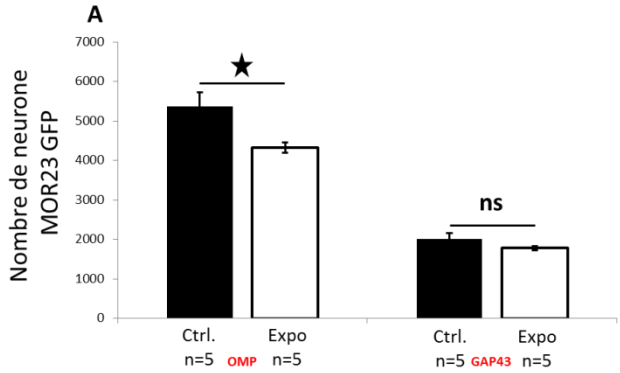
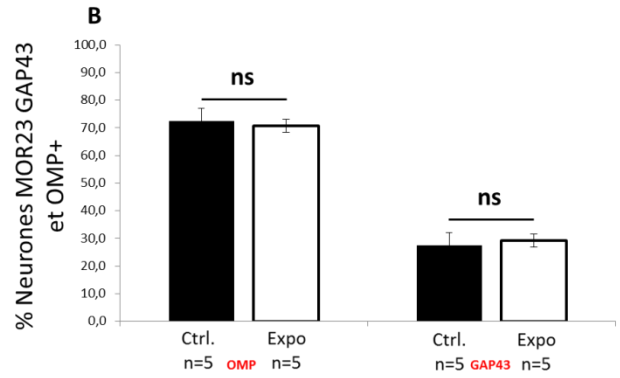


Figure 91. Micrographies de coupes coronales d'épithéliums olfactifs de souris MOR23 GFP marquées à l'OMP et à la GAP43.

A- Micrographie montrant une coupe entière (coronale) de la cavité nasale (barre d'échelle : 200µm). **B**- Grossissement de l'épithélium olfactif (barre d'échelle : 200µm). Les neurones olfactifs immatures immuno-réactifs au GAP43 sont révélés en rouge (**C**) tandis que les neurones matures immuno-réactifs à l'OMP sont révélés en bleu (barre d'échelle : 20µm) (**D**). **E**- La superposition des images (C) et (D) permet de déterminer si les neurones MOR23 GFP sont OMP ou GAP43 positifs (barre d'échelle : 20µm). La ligne blanche en pointillé sépare les neurones matures des neurones immatures. Dans le cas du neurone indiqué par la flèche blanche et observé en image agrandie (**F**), il s'agit d'un neurone MOR23 GAP43 positif, donc immature. En revanche le neurone indiqué par une flèche jaune est OMP-positif.



Epithélium entier	Ctrl	Expo	T
OMP	5360 ± 368	4322 ± 147	P=0,03
GAP43	2006 ± 126	1776 ± 56	P=0,11



Epithélium Entier	Ctrl	Ctrl	T
%OMP+	72,5% ± 4,5	70,8% ± 2,4	P=0,5
%GAP43+	27,5% ± 4,5	29,2% ± 2,3	P=0,5

Figure 92. Quantification des neurones MOR23 matures et immatures.

A- Histogramme montrant le nombre de neurones MOR23 matures (OMP) et immatures (GAP43) de souris exposées ou non au Lyral pendant la période postnatale. Les valeurs ainsi que les résultats des tests statistiques figurent sur le tableau à droite. **B**- Histogramme montrant le pourcentage des neurones MOR23-OMP+ et le pourcentage de neurones-GAP43+. Les valeurs ainsi que les résultats des tests statistiques figurent sur le tableau à droite.

Les résultats de comptage de 3/30 lames par souris des neurones MOR23 GFP ont montré (vu précédemment) que le nombre de MOR23 diminue dans l'épithélium olfactif. En outre, le comptage (3/30 lames par souris) des neurones MOR23 coexprimant GAP43 (neurones immatures) et OMP (neurones matures) a montré que la diminution du nombre de neurones MOR23 est associée à une diminution du nombre de MOR23 matures (5360 ± 368 vs. 4322 ± 147 ; p-value = 0,03). Les neurones immatures diminuent aussi, mais de manière non significative (2006 ± 126 vs. 1776 ± 56 ; p-value = 0,1). En revanche la proportion de neurones immatures et matures ne varie pas entre souris exposées et souris contrôles (**figure 92**).

Récapitulatif des résultats d'analyse histologique globale de l'épithélium olfactif de souris exposées ou non au Lyral pendant 21 jours

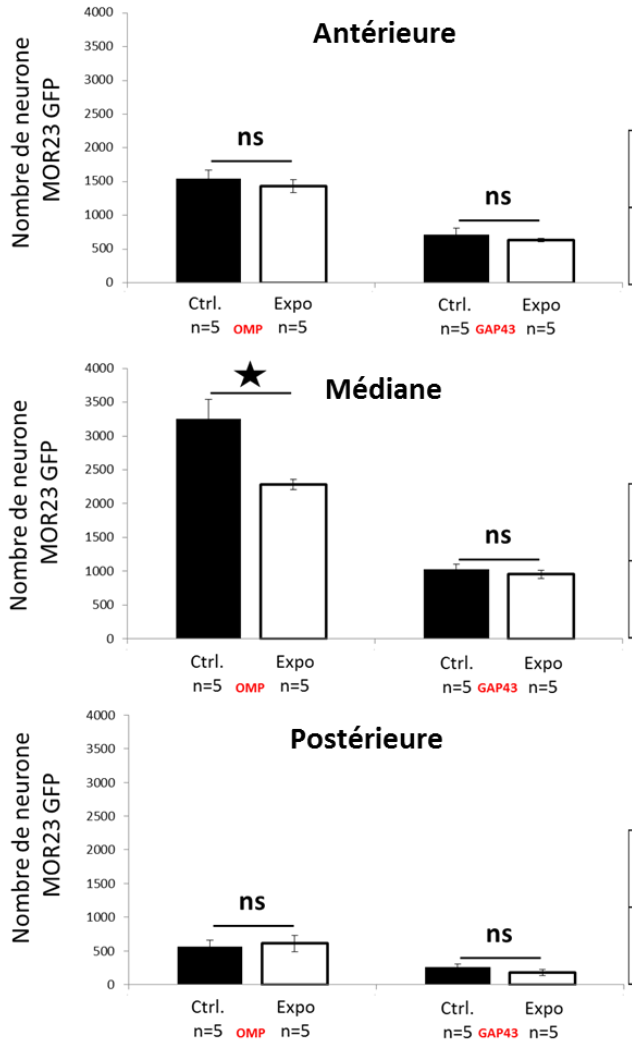
La figure synthétise les résultats des mesures histologiques réalisées sur des épithéliums olfactifs entiers de souris exposées ou pas au Lyral. Les diminutions (↓) et les absences de modification (Ø) d'épaisseurs de neurones matures/immatures et du nombre de neurones MOR23 matures/immatures sont indiquées.

Epithélium entier	Nombre de MOR23	Epaisseur couches Neurones
OMP	↘	Ø
GAP43	Ø	Ø

Tableau 14. Récapitulatif des résultats d'analyse histologique globale d'épithéliums olfactifs.

Les mesures histologiques globales de l'EO ont permis de mettre en évidence que l'exposition postnatale au Lyral induit une modification du nombre de neurones MOR23. En effet, il apparaît que l'exposition au Lyral provoque une diminution significative d'environ 20% du nombre de neurones MOR23. Cette diminution concerne les neurones MOR23 matures. Ceux immatures ont tendance à diminuer de 10% (p=0,1). En revanche, l'exposition au Lyral ne modifie pas l'épaisseur des neurones matures et immatures de l'épithélium olfactif. En somme, les analyses histologiques globales montrent que l'exposition au Lyral affecte, de façon ciblée, la population de neurones MOR23.

Mesure histologique par zone de l'épithélium olfactif.



Antérieure	Ctrl	Expo	T
OMP	1548±125	1430±212	ns
GAP43	720±212	636±59	ns

Médiane	Ctrl	Expo	T
OMP	3252±290	2282±75	P=0,015
GAP43	1028±176	956±60	ns

Postérieure	Ctrl	Expo	T
OMP	560±100	610±123	ns
GAP43	258±49	184±46	ns

Figure 93. Quantification zonale des neurones MOR23 matures et immatures.

Histogrammes indiquant les conséquences de l'exposition postnatale au Lyral sur le nombre de neurones MOR23 matures (OMP) et immatures (GAP43) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane et antérieure). Les tableaux situés à droite des histogrammes correspondent aux résultats de comptage des neurones MOR23-OMP/GAP43 ainsi qu'aux résultats des tests statistiques indiquant si les différences sont significatives ou pas (ns).

Les résultats montrent que le nombre de neurones MOR23 immatures (coexprimant GAP43) ne varie pas de manière significative dans les trois zones de l'EO. En revanche les résultats de comptage zonal montrent que l'exposition induit une baisse du nombre de neurones matures. Cette baisse a lieu exclusivement dans la zone médiane de l'EO. Nous observons une diminution significative de 970 neurones matures (MOR23-OMP+) dans la zone médiane

(3252 ± 290 *Vs.* 2282 ± 75 ; p-value = 0,015). (**figure 93**). Après analyse des pourcentages de neurones MOR23 OMP+ et GAP43+ sur les différentes zones, nos résultats n'ont montré aucune différence entre les deux groupes de souris.

En résumé, nos résultats de comptage de neurones ont montré que l'exposition au Lyral provoque une baisse significative de 1300 neurones MOR23 environ (7336±329 *Vs.* 6098±126 ; p=0,012). Parmi ces 1300 neurones, environ 1050 sont matures (4322±147 MOR23-OMP+ chez les exposées *Vs.* 5360±368 MOR23-OMP+ chez les contrôles ; p=0,03) et 250 sont immatures (1776±56 MOR23-GAP43+ chez les exposées *Vs.* 2006±126 MOR23-GAP43+ chez les contrôles ; p=0,1). La diminution des 1000 neurones MOR23 matures est concentrée dans la partie médiane tandis que la diminution des 250 neurones immatures est répartie dans les trois zones.

Récapitulatif des résultats d'analyse histologique par zone de l'épithélium olfactif de souris exposées ou non au Lyral pendant 21 jours

Le tableau récapitule les résultats des mesures histologiques réalisées sur des zones d'épithéliums olfactifs (postérieure, médiane et antérieure) de souris exposées ou pas au Lyral. Les diminutions (↓) et les absences de modification (Ø) d'épaisseurs de neurones matures/immatures et du nombre de neurones MOR23 matures/immatures sont indiquées.

	Nombre de neurones MOR23			Epaisseur des neurones		
Zones	P	M	A	P	M	A
OMP	Ø	↘	Ø	Ø	↘	Ø
GAP43	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tableau 15. Récapitulatif des résultats d'analyse histologique par zone d'épithélium olfactif.

P : postérieure
M : médiane
A : antérieure

Les mesures histologiques par zone de l'EO ont permis de mettre en évidence que l'exposition postnatale au Lyral induit une diminution significative du nombre des neurones

MOR23 matures dans la zone médiane. Par ailleurs les résultats de comptage par zone ne montrent pas de modification du nombre de neurones MOR23 matures dans les zones postérieure et antérieure et immatures dans les zones antérieure et médiane. Cette diminution médiane du nombre de neurones MOR23 matures est accompagnée d'une diminution de l'épaisseur de la couche OMP. En revanche, l'analyse histologique globale montre que l'exposition ne modifie ni l'épaisseur de la couche de neurones matures des autres zones (postérieure et antérieure) ni celle des neurones immatures (GAP43) de la muqueuse olfactive.

Conclusion (partie VI) :

Dans cette partie nous avons pu montrer que l'exposition affecte de manière zonale les neurones MOR23 matures (**~30%**). En conséquence, les proportions de neurones MOR23 matures et immatures restent inchangées dans le tissu olfactif.

Chapitre III : DISCUSSION, PERSPECTIVES et CONCLUSION GENERALE

DISCUSSION et PERSPECTIVES

De façon générale, les résultats obtenus, lors des différentes expérimentations menées dans le cadre de cette thèse, ont permis de montrer que l'exposition postnatale des souris au Lyral induit des changements anatomiques, moléculaires et physiologiques des neurones olfactifs exprimant le récepteur MOR23. Les souris exposées développent une préférence au Lyral.

De plus, nous avons pu tester notre **deuxième hypothèse** et montrer que l'état général du tissu olfactif n'est pas altéré par l'exposition. Ceci montre que les changements observés ne sont pas aspécifiques. Les mesures de densité de neurones et de RT-qPCR nous permettent de conforter notre **troisième hypothèse** de travail. Nous avions postulé que l'exposition à un odorant entraîne des modifications transitoires de l'épithélium olfactif. En effet les résultats ont révélé que les perturbations s'estompent après une période de post-exposition.

Conformément à des données de la littérature (Wang, Wysocki et al. 1993), mes résultats montrent que les changements observés sur le système olfactif périphérique sont fonction du couple ligand-récepteur. La **quatrième hypothèse** a donc été vérifiée.

Enfin la **cinquième hypothèse** a été confirmée puisque les mesures de quantification des neurones MOR23 ont révélé une diminution des neurones MOR23 matures, sans changement du nombre de neurones immatures, soulignant ainsi un effet de diminution lié à la sur-stimulation des neurones.

Sur ces bases, la discussion générale des résultats comportera cinq parties. La première partie (**partie 1**) sera consacrée aux différentes modifications observée sur l'EO. Dans une seconde partie (**partie 2**), je discuterai des résultats montrant que le tissu olfactif reste globalement intact après une période d'exposition postanatale au Lyral. Dans la troisième partie (**partie 3**), je discuterai des résultats montrant un effet transitoire de l'exposition. L'effet couple ligand-récepteur dépendant fera également l'objet d'une discussion dans une quatrième partie (**partie 4**). Et finalement la dernière partie (**partie 5**) sera consacrée à la discussion des résultats obtenus indiquant que les neurones affectés par l'exposition sont matures.

L'exposition au Lyral affecte le statut anatomique, moléculaire et physiologique de la population des neurones MOR23 ainsi que le comportement des souris vis-à-vis du Lyral.

Les résultats seront discutés selon les quatre approches retenues : anatomique, moléculaire, fonctionnelle et comportementale.

D'un point de vue anatomique, nous avons pu confirmer que la baisse des neurones MOR23 observée sur la partie septale et dorsale (Tazir, B et al ; ECRO 2010) est généralisée sur tout l'épithélium olfactif. Au total, nous avons recensé une baisse d'environ 1300 neurones (**7336** *VS.* **6098 ;** n=5 ; p=0,01), ce qui représente environ **17%** de la population des neurones MOR23.

Les deux explications les plus probables sont : i) les neurones MOR23 meurent par apoptose, ii) la neurogénèse des NRO est affectée. Il est cependant possible que ce soit à la fois une atteinte de l'apoptose et de la neurogénèse. Des études de marquage des neurones MOR23 par la caspase-3 clivée pourraient apporter une réponse à la première hypothèse. La thèse de l'exito-toxicité (Brauchi, Cea et al. 2006) induite par une surélévation de la concentration intracellulaire de calcium est une piste intéressante à exploiter. Nous pourrons envisager dans des expériences ultérieures de bloquer, lors des expositions, des éléments de la cascade olfactives impliqués dans l'augmentation intracellulaire de calcium et d'évaluer le nombre de neurones MOR23. Les résultats de RT-qPCR (résultats **partie 2**) montrent que le niveau d'expression d'un facteur de régulation de la prolifération des cellules basales horizontales, le TGF-α tend à diminuer de 50% (p-value=0,06 ; n=4). L'hypothèse d'une baisse des neurones MOR23 par baisse du taux de prolifération des précurseurs neuronaux pourrait être confirmée en augmentant le nombre d'échantillon de qPCR. De plus, il serait intéressant de voir si une administration de TGF-α au cours de l'exposition serait capable de prévenir ou de réduire le phénotype observé.

Je me suis également intéressé aux modifications du nombre de neurones MOR23 en fonction des zones (postérieure, médiane et antérieure) de l'épithélium olfactif. Les résultats indiquent une variation du nombre de neurones MOR23 en fonction des zones. Cette baisse zonale du nombre de neurones est accompagnée d'une baisse de l'épaisseur de la couche des neurones olfactifs matures. Ceci pourrait souligner, finalement, que la baisse des neurones n'est pas seulement neuro-spécifique mais aussi zone-spécifique. Des phénomènes d'apoptose (peut-être de nécrose) sont vraisemblablement à l'origine des baisses de neurones et d'épaisseur

observées, comme cela a été montré sur culture cellulaire d'épithéliums olfactifs de rats, lors de l'exposition à différents odorants, comme le Lyral ou l'isobutyrate (Brauchi, Cea et al. 2006). Par ailleurs, le processus d'apoptose induit par une stimulation odorante, dépend du paradigme expérimental et de la concentration. En effet, certains auteurs (Watt, Sakano et al. 2004; Santoro and Dulac 2012) ont montré au contraire, un effet de survie induit par l'odorisation. Dans le premier cas (Watt, Sakano et al. 2004), la survie a été basée sur l'étude des neurones transfectés par les adénovirus contenant le récepteur I7 : les conséquences sur la population native des neurones exprimant le récepteur I7 est inconnu. De plus, tandis que nous observons dans notre étude, une baisse des neurones exprimant le récepteur MOR23 après exposition à des concentrations pures de Lyral, une autre étude (Santoro and Dulac 2012) montre au contraire une survie de cette même population après exposition à des concentrations diluées de Lyral.

D'un point de vue moléculaire, la décroissance du nombre de neurones MOR23, largement observée dans la zone septale et « médiane », n'est pas accompagnée d'une modification du niveau d'expression du récepteur MOR23 et des éléments de la cascade de transduction à l'échelle de l'épithélium entier.

A l'inverse, une augmentation significative du niveau d'expression du récepteur MOR23 et de certaines pièces maîtresses de la cascade de transduction (CNGA2 et PDE1C) est observée à l'échelle du neurone MOR23 provenant de la partie septale de l'EO. L'explication la plus probable est que, l'effet de l'exposition à l'odorant durant le développement, induit une surexpression des éléments impliqués dans le signal olfactif, dans le but de compenser la baisse des neurones. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en analysant les neurones MOR23 des régions antérieures et postérieures de l'EO où aucune baisse du nombre de neurones MOR23 n'a été observée.

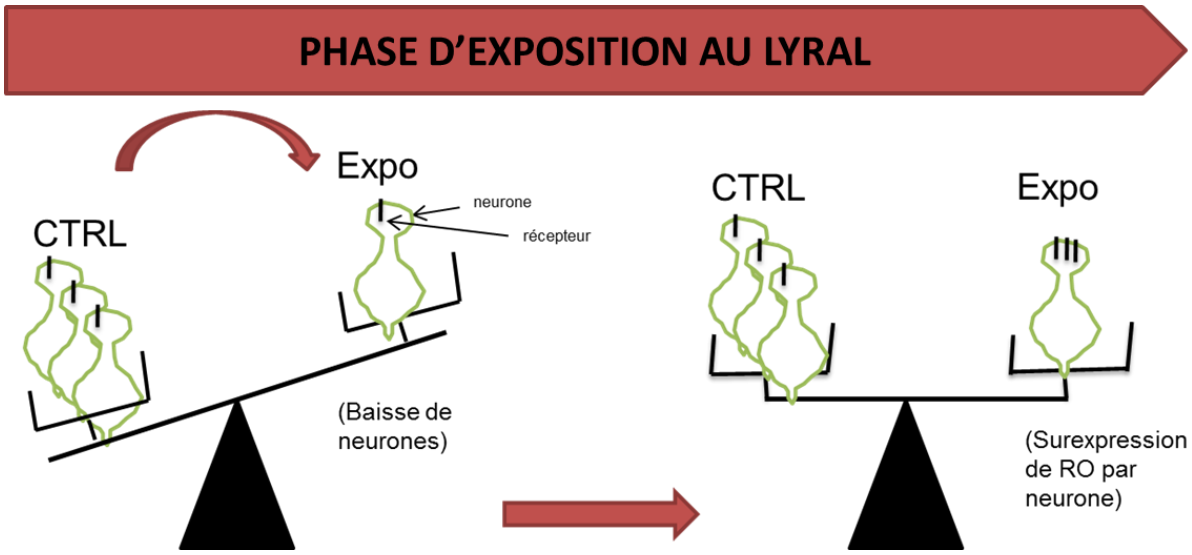


Figure 94. Schéma illustrant le mécanisme de compensation mis en place durant l'exposition postnatale.

Face à la baisse des neurones MOR23, le système olfactif met en place un moyen de maintien de la sensibilité du système olfactif par surexpression de récepteur/neurone

On pourrait penser que le phénomène de compensation est le résultat d'une modification de la régulation de l'expression du récepteur et des éléments de la cascade de transduction olfactive : CNGA2 et PDE1C. La sur-activité des neurones MOR23 augmenterait par exemple le niveau de transactivation de la région promotrice du récepteur MOR23 par l'intermédiaire d'une région de contrôle du locus (LCR). Une étude de Chip, qui permet d'évaluer l'interaction des protéines avec l'ADN (en l'occurrence les facteurs de transcription recrutés par le mécanisme LCR et la région promotrice du récepteur), pourrait confirmer cette hypothèse.

Une autre possibilité est que l'exposition stimulerait la transcription du récepteur MOR23 et des éléments de la cascade de signalisation par acétylation des histones. L'acétylation des histones par l'histone acétyl transférase (HAT) permet d'ouvrir, aux complexes d'activation de la transcription, l'accès à des sites de régulation de la transcription et ce, en diminuant les forces d'interaction entre l'ADN et les histones. Un exemple de HAT est le « CREB-binding protein » (CBP). CREB (*cAMP responsive element binding*) est un facteur de transcription connu pour être activé par la stimulation olfactive via la protéine kinase PKA (Nudelman, DiRocco et al. 2010). CREB est connu pour interagir avec CBP afin d'activer la transcription. En effet dans nos conditions d'expositions au cours d'expériences préliminaires, nous montrons que le Lyral induit l'expression de CREB en l'espace de 30 minutes (**figure 95**). Donc nous pouvons envisager que l'exposition au Lyral induit une surexpression de CBP qui

exposerait les sites de régulation de la transcription et qui interagirait avec CREB-phosphorylé pour activer la transcription des récepteurs (**figure 96**). Des séquences de fixation de CREB ont été retrouvées dans la région promotrice de MOR23 (Vassalli, Rothman et al. 2002). Parmi les sites de régulation de la transcription localisée dans la région promotrice de MOR23, il y a les sites d'homéo-domaines et les séquences O/E like (Vassalli, Rothman et al. 2002). Ainsi des études à venir devront se consacrer à étudier les interactions entre les FT (tel CREB) de transcription et la région promotrice du récepteur MOR23 et ce, par la technique de CHIP ou EMSA (également appelée technique de retard sur gel). Il serait également intéressant de mesurer l'expression de pCREB à partir de muqueuses de souris exposées à l'acétophénone afin d'évaluer la spécificité de notre hypothèse.

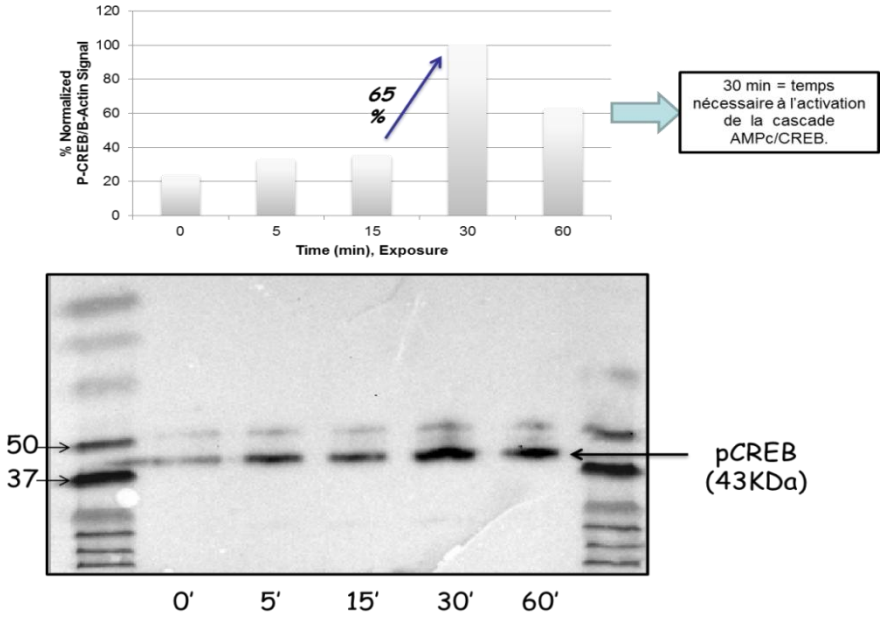


Figure 95. Décours temporel de la production de P-CREB en réponse au Lyral.

Pseudo-quantification de la protéine P-CREB après exposition des souris à différents temps (0, 5 min, 15 min, 30 min et 60 min). Etude sur la muqueuse olfactive.

Ici deux questions se posent ensuite : est-ce que la physiologie des neurones MOR23 est altérée et est-ce que la physiologie de l'ensemble des neurones sensibles au Lyral l'est ?

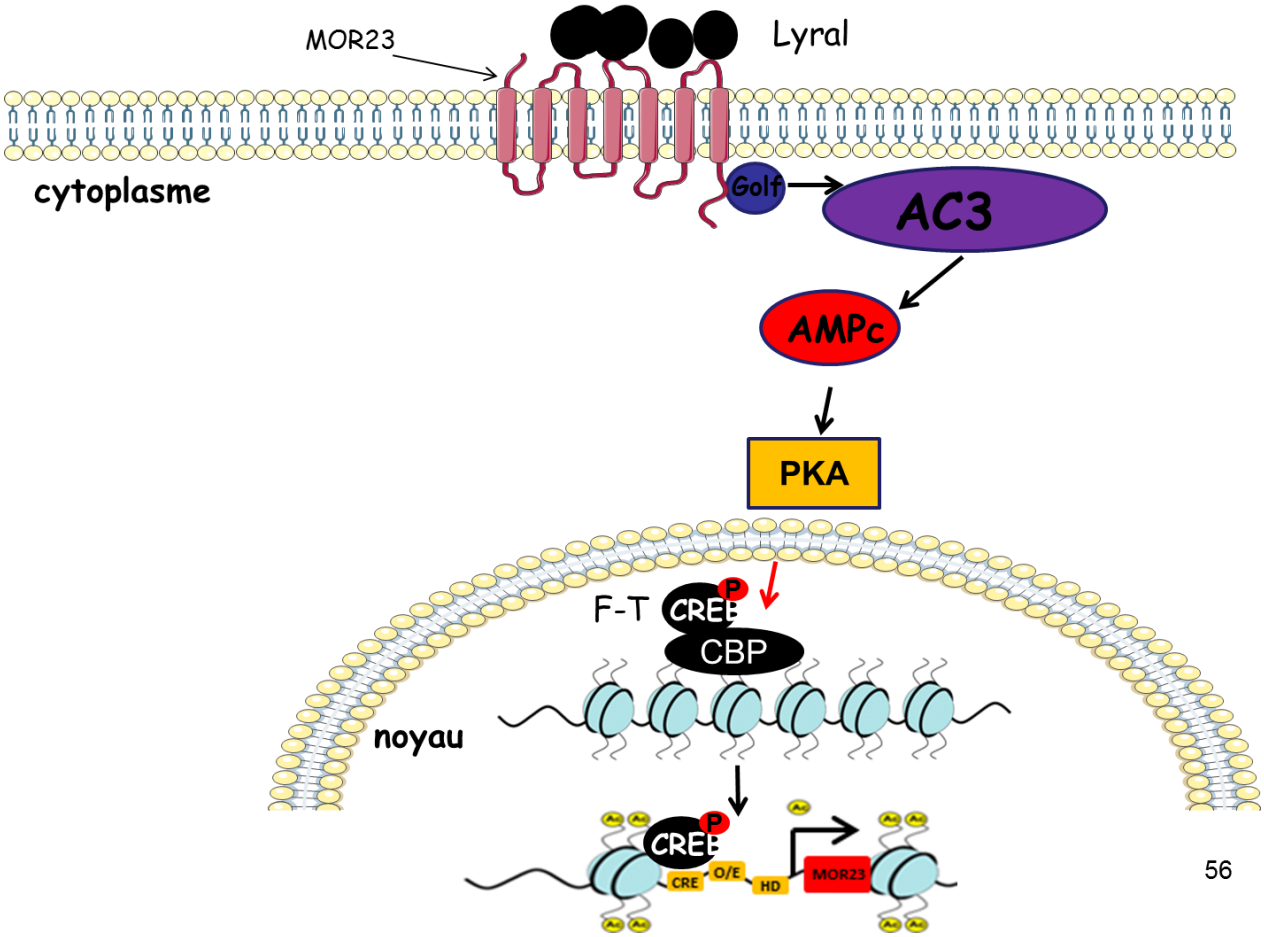


Figure 96. Schéma du mécanisme moléculaire proposé dans la stimulation de l'expression du récepteur MOR23 et des éléments de la cascade de transduction.

(1) première étape et (2) deuxième étape. HAT: histone acétylase ; HD : homéodomaine.

D'un point de vue physiologique, il a été montré dans l'équipe que l'augmentation du niveau d'expression du récepteur MOR23 et de CNGA2 corrèle avec une augmentation de la sensibilité des neurones MOR23. Les neurones MOR23 exposés (de la partie septale de l'EO) répondent sur un spectre de concentrations plus larges que les neurones MOR23 contrôles. De plus ces neurones ont un temps d'attaque plus court, ce qui signifie qu'ils répondent plus rapidement. Par ailleurs, nous remarquons que chez les neurones exposés la réponse est plus courte. Cette observation va dans le sens d'une augmentation de la PDE1C. Cet élément est indispensable à la terminaison rapide de la réponse olfactive (Cygnar and Zhao 2009). Les études à venir devront s'attaquer à élucider le mécanisme moléculaire inhérent aux modifications d'expressions observées. La piste du phénomène épigénétique (par acétylation) a commencé à être exploré (Brian).

Toutefois, il est possible que ces modifications des propriétés électriques des neurones MOR23 soient liées à des changements d'activité des éléments de la cascade de transduction. Une étude pharmacologique évaluée par patch-clamp avec application d'activateurs (**8br cGMP** : CNGA2 ; **Forskoline** : AC3) ou d'inhibiteurs (**MDL 12330A** : AC3 ; **IBMX** : PDE) des éléments de la cascade de transduction permettrait de confirmer cette hypothèse. En somme, ces enregistrements confortent l'hypothèse d'une compensation de la baisse des neurones par une adaptation des neurones MOR23 restants. Ainsi, comme la baisse des neurones MOR23 ne concerne que certaines zones de l'EO, nous devons nous attendre à n'observer aucune différence physiologique entre les neurones des deux groupes issus des zones non atteintes par la baisse.

Enfin nous avons montré en EOG que l'exposition n'induit pas de changement de l'amplitude et de la cinétique de réponse au Lyral. On pourrait émettre l'hypothèse que le système olfactif met en place un moyen de maintien de la sensibilité au Lyral par hypersensibilité des neurones MOR23. Il est aussi possible d'envisager que la baisse des neurones MOR23 ne soit pas suffisante pour induire des modifications de la réponse de l'ensemble des neurones sensibles au Lyral de l'EO.

D'un point de vue comportementale, les tests d'exploration du Lyral montrent que les souris exposées au Lyral passent plus temps à explorer le Lyral que les souris contrôles. De plus, nous montrons que ces souris préfèrent l'odeur du Lyral à une autre odeur comme l'acétophénone. Ces observations vont dans le sens des données retrouvées en littérature indiquant que les hamsters (Cornwell 1976) et les souris (Yee and Wysocki 2001) préfèrent les odorants auxquels ils ont été exposés, plutôt que d'autres odorants. Concernant l'augmentation du temps d'exploration du Lyral et la préférence pour le Lyral, deux explications peuvent être avancées. La première concerne l'augmentation de la sensibilité des neurones MOR23 au Lyral permettant aux animaux exposés de pouvoir mieux détecter l'odeur. En revanche, la deuxième explication serait liée au fait que les souris associent l'odeur du Lyral à l'odeur du nid qui représente une odeur rassurante. Il est à noter que les souris exposées passent moins de temps dans le trou (35±13s *VS.* 49±17s) mais plus de temps dans la zone à trou (208±36s *VS.* 136±30s) que les souris contrôles. Le fait que les animaux restent à distance du trou et n'ont pas besoin de mettre leur nez dans le trou expliquerait qu'elles ont une meilleure sensibilité. Ceci va dans le sens d'une meilleure sensibilité des neurones MOR23 observés en patch. En revanche, cela peut être aussi lié à des effets centraux, telle une augmentation de l'activité des cellules mitrales (Cavallin, Powell et al.

2010). En conséquence, il serait intéressant de déterminer les régions centrales impliquées (ex : cortex piriforme, amygdale etc…) dans la modification du comportement et de réaliser d'autres paradigmes expérimentaux plus fins, comme le test de seuil de détection.

Il a été rapporté (Kerr and Belluscio 2006) que l'altération du comportement des souris vis-à-vis de l'odeur à laquelle elles ont été exposées durant le développement est accompagnée par une accélération de la maturation des glomérules associés aux NRO de l'odeur. Là encore, des travaux à venir devraient se pencher sur l'état des glomérules (taille, projections intra-bulbaires etc…) associés aux NRO MOR23.

Effet spécifique ou aspécifique ?

Au cours de ce travail, nous démontrons à travers plusieurs approches que les changements observés au niveau des neurones MOR23 ne sont pas liés à une toxicité du tissu olfactif.

D'un point de vue anatomique, nos données montrent que l'épaisseur des couches de neurones olfactifs marqués par l'OMP ne varie pas à l'échelle du tissu. Ce qui souligne deux choses : i) La diminution des neurones induite par le Lyral n'est pas généralisée sur le tissu ii) Le Lyral n'induit pas une toxicité de la muqueuse olfactive.

D'un point de vue moléculaire, nos résultats démontrent que, globalement, l'exposition n'affecte pas de manière significative le niveau d'expression des gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels : l'apoptose, la neurogénèse et l'activité mitotique. De plus, nos résultats révèlent que l'exposition n'induit pas l'expression de certains marqueurs de neurotoxicité olfactive tels le CY2A5 et le CYP1A2 (Genter, Marlowe et al. 2006; Xie, Zhou et al. 2010). Ensemble, ces résultats montrent que l'état transcriptionnel du tissu n'est pas modifié, ce qui suggère que les modifications sont spécifiques à la population des neurones MOR23. Il serait, par conséquent, intéressant d'évaluer l'ensemble de ces gènes au niveau des neurones MOR23 et ce, en amplifiant le matériel d'ADNc de départ par une étape de pré-amplification.

D'un point de vue fonctionnel, par des mesures d'EOG sur muqueuses olfactives, nous constatons que l'exposition ne modifie pas les propriétés électriques de l'ensemble des NRO de la muqueuse olfactive. Ces résultats sont à mettre en lien avec les mesures moléculaires et anatomiques précédentes. En effet l'absence de modification des éléments de la cascade de

signalisation et du nombre des neurones olfactifs matures (épaisseur de la couche OMP) pourrait expliquer l'absence de modifications physiologiques de la muqueuse. Ainsi, il serait intéressant de mesurer le potentiel de champ des neurones de la zone médiane où nous avons mesuré une baisse de l'épaisseur de la couche des neurones matures.

Il faut noter que seul un paramètre cinétique a été modifié après l'exposition : le temps de repolarisation. L'explication la plus probable est que les neurones expriment moins d'éléments régulateurs de l'homéostasie calcique tels « **calbindin D-28K**» (calb-2) (Schwaller, Meyer et al. 2002) et le « **gp-96** », comme le montrent nos données de qPCR. Il a été rapporté, par ces mêmes auteurs, que ces éléments jouent un rôle dans le temps du signal calcique. Le calcium est indispensable au signal olfactif.

Effet transitoire ou durable ?

La décroissance du niveau d'expression des gènes du récepteur MOR23 ne se poursuit pas après une phase de récupération. Ces résultats corrèlent avec les mesures de densité montrant que la densité des neurones MOR23 retourne à des valeurs contrôles après une période de récupération. Ensemble, ces faits confortent les données en littérature indiquant que la plasticité du système olfactif lui permet de s'adapter transitoirement à l'environnement (Rochefort and Lledo 2005). A titre d'exemple, une baisse du volume des glomérules et des projections intra-bulbaires chez des souris cautérisées est rétablie après réouverture des narines (Cummings and Belluscio 2010). Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression des éléments de la cascade de transduction ainsi que la physiologie (patch-clamp) des neurones MOR23 après une phase de récupération.

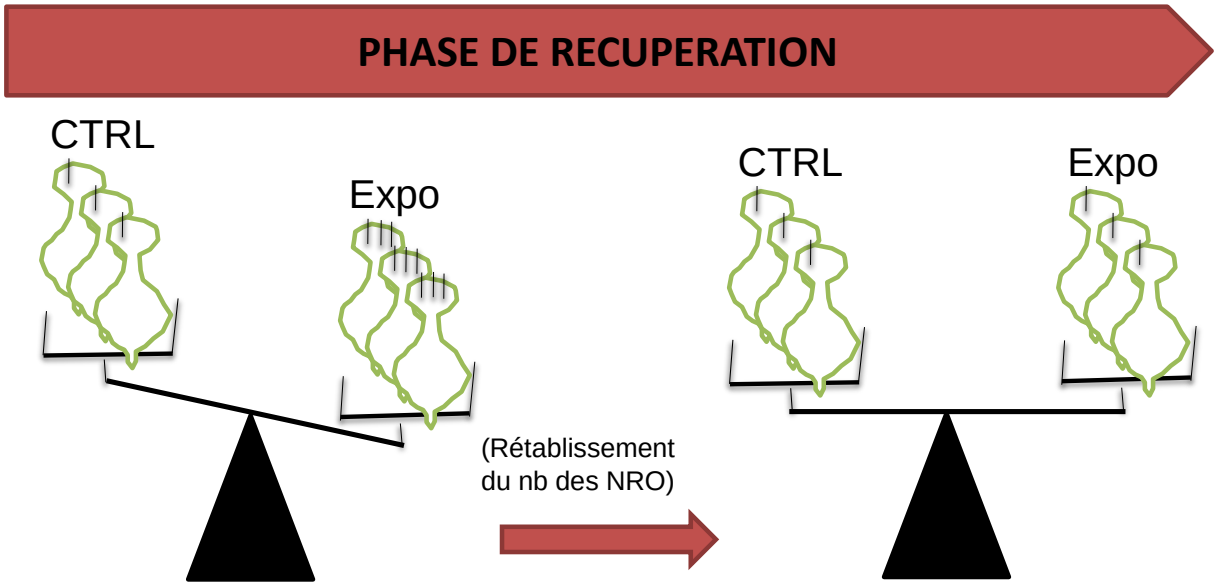


Figure 97. Schéma illustrant le mécanisme de récupération du système olfactif mis en place pendant la période de récupération.

Le retour à la normal du nombre de neurone MOR23 est accompagné d'un retour à la normale du niveau d'expression du récepteur MOR23 par neurone.

Effet couple ligand-récepteur ?

Bien qu'il soit difficile de généraliser que les modifications anatomiques induites par le Lyral soient spécifiques et couple ligand-récepteur dépendant, les changements observés pour le couple Lyral/MOR23 sont absents pour les couples Lyral/M71 et Acétophénone/M71. De même, on peut retrouver dans la littérature que le nombre des neurones exprimant le récepteur M72 baisse à la suite d'expositions répétées de souris à l'acétophénone (Cavallin, Powell et al. 2010) alors que le nombre de neurones exprimant le récepteur I7/M71 ne baisse pas (Kerr and Belluscio 2006) . Ceci renforce l'idée que l'abondance des NRO est sous la dépendance, non seulement de l'environnement, mais aussi du couple ligand-récepteur. Toutefois, comme les conditions d'exposition ne sont pas les mêmes, il faut prendre ces résultats bibliographiques avec précaution : dans un cas, l'odorant est appliqué sur le ventre de l'animal (Kerr and Belluscio 2006) et dans l'autre, par le biais d'une boule à thé (Cavallin, Powell et al. 2010).

En ce qui concerne nos résultats, on pourrait imaginer que les métabolites produits à l'échelle du neurone MOR23 par la dégradation du Lyral soient neurotoxiques mais pas ceux de l'acétophénone. Une autre explication possible est que les deux molécules odorantes ont des propriétés physico-chimiques différentes. Malgré une plus faible volatilité du Lyral, nous avons l'impression que celui-ci reste plus longtemps présent dans l'air ambiant que l'acétophénone et donc stimulerait davantage les neurones MOR23.

De plus, lorsque nous exposons des souris à un autre odorant (l'acétophénone) nous n'observons pas de modification de l'expression de certains éléments de la cascade de transduction olfactive à l'échelle des neurones M71. Il faudrait également vérifier le niveau d'expression du récepteur M71.

Par ailleurs, il est probable que l'exposition à l'acétophénone induise des changements au niveau d'autres zones de l'EO. Il me semblerait utile de faire de la quantification de neurones M71 sur les différentes zones de l'EO afin de répondre à cette hypothèse.

La conclusion majeure est que l'effet observé dans la zone septale de l'EO par l'odorisation précoce des souris est dépendant du couple ligand-récepteur.

Atteinte des neurones matures ou immatures?

Précédemment nous avons démontré que l'odorisation précoce des souris au Lyral induisait une baisse d'environ **1300** neurones MOR23. Mais, est-ce les neurones matures ou ceux immatures qui sont concernés? Selon la littérature (Brauchi, Cea et al. 2006), la baisse affecterait directement les neurones matures par suractivité induisant l'apoptose. Toutefois, selon nos résultats de RT-qPCR indiquant une baisse de facteur de prolifération des neurones (TGF-α), il est probable que la baisse du nombre de neurones soit liée à une atteinte de la neurogénèse. En effet, nous venons de confirmer, par comptage de neurones MOR23 marqués au GAP43 et à l'OMP, que parmi les 1300 neurones « disparus », environ **1050** (n=5 ; p=0,03) sont matures et **250** (n=5 ; p=0,1) sont immatures. En somme, l'exposition au Lyral affecte majoritairement et de manière significative les neurones matures. D'autres comptages seraient utiles pour confirmer la tendance qu'ont les neurones immatures à diminuer. En effet, nous remarquons que les proportions des neurones matures et immatures restent stables entre les deux groupes. Ceci va dans le sens d'une baisse globale des neurones MOR23, ce qui nous conduit à postuler que l'exposition à la fois perturbe la neurogenèse, en inhibant la prolifération de cellules basales et provoque l'apoptose des neurones MOR23 matures. Une étude des neurones marqués au BrdU et à la caspase-3 permettrait de mieux comprendre le mécanisme présidant cette baisse du nombre de neurones. Il serait également intéressant d'élucider les facteurs déclencheurs de la plasticité des NRO. Ainsi, les études à venir devront par exemple se consacrer à déterminer le rôle de certains éléments impliqués dans la survie, tels l'endothéline ou l'IGF dans la surexpression des récepteurs olfactifs par neurone ou dans les propriétés physiologiques des NRO.

Nous avons également montré, par étude de comptage zonale, que la baisse des neurones matures est concentrée dans la zone médiane tandis que celle des neurones immatures est répartie sur les trois zones. Pourquoi ? Pourquoi observe-t-on une baisse significative de ~ **20%** dans la zone médiane contre moins de **10%** (non significatif) et aucune baisse dans les zones respectivement antérieure et postérieure ? Existerait-il un gradient antéro-postérieur d'affinité du Lyral, vis-à-vis de muqueuse ? Le Lyral est-il métabolisé différemment selon les zones de l'EO ? Pour cela, il serait intéressant d'étudier la composition du mucus dans ces trois zones. Toutefois nous observons, par mesure d'épaisseur de l'EO, que seule la zone

médiane est concernée par une diminution de l'épaisseur de la couche des neurones matures. Ainsi, il est fort probable que cette zone soit la cible d'une inflammation conduisant à une nécrose, et donc à la perte de neurones, que des études ultérieures évaluant des marqueurs d'inflammation tel TNF-α pourraient confirmer (Turner, Liang et al. 2010). Le comptage d'une autre population de neurones tels M71 permettrait de savoir si la baisse du nombre de neurones est généralisée sur l'ensemble de la zone médiane.

Si nous imaginons que les produits de métabolisation du Lyral par les NRO sont toxiques, le fait que la zone médiane soit la plus peuplée en MOR23 pourrait expliquer la baisse de la couche de neurones dans cette zone. Finalement, nous pouvons expliquer l'effet zonal de la baisse des neurones MOR23 par une éventuelle différence de propriétés de dynamique cellulaire selon les zones de l'épithélium olfactif (Vedin, Molander et al. 2009). On pourrait imaginer que le turnover des neurones olfactifs est moins important dans la zone médiane que dans le reste de l'épithélium.

Théorie sur le phénomène observé?

Au cours d'une étude de l'activité apoptotique du tissu olfactif, nous avons montré que l'exposition au Lyral induit une apoptose précoce et qu'elle l'inhibe après deux semaines. En effet, une étude de western-blot, chez les contrôles, montre que l'expression de la caspase-3 activée (marqueur d'apoptose) augmente à partir de deux semaines, pour atteindre un pic à trois semaines (**figure 98**). En revanche, chez les sujets traités, l'expression de la caspase3 apparaît à deux semaines puis disparait les semaines suivantes (3, 4 et 6 semaines) (**figure 98**)

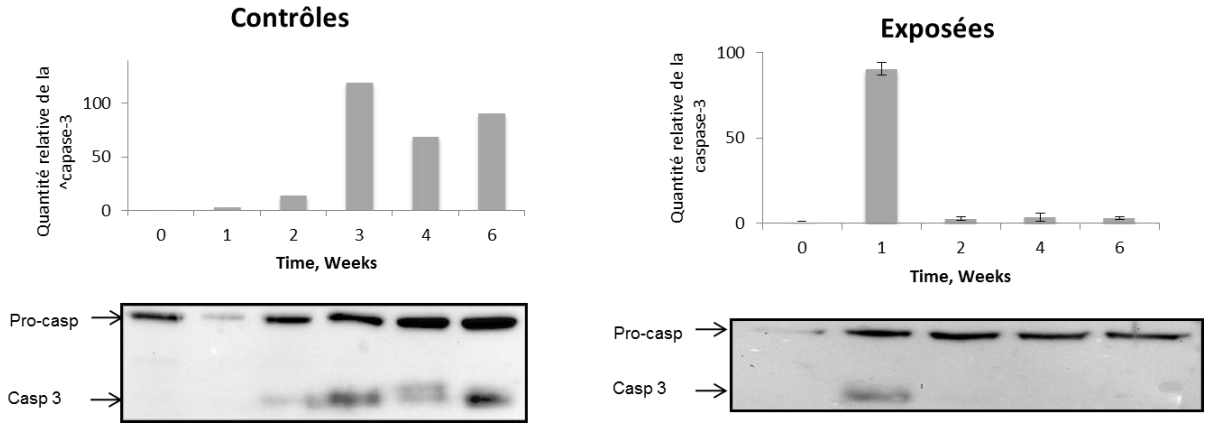


Figure 98. Etude du niveau d'expression de la caspase-3 durant le développement.

En nous basant sur ces résultats préliminaires et en les mettant en lien avec ceux de l'analyse comparative d'ARNm des deux groupes, nous proposons un modèle expliquant la plasticité des neurones MOR23 :

L'exposition au Lyral induirait une apoptose précoce (à J-7) des NRO MOR23 matures par sur-activité. Les NRO mourants ou morts émettraient alors un signal aux cellules non neuronales de la muqueuse et de la sous-muqueuse. En réponse à ce signal, ces cellules vont produire, tout au long de l'exposition, des facteurs de survie (type neurotrophique: NGF, BDNF etc..) afin d'assurer la viabilité des NRO restants. En effet, nous montrons qu'un facteur de survie des NRO, l'**IGF1, NGF** (McCurdy, Feron et al. 2005) a tendance à être plus exprimé chez les sujets traités que chez les sujets contrôles (RQ = 1,5). Par ailleurs, il est tout à fait possible que d'autres facteurs de survie soient aussi impliqués, comme l'endothéline, décrit également comme ayant des propriétés anti-apoptotiques (Laziz, Larbi et al. 2011). En conséquence, cela va provoquer une perturbation de l'équilibre apoptose-survie des NRO. Cela va engendrer une inhibition de la prolifération des précurseurs neuronaux. En effet, nos résultats de qPCR mettent en évidence une diminution de l'expression d'un facteur de prolifération des précurseurs de NRO, le **TGF-α** (RQ = 0,5). Finalement, en vue de maintenir la sensibilité de la muqueuse au Lyral, les NRO, qui se trouvent en moindre nombre, vont devoir sur-exprimer le récepteur et certains éléments de la cascade olfactive par un mécanisme épigénétique (**figure 99**).

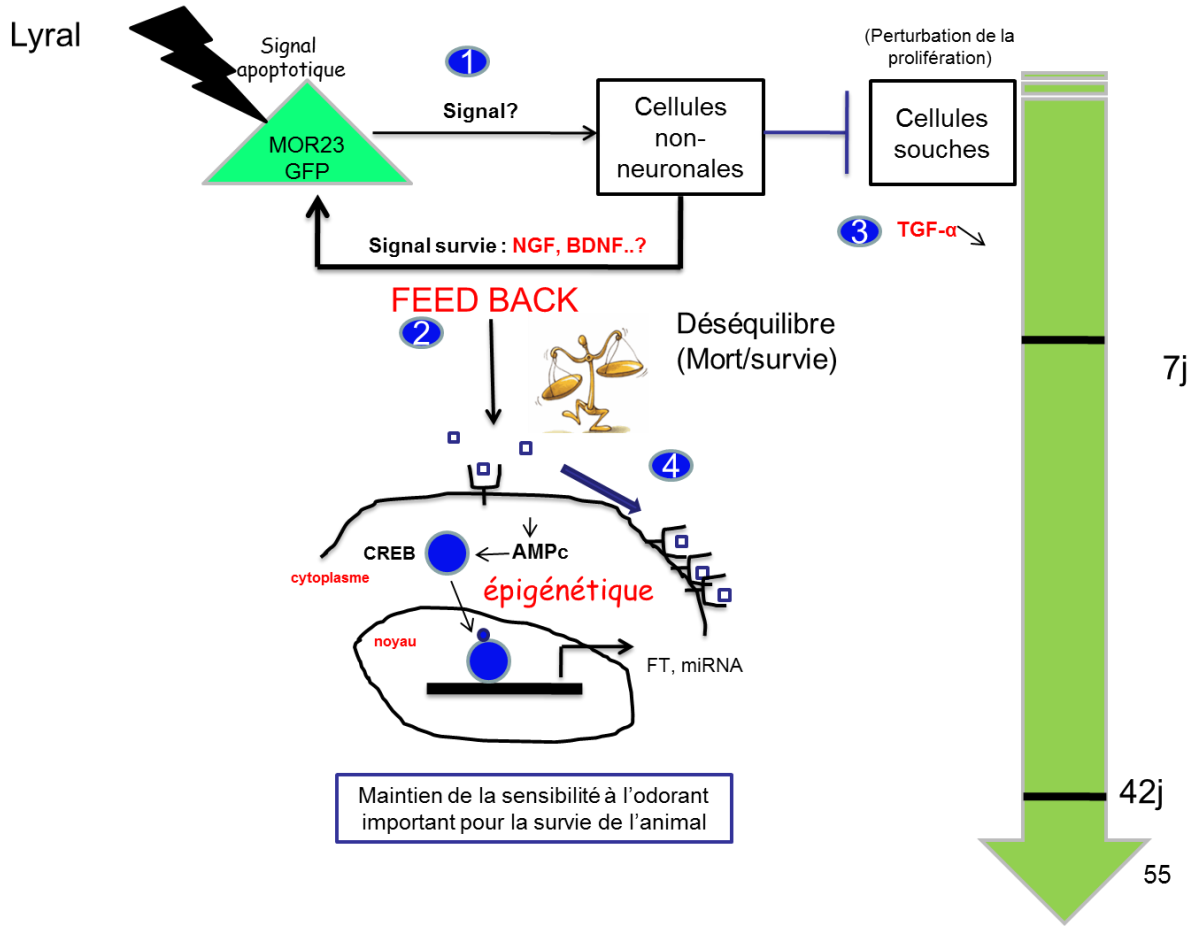


Figure 99. Modèle expliquant le déroulement de la plasticité des neurones MOR23.

CONCLUSION GENERALE

Les données explorant les conséquences sur le système olfactif d'une exposition répétée de souris à un ou des odorants sont rares. Toutefois, des changements physiologiques, anatomiques et moléculaires au niveau périphérique et central ont été rapportés. Il n y a, en revanche, à ce jour, aucune donnée disponible sur les conséquences d'un tel traitement à l'échelle des neurones olfactifs individuels.

Les travaux ici rapportés ont permis de caractériser les modifications des neurones olfactifs survenant au cours d'une exposition répétée des souris à l'odorant, en d'autres termes, leur plasticité. Nous avons pu montrer que l'exposition au Lyral provoque une diminution du nombre de neurones olfactifs matures MOR23 sans affecter l'état général du tissu. En revanche, les neurones MOR23 expriment plus de récepteurs et d'éléments de la cascade olfactifs. De plus, ces neurones deviennent plus sensibles au Lyral. Sur le plan comportemental, les souris exposées développent une préférence pour cet odorant.

Une telle étude pourrait avoir un intérêt dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le rétablissement de la sensibilité chez les patients atteints d'anosmie. L'exposition répétée est une stratégie thérapeutique employée chez certains de ces sujets. Nous savons que les bons résultats obtenus sont, en partie, dus à des changements du système olfactif périphérique. Toutefois, nous ne savons pas si le changement se situe au niveau des neurones olfactifs *per se*. L'effet transitoire et spécifique de l'exposition au Lyral sur les neurones olfactifs MOR23 que nous avons mis en évidence peut expliquer comment cette stratégie thérapeutique pourrait être à l'origine du rétablissement de l'anosmie. D'un point de vue écologique, on pourrait associer cette plasticité des neurones olfactifs à un maintien de la sensibilité de l'EO à un odorant indispensable à la survie de l'animal.

Le développement des méthodes d'études, à l'échelle cellulaire, des neurones olfactifs permettra d'élucider d'autres types de plasticité olfactive. Ainsi, des études à venir pourront chercher à expliquer les mécanismes de modulation de la perception olfactive par le régime alimentaire ou l'état nutritionnel. Grâce à ces nouveaux outils développés au cours de nos travaux, ces études nouvelles permettront de mieux comprendre comment le système olfactif peut évoluer et s'adapter, à la fois aux modifications de l'environnement, ainsi qu'aux changements physiologiques de l'animal.

.

BIBLIOGRAPHIE

Abrous, D. N., M. Koehl, et al. (2005). "Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology." Physiol Rev **85**(2): 523-569.

Ache, B. W. and J. M. Young (2005). "Olfaction: diverse species, conserved principles." Neuron **48**(3): 417-430.

Adriana Polańska (2010). "Allergic and toxic reaction caused by fragrances – a case report." Postępy Dermatologii i Alergologii **XXVII**(6): 511–514.

Andres, K. H. (1966). "[The fine structure of the olfactory region of macrosmatic animals]." Z Zellforsch Mikrosk Anat **69**: 140-154.

Antunes, M. B., B. A. Woodworth, et al. (2007). "Murine nasal septa for respiratory epithelial air-liquid interface cultures." Biotechniques **43**(2): 195-196, 198, 200 passim.

Araneda, R. C., Z. Peterlin, et al. (2004). "A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium." J Physiol **555**(Pt 3): 743-756.

Asai, H., H. Kasai, et al. (1996). "Genomic structure and transcription of a murine odorant receptor gene: differential initiation of transcription in the olfactory and testicular cells." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 240-247.

Asan, E. and D. Drenckhahn (2005). "Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium." Histochem Cell Biol **123**(2): 157-168.

Bakalyar, H. A. and R. R. Reed (1991). "The second messenger cascade in olfactory receptor neurons." Curr Opin Neurobiol **1**(2): 204-208.

Baldwin, D. H., C. P. Tatara, et al. (2011). "Copper-induced olfactory toxicity in salmon and steelhead: extrapolation across species and rearing environments." Aquat Toxicol **101**(1): 295-297.

Barbour, J., E. M. Neuhaus, et al. (2008). "New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in Mus musculus by quantitative proteomics." J Proteome Res **7**(4): 1594-1605.

Barry, P. H. (2003). "The relative contributions of cAMP and InsP3 pathways to olfactory responses in vertebrate olfactory receptor neurons and the specificity of odorants for both pathways." J Gen Physiol **122**(3): 247-250.

Barth, A. L., J. C. Dugas, et al. (1997). "Noncoordinate expression of odorant receptor genes tightly linked in the zebrafish genome." Neuron **19**(2): 359-369.

Bathellier, B., O. Gschwend, et al. (2010). Temporal Coding in Olfaction. The Neurobiology of Olfaction. A. Menini. Boca Raton (FL).

Beites, C. L., S. Kawauchi, et al. (2005). "Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium." Exp Cell Res **306**(2): 309-316.

Benbernou, N., S. Robin, et al. (2011). "cAMP and IP3 signaling pathways in HEK293 cells transfected with canine olfactory receptor genes." J Hered **102 Suppl 1**: S47-61.

Biel, M. and S. Michalakis (2009). "Cyclic nucleotide-gated channels." Handb Exp Pharmacol(191): 111-136.

Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-1729.

Boekhoff, I., E. Tareilus, et al. (1990). "Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants." EMBO J **9**(8): 2453-2458.

Borisy, F. F., G. V. Ronnett, et al. (1992). "Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons." J Neurosci **12**(3): 915-923.

Bozza, T., P. Feinstein, et al. (2002). "Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system." J Neurosci **22**(8): 3033-3043.

Bozza, T., A. Vassalli, et al. (2009). "Mapping of class I and class II odorant receptors to glomerular domains by two distinct types of olfactory sensory neurons in the mouse." Neuron **61**(2): 220-233.
Brauchi, S., C. Cea, et al. (2006). "Apoptosis induced by prolonged exposure to odorants in cultured cells from rat olfactory epithelium." Brain Res **1103**(1): 114-122.
Brechbuhl, J., M. Klaey, et al. (2008). "Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice." Science **321**(5892): 1092-1095.
Brennan, P. A. and E. B. Keverne (2004). "Something in the air? New insights into mammalian pheromones." Curr Biol **14**(2): R81-89.
Brennan, P. A. and F. Zufall (2006). "Pheromonal communication in vertebrates." Nature **444**(7117): 308-315.
Brenneman, K. A., R. A. James, et al. (2000). "Olfactory neuron loss in adult male CD rats following subchronic inhalation exposure to hydrogen sulfide." Toxicol Pathol **28**(2): 326-333.
Brian, D. Epigenetic'marking'of'an'olfactory'receptor'in'the'

mouse'olfactory'epithelium'–'potential'implications'

for'learningSinduced'structural'and'functional'

plasticity. XVI International Symposium on Olfaction and Taste.
Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.
Buck, L. B. (1992). "The olfactory multigene family." Curr Opin Neurobiol **2**(3): 282-288.
Buck, L. B. (2000). "The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals." Cell **100**(6): 611-618.
Buonviso, N., R. Gervais, et al. (1998). "Short-lasting exposure to one odour decreases general reactivity in the olfactory bulb of adult rats." Eur J Neurosci **10**(7): 2472-2475.
Buron, G., R. Hacquemand, et al. (2011). "Effects of pyridine inhalation exposure on olfactory epithelium in mice." Exp Toxicol Pathol.
Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
Busto, G. U., J. E. Elie, et al. (2009). "Expression of Zif268 in the granule cell layer of the adult mouse olfactory bulb is modulated by experience." Eur J Neurosci **29**(7): 1431-1439.

Calof, A. L. (1995). "Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis." Curr Opin Neurobiol **5**(1): 19-27.
Calof, A. L., A. Bonnin, et al. (2002). "Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage." Microsc Res Tech **58**(3): 176-188.
Calof, A. L., N. Hagiwara, et al. (1996). "Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium." J Neurobiol **30**(1): 67-81.
Calof, A. L., J. S. Mumm, et al. (1998). "The neuronal stem cell of the olfactory epithelium." J Neurobiol **36**(2): 190-205.
Carter, L. A., J. L. MacDonald, et al. (2004). "Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype." J Neurosci **24**(25): 5670-5683.
Cau, E., G. Gradwohl, et al. (1997). "Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors." Development **124**(8): 1611-1621.
Cavallin, M. A., K. Powell, et al. (2010). "State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging." Neurosci Lett **483**(2): 90-95.

Chamero, P., T. Leinders-Zufall, et al. (2012). "From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ." Trends Neurosci **35**(10): 597-606.
Chastrette, M. (1997). "Trends in structure-odor relationships." SAR QSAR Environ Res **6**(3-4): 215-254.
Chehrehasa, F., J. A. Ekberg, et al. (2012). "Two phases of replacement replenish the olfactory ensheathing cell population after injury in postnatal mice." Glia **60**(2): 322-332.
Coppola, D. M. and C. T. Waggener (2012). "The effects of unilateral naris occlusion on gene expression profiles in mouse olfactory mucosa." J Mol Neurosci **47**(3): 604-618.
Cornwell, C. A. (1976). "Selective olfactory exposure alters social and plant odor preferences of immature hamsters." Behav Biol **17**(1): 131-137.
Cummings, D. M. and L. Belluscio (2010). "Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry." J Neurosci **30**(27): 9172-9180.
Cunningham, A. M., D. K. Ryugo, et al. (1993). "Neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to the plasma membrane of olfactory cilia." Neuroscience **57**(2): 339-352.
Cygnar, K. D. and H. Zhao (2009). "Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons." Nat Neurosci **12**(4): 454-462.
Dahl, A. R., W. M. Hadley, et al. (1982). "Cytochrome P-450-dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: possible role in tumorigenicity." Science **216**(4541): 57-59.
Dixon, R. A., B. K. Kobilka, et al. (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin." Nature **321**(6065): 75-79.
Doving, K. B. and A. J. Pinching (1973). "Selective degeneration of neurons in the olfactory bulb following prolonged odour exposure." Brain Res **52**: 115-129.

Eggan, K., K. Baldwin, et al. (2004). "Mice cloned from olfactory sensory neurons." Nature **428**(6978): 44-49.
Elsaesser, R. and J. Paysan (2007). "The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells." BMC Neurosci **8 Suppl 3**: S1.
Emmert-Buck, M. R., R. F. Bonner, et al. (1996). "Laser capture microdissection." Science **274**(5289): 998-1001.
Ennis, M., L. A. Zimmer, et al. (1996). "Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro." Neuroreport **7**(5): 989-992.
Esumi, S., R. Kaneko, et al. (2006). "Split single-cell RT-PCR analysis of Purkinje cells." Nat Protoc **1**(4): 2143-2151.

Farbman, A. I., P. C. Brunjes, et al. (1988). "The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium." J Neurosci **8**(9): 3290-3295.
Farbman, A. I. and J. A. Buchholz (1996). "Transforming growth factor-alpha and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro." J Neurobiol **30**(2): 267-280.
Farbman, A. I. and F. L. Margolis (1980). "Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization." Dev Biol **74**(1): 205-215.
Feldmesser, E., T. Olender, et al. (2006). "Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes." BMC Genomics **7**: 121.
Firestein, S. (2001). "How the olfactory system makes sense of scents." Nature **413**(6852): 211-218.

Fleige, S. and M. W. Pfaffl (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." Mol Aspects Med **27**(2-3): 126-139.
Fleige, S., V. Walf, et al. (2006). "Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR." Biotechnol Lett **28**(19): 1601-1613.
Fleischer, J., H. Breer, et al. (2009). "Mammalian olfactory receptors." Front Cell Neurosci **3**: 9.
Frings, S., D. H. Hackos, et al. (2000). "Determination of fractional calcium ion current in cyclic nucleotide-gated channels." Methods Enzymol **315**: 797-817.
Fuchs, T., G. Glusman, et al. (2001). "The human olfactory subgenome: from sequence to structure and evolution." Hum Genet **108**(1): 1-13.
Fuss, S. H., M. Omura, et al. (2007). "Local and cis effects of the H element on expression of odorant receptor genes in mouse." Cell **130**(2): 373-384.

Galizia, C. G. and S. Sachse (2010). Odor Coding in Insects. The Neurobiology of Olfaction. A. Menini. Boca Raton (FL).
Genter, M. B. (2006). "Molecular biology of the nasal airways: how do we assess cellular and molecular responses in the nose?" Toxicol Pathol **34**(3): 274-280.
Genter, M. B., J. Marlowe, et al. (2006). "Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs." Biochem Biophys Res Commun **348**(1): 120-123.
Getchell, M. L., M. A. Boggess, et al. (2002). "Expression of TGF-beta type II receptors in the olfactory epithelium and their regulation in TGF-alpha transgenic mice." Brain Res **945**(2): 232-241.
Getchell, M. L., J. A. Rafols, et al. (1984). "Histological and histochemical studies of the secretory components of the salamander olfactory mucosa: effects of isoproterenol and olfactory nerve section." Anat Rec **208**(4): 553-565.
Getchell, T. V. (1986). "Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons." Physiol Rev **66**(3): 772-818.
Gokoffski, K. K., S. Kawauchi, et al. (2010). Feedback Regulation of Neurogenesis in the Mammalian Olfactory Epithelium: New Insights from Genetics and Systems Biology. The Neurobiology of Olfaction. A. Menini. Boca Raton (FL).
Graziadei, P. P. and G. A. Graziadei (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons." J Neurocytol **8**(1): 1-18.
Grill, R. J. and S. K. Pixley (1997). "In vitro generation of adult rat olfactory sensory neurons and regulation of maturation by coculture with CNS tissues." J Neurosci **17**(9): 3120-3127.
Grosmaitre, X., S. H. Fuss, et al. (2009). "SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile." J Neurosci **29**(46): 14545-14552.
Grosmaitre, X., L. C. Santarelli, et al. (2007). "Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors." Nat Neurosci **10**(3): 348-354.
Grosmaitre, X., A. Vassalli, et al. (2006). "Odorant responses of olfactory sensory neurons expressing the odorant receptor MOR23: a patch clamp analysis in gene-targeted mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1970-1975.

Haberly, L. B. (2001). "Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry." Chem Senses **26**(5): 551-576.

Hashiguchi, Y. and M. Nishida (2007). "Evolution of trace amine associated receptor (TAAR) gene family in vertebrates: lineage-specific expansions and degradations of a second class of vertebrate chemosensory receptors expressed in the olfactory epithelium." Mol Biol Evol **24**(9): 2099-2107.
He, J., H. Tian, et al. (2012). "Postnatal experience modulates functional properties of mouse olfactory sensory neurons." Eur J Neurosci **36**(4): 2452-2460.
Hegg, C. C., C. Jia, et al. (2010). "Microvillous cells expressing IP3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice." Eur J Neurosci **32**(10): 1632-1645.
Hirota, J. and P. Mombaerts (2004). "The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8751-8755.
Ho-Pun-Cheung, A., C. Bascoul-Mollevi, et al. (2009). "Validation of an appropriate reference gene for normalization of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction data from rectal cancer biopsies." Anal Biochem **388**(2): 348-350.
Hurtt, M. E., D. A. Thomas, et al. (1988). "Degeneration and regeneration of the olfactory epithelium following inhalation exposure to methyl bromide: pathology, cell kinetics, and olfactory function." Toxicol Appl Pharmacol **94**(2): 311-328.

Imai, T. and H. Sakano (2009). "Odorant receptor gene choice and axonal projection in the mouse olfactory system." Results Probl Cell Differ **47**: 57-75.

Jones, D. T. and R. R. Reed (1989). "Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction." Science **244**(4906): 790-795.

Kaluza, J. F., F. Gussing, et al. (2004). "Olfactory receptors in the mouse septal organ." J Neurosci Res **76**(4): 442-452.
Kato, A., S. Katada, et al. (2008). "Amino acids involved in conformational dynamics and G protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation." J Neurochem **107**(5): 1261-1270.
Kawai, F., T. Kurahashi, et al. (1997). "Quantitative analysis of Na+ and Ca2+ current contributions on spike initiation in the newt olfactory receptor cell." Jpn J Physiol **47**(4): 367-376.
Kempermann, G. and F. H. Gage (1999). "Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal." Hippocampus **9**(3): 321-332.
Kerr, M. A. and L. Belluscio (2006). "Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb." Nat Neurosci **9**(4): 484-486.
Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995). "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse." Biol Reprod **52**(4): 709-720.
Kleene, S. J. and R. C. Gesteland (1981). "Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide." Brain Res **229**(2): 536-540.
Ko, H. J. and T. H. Park (2006). "Dual signal transduction mediated by a single type of olfactory receptor expressed in a heterologous system." Biol Chem **387**(1): 59-68.
Kurahashi, T. and A. Menini (1997). "Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell." Nature **385**(6618): 725-729.

Laziz, I., A. Larbi, et al. (2011). "Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium." Neuroscience **172**: 20-29.
Leary, J. F. (2005). "Ultra high-speed sorting." Cytometry A **67**(2): 76-85.

Lee, A. C., H. Tian, et al. (2009). "Expression patterns of odorant receptors and response properties of olfactory sensory neurons in aged mice." Chem Senses **34**(8): 695-703.
Leinders-Zufall, T., P. Brennan, et al. (2004). "MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ." Science **306**(5698): 1033-1037.
Levai, O. and J. Strotmann (2003). "Projection pattern of nerve fibers from the septal organ: DiI-tracing studies with transgenic OMP mice." Histochem Cell Biol **120**(6): 483-492.
Liberles, S. D. and L. B. Buck (2006). "A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium." Nature **442**(7103): 645-650.
Lin, W., R. Margolskee, et al. (2007). "Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2471-2476.
Little, E. E., R. D. Calfee, et al. (2012). "Toxicity of Copper to Early-life Stage Kootenai River White Sturgeon, Columbia River White Sturgeon, and Rainbow Trout." Arch Environ Contam Toxicol **63**(3): 400-408.
Lomvardas, S., G. Barnea, et al. (2006). "Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice." Cell **126**(2): 403-413.

Ma, M. (2007). "Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(6): 463-480.
Malnic, B., D. C. Gonzalez-Kristeller, et al. (2010). Odorant Receptors. The Neurobiology of Olfaction. A. Menini. Boca Raton (FL).
Mamasuew, K., H. Breer, et al. (2008). "Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures." Eur J Neurosci **28**(9): 1775-1785.
Mamasuew, K., N. Hofmann, et al. (2011). "Grueneberg ganglion neurons are activated by a defined set of odorants." Chem Senses **36**(3): 271-282.
Man, O., Y. Gilad, et al. (2004). "Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons." Protein Sci **13**(1): 240-254.
Mandairon, N., A. Didier, et al. (2008). "Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception." Neurobiol Learn Mem **90**(1): 178-184.
Mandairon, N., C. Stack, et al. (2006). "Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats." Behav Neurosci **120**(1): 173-179.
Mandairon, N., C. Stack, et al. (2006). "Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures." Physiol Behav **89**(3): 379-384.
Mandairon, N., S. Sultan, et al. (2009). "A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice." J Neurosci Methods **180**(2): 296-303.
Marshall, D. A. and J. A. Maruniak (1986). "Masera's organ responds to odorants." Brain Res **366**(1-2): 329-332.
Mathonnet, M., P. Cubertafond, et al. (2001). "[The avian peripheral olfactory system: model for study of apoptosis and cellular regeneration]." Ann Chir **126**(9): 888-895.
Matthews, H. R. and J. Reisert (2003). "Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation." Curr Opin Neurobiol **13**(4): 469-475.
McCurdy, R. D., F. Feron, et al. (2005). "Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I." Eur J Neurosci **22**(7): 1581-1588.
Meisami, E. (1976). "Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia." Brain Res **107**(2): 437-444.
Mellert, T. K., M. L. Getchell, et al. (1992). "Characterization of the immune barrier in human olfactory mucosa." Otolaryngol Head Neck Surg **106**(2): 181-188.
Menini, A. (2010). The Neurobiology of Olfaction, CRC Press.

Menini, A., L. Lagostena, et al. (2004). "Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex." News Physiol Sci **19**: 101-104.
Mombaerts, P. (1996). "Targeting olfaction." Curr Opin Neurobiol **6**(4): 481-486.
Mombaerts, P. (1999). "Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors." Science **286**(5440): 707-711.
Mori, K., H. Nagao, et al. (1999). "The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information." Science **286**(5440): 711-715.
Munger, S. D., T. Leinders-Zufall, et al. (2010). "An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning." Curr Biol **20**(16): 1438-1444.
Munger, S. D., T. Leinders-Zufall, et al. (2009). "Subsystem organization of the mammalian sense of smell." Annu Rev Physiol **71**: 115-140.
Murray, R. C., D. Navi, et al. (2003). "Widespread defects in the primary olfactory pathway caused by loss of Mash1 function." J Neurosci **23**(5): 1769-1780.

Nef, P., J. Heldman, et al. (1989). "Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception." J Biol Chem **264**(12): 6780-6785.
Negroni, J., N. Meunier, et al. (2012). "Neuropeptide Y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats." PLoS One **7**(9): e45266.
Newman, M. P., F. Feron, et al. (2000). "Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium." Neuroscience **99**(2): 343-350.
Nguyen, M. Q., Z. Zhou, et al. (2007). "Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allelic exclusion." Cell **131**(5): 1009-1017.
Nishizumi, H., K. Kumasaka, et al. (2007). "Deletion of the core-H region in mice abolishes the expression of three proximal odorant receptor genes in cis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 20067-20072.
Novotny, M., F. J. Schwende, et al. (1984). "Identification of a testosterone-dependent unique volatile constituent of male mouse urine: 7-exo-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]-3-octene." Experientia **40**(2): 217-219.
Nudelman, A. S., D. P. DiRocco, et al. (2010). "Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo." Hippocampus **20**(4): 492-498.

Ohloff, G. (1986). "Chemistry of odor stimuli." Experientia **42**(3): 271-279.

Petridou-Fischer, J. and A. Dahl (1988). "Inhibition of nasal and liver cytochrome P-450 mono-oxygenases by dioxolanes." Xenobiotica **18**(1): 1-9.
Pifferi, S., G. Pascarella, et al. (2006). "Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12929-12934.
Pilpel, Y. and D. Lancet (1999). "The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins." Protein Sci **8**(5): 969-977.
Pruitt, K. D., J. Harrow, et al. (2009). "The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes." Genome Res **19**(7): 1316-1323.

Quignon, P., M. Giraud, et al. (2005). "The dog and rat olfactory receptor repertoires." Genome Biol **6**(10): R83.

Radford, D. M., K. Fair, et al. (1993). "Allelic loss on a chromosome 17 in ductal carcinoma in situ of the breast." Cancer Res **53**(13): 2947-2949.
Ressler, K. J., S. L. Sullivan, et al. (1994). "A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system." Curr Opin Neurobiol **4**(4): 588-596.
Riviere, S., L. Challet, et al. (2009). "Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors." Nature **459**(7246): 574-577.
Rochefort, C., G. Gheusi, et al. (2002). "Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory." J Neurosci **22**(7): 2679-2689.
Rochefort, C. and P. M. Lledo (2005). "Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment." Eur J Neurosci **22**(11): 2863-2870.
Rodriguez, I., P. Feinstein, et al. (1999). "Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system." Cell **97**(2): 199-208.
Roskams, A. J., X. Cai, et al. (1998). "Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat." Neuroscience **83**(1): 191-200.
Rothman, A., P. Feinstein, et al. (2005). "The promoter of the mouse odorant receptor gene M71." Mol Cell Neurosci **28**(3): 535-546.
Rousselot, P., C. Lois, et al. (1995). "Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice." J Comp Neurol **351**(1): 51-61.

Salesse, R. (2012). Odorat et goût.
Sandahl, J. F., D. H. Baldwin, et al. (2005). "Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos." Environ Toxicol Chem **24**(1): 136-145.
Santoro, S. W. and C. Dulac (2012). "The activity-dependent histone variant H2BE modulates the life span of olfactory neurons." Elife **1**: e00070.
Schild, D. and D. Restrepo (1998). "Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells." Physiol Rev **78**(2): 429-466.
Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
Schwaller, B., M. Meyer, et al. (2002). "'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice." Cerebellum **1**(4): 241-258.
Schwob, J. E. (2002). "Neural regeneration and the peripheral olfactory system." Anat Rec **269**(1): 33-49.
Scott, J. W. and T. Brierley (1999). "A functional map in rat olfactory epithelium." Chem Senses **24**(6): 679-690.
Serizawa, S., K. Miyamichi, et al. (2003). "Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse." Science **302**(5653): 2088-2094.
Serizawa, S., K. Miyamichi, et al. (2004). "One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system." Trends Genet **20**(12): 648-653.
Shibata, D., D. Hawes, et al. (1992). "Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction." Am J Pathol **141**(3): 539-543.
Suzuki, Y., M. Takeda, et al. (1996). "Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy." J Comp Neurol **376**(4): 509-517.

Tanabe, T., M. Iino, et al. (1975). "Discrimination of odors in olfactory bulb, pyriform-amygdaloid areas, and orbitofrontal cortex of the monkey." J Neurophysiol **38**(5): 1284-1296.
Taniguchi, K., T. Kajiyama, et al. (2009). "Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR." Nat Methods **6**(7): 503-506.
Tian, H. and M. Ma (2004). "Molecular organization of the olfactory septal organ." J Neurosci **24**(38): 8383-8390.
Tierney, K. B., P. S. Ross, et al. (2007). "Linuron and carbaryl differentially impair baseline amino acid and bile salt olfactory responses in three salmonids." Toxicology **231**(2-3): 175-187.
Tierney, K. B., J. L. Sampson, et al. (2008). "Salmon olfaction is impaired by an environmentally realistic pesticide mixture." Environ Sci Technol **42**(13): 4996-5001.
Touhara, K., S. Sengoku, et al. (1999). "Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 4040-4045.
Tucker, K. L., M. Meyer, et al. (2001). "Neurotrophins are required for nerve growth during development." Nat Neurosci **4**(1): 29-37.
Turner, A. M. and W. T. Greenough (1985). "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron." Brain Res **329**(1-2): 195-203.
Turner, J. H., K. L. Liang, et al. (2010). "Tumor necrosis factor alpha inhibits olfactory regeneration in a transgenic model of chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss." Am J Rhinol Allergy **24**(5): 336-340.

Vassalli, A., A. Rothman, et al. (2002). "Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb." Neuron **35**(4): 681-696.
Vedin, V., M. Molander, et al. (2009). "Regional differences in olfactory epithelial homeostasis in the adult mouse." J Comp Neurol **513**(4): 375-384.
Voigt, J. M., F. P. Guengerich, et al. (1985). "Localization of a cytochrome P-450 isozyme (cytochrome P-450 PB-B) and NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat nasal mucosa." Cancer Lett **27**(3): 241-247.
von Ahlfen, S., A. Missel, et al. (2007). "Determinants of RNA quality from FFPE samples." PLoS One **2**(12): e1261.

Wang, H. W., C. J. Wysocki, et al. (1993). "Induction of olfactory receptor sensitivity in mice." Science **260**(5110): 998-1000.
Wardlaw, S. A., K. J. Nikula, et al. (1998). "Effect of cigarette smoke on CYP1A1, CYP1A2 and CYP2B1/2 of nasal mucosae in F344 rats." Carcinogenesis **19**(4): 655-662.
Watt, W. C., H. Sakano, et al. (2004). "Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB." Neuron **41**(6): 955-967.
Weiler, E. and A. I. Farbman (1998). "Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally." Glia **22**(4): 315-328.
Woutersen, R. A., L. M. Appelman, et al. (1984). "Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months." Toxicology **31**(2): 123-133.

Xie, F., X. Zhou, et al. (2010). "Mechanisms of olfactory toxicity of the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: essential roles of CYP2A5 and target-tissue metabolic activation." Toxicol Appl Pharmacol **249**(1): 101-106.

Xie, F., X. Zhou, et al. (2011). "The tissue-specific toxicity of methimazole in the mouse olfactory mucosa is partly mediated through target-tissue metabolic activation by CYP2A5." Drug Metab Dispos **39**(6): 947-951.
Xie, Q., Q. Y. Zhang, et al. (2000). "Induction of mouse CYP2J by pyrazole in the eye, kidney, liver, lung, olfactory mucosa, and small intestine, but not in the heart." Drug Metab Dispos **28**(11): 1311-1316.
Xie, S. Y., P. Feinstein, et al. (2000). "Characterization of a cluster comprising approximately 100 odorant receptor genes in mouse." Mamm Genome **11**(12): 1070-1078.

Yee, K. K. and C. J. Wysocki (2001). "Odorant exposure increases olfactory sensitivity: olfactory epithelium is implicated." Physiol Behav **72**(5): 705-711.
Young, J. M., B. M. Shykind, et al. (2003). "Odorant receptor expressed sequence tags demonstrate olfactory expression of over 400 genes, extensive alternate splicing and unequal expression levels." Genome Biol **4**(11): R71.

Zald, D. H. and J. V. Pardo (2000). "Functional neuroimaging of the olfactory system in humans." Int J Psychophysiol **36**(2): 165-181.
Zhang, J., R. Pacifico, et al. (2013). "Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor." J Neurosci **33**(7): 3228-3239.
Zhang, X., M. Rogers, et al. (2004). "High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14168-14173.
Zhao, H. and R. R. Reed (2001). "X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system." Cell **104**(5): 651-660.
Zou, D. J., P. Feinstein, et al. (2004). "Postnatal refinement of peripheral olfactory projections." Science **304**(5679): 1976-1979.

ANNEXE

Publication Internationale : (en cours de soumission dans la revue PNAS**)**

Postnatal olfactory exposure induces plasticity in MOR23 olfactory sensory neurons at the cellular level

Cadiou H*, **Aoudé I***, Tazir B, Fenech C, Meunier N, Grosmaitre X.

*Equal contributions

Abstract

Mammalian olfactory sensory neurons represent the primary elements of the olfactory system. Inserted in the olfactory mucosa bordering the nasal cavity, they are exposed to the environment. In consequence,their lifetime is short. Many reports thoroughly describe that they are regularly regenerated during the entire life of the animals. However the impact of the environment at the cellular level and more precisely the consequences of an early postnatal olfactory exposure are not known. Here we show that the environment can induce plasticity at the cellularlevel in olfactory sensory neurons. Daily postnatal exposure to a specific odorant, Lyral, induces plasticity in a specific population of olfactory neurons expressing MOR23, an odorant receptor sensitive to Lyral. Using anatomical analysis we show that the density of OSNs expressing MOR23 decreases after odorant exposure. Using biochemistry and molecular biology tools we observe that the amount of MOR23 mRNA and protein does not decrease at the entire epithelium level. Meanwhile,quantitative PCR at the cellular level indicates that each MOR23 neuron expresses more OR protein. MOR23 neurons also express more CNGA2 and PDE1C, which are fundamental olfactory transduction pathway proteins. Using patch-clamp recordings we then show that exposed MOR23 neurons respond to Lyral with higher sensitivity, broader dynamic range, faster rise-time and shorter responses while the overall amplitude did not change. Our results suggest that cellular plasticity takes place at the peripheral olfactory system, allowing the olfactory system to adapt to the environment.

Communication nationale :

Aoudé. I, Cadiou. H, Tazir. B, Fenech. C and Grosmaitre. X[*].[1] Morphological and molecular changes in mouse olfactory epithelium following postnatal odorant exposures. 10e colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, mai 2011. **Affiche**.

Communications internationales :

Imad Aoudé, Claire Fenech and Xavier Grosmaitre[*]. Olfactory sensory neurons plasticity induced by postnatal odorant exposure. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, Stockholm, Sweden, June 2012. **Présentation orale**.

Imad Aoudé, Hervé Cadiou, Claire Fenech and Xavier Grosmaitre[*]. Mouse olfactory sensory neurons' plasticity induced by postnatal odorant exposure: anatomical, molecular and physiological consequences. The 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, July 2012. **Affiche**

...use olfactory sensory neurons' plasticity induced by postnatal odorant expo... anatomical, molecular and physiological consequences.

Imad Aoudé[1], Hervé Cadiou[1,2], Claire Fenech[1], Xavier Grosmaitre[1]

1.Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 6265 CNRS-Université de Bourgogne-UMR1324 INRA, 9E Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon
2. Nociception and Pain Department, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), CNRS UPR3212, 5 Rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg, France.

retory glands and
tly involved in the
signal that can be

ey dissolve in the
ized in the cilia of
vates an olfactory
clase III-synthesis
on channels open
lium and calcium,
-activated chloride
n which fire action
rough the axon to
of the particular
ace between the

-mediated transduction
or neurone. Elements of
le in the cilia membrane:
AC, adenylyl cyclase;
ivated Ca2+ conductance.
focused on receptor, AC

ey are constantly
factory epithelium

odulate olfactory-
nolecules. If these
le work has been

ws the monitoring
el analysis method
all number of GFP
GFP-labeled mice
c knob of OSNs in
these anatomical,
effects of odorant

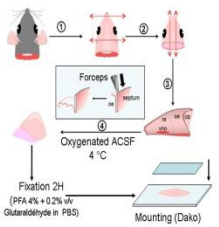
ons

neurons in control
e line where GFP
for the MOR23
nd of the MOR23

Post natal exposure
(POST). Mice were
exposed to lyral (20
µL of pure odour on
a cotton pad
enclosed in a steel
ball tea infuser).

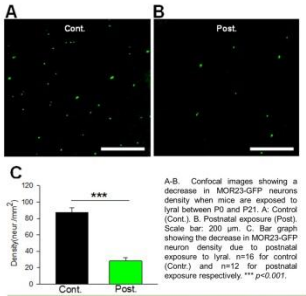
I- Anatomical consequences

Diagram showing our flat-mount procedure to assess the density of GFP-labelled neurones.



Mouse were anesthetised using ketamine and decapitated (1) . The nasal septum was dissected out (2) and (3) . The olfactory epithelium was then removed, washed in oxygenated ACSF 4 and fixed in PFA. Fluorescent GFP-containing neurones within flat-mounted epithelia were visualised using an Olympus BX51WI microscope coupled to a XM10 camera (Olympus).

Density analysis of GFP-labeled OSNs

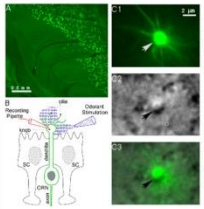


A-B. Confocal images showing a decrease in MOR23-GFP neurons density when mice are exposed to lyral between P0 and P21. A: Control (Cont.). B. Postnatal exposure (Post). Scale bar: 200 µm. C. Bar graph showing the decrease in MOR23-GFP neuron density due to postnatal exposure to lyral. n=16 for control (Contr.) and n=12 for postnatal exposure respectively. *** $p<0.001$.

Postnatal exposure to Lyrals reduces the density of MOR23-GFP olfactory neurons

III- Physiological cor...

Patch-clamp procedure on GFP-labelled OSNs.

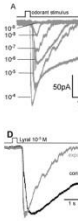


A. Fluorescent image of the turbinates of a MOR23-GFP mouse; B. diagram showing the patch-clamp procedure on OSNs in the intact epithelium preparation; C high magnification image of the intact preparation with C1 fluorescent light, C2 same field in transmitted light and C3 superimposed images C1 and C2 showing the knob of a fluorescent OSN.

Intact epithelium preparation was obtained from the nasal septum dissected out and kept in oxygenated Ringer.

Perforated patch recordings using nystatin: GFP tagged cells were visualized through super-imposition of the fluorescent and bright-field images allowing identification of the MOR23 cells. Holding potentials ranged from -60 to -70 mV. Data were acquired with an EPC10 amplifier using Pulse software (HEKA). A multi-barrel pipette filled with Lyral solutions was placed near the recording site and stimulations were delivered by pressure ejection through a picospritzer.

Solutions: Ringer: NaCl 124, KCl 3, $MgSO_4$ 1.3, $CaCl_2$ 2, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 1.25, glucose 15; pH 7.6. Intra-recording pipette: KCl 70, KOH 53, methanesulfonic acid 30, EGTA 5.0, HEPES 10, glucose 70; pH 7.2.



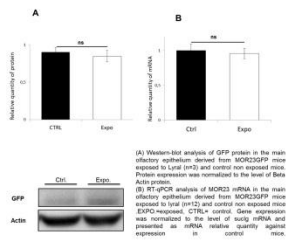
(A-C) Stimulations with ... control cells. (A) A MOR... GFP control cell respon... (n=12) and exposed ce... dynamic range (Hill coef...

(D-E) postnatal exposur... cells. Inward currents w... Postnatal exposure ind... p<0.05) but does not aff... control cells and n=10 fo...

Postnatal e...

II- Molecular consequences

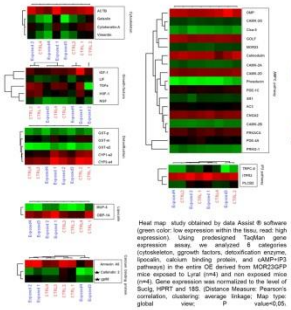
mRNA + protein analysis on the entire olfactory epithelium.



(A) Western-blot analysis of GFP protein in the main olfactory epithelium derived from MOR23GFP mice exposed to Lyral (n=2) and control non exposed mice. Protein expression was normalized to the level of Beta Actin protein.
(B) RT-qPCR analysis of MOR23 mRNA in the main olfactory epithelium derived from MOR23GFP mice exposed to lyral (n=12) and control non exposed mice (EXPO.=exposed, CTRL= control. Gene expression was normalized to the level of sucg mRNA and presented as mRNA relative quantity against expression in control mice.

Postnatal exposure to Lyral does not affect the protein and mRNA of MOR23.

Transcriptomic analysis on the entire olfactory epithelium.



Heat map study obtained by data Assist ® software (green color: low expression within the tissu, read: high expression). Using predesigned TaqMan gene expression assay, we analyzed 8 categories (cytoskeleton, zgrowth factors, detoxification enzyme, ßpocalin, calcium binding protein, and cAMP-IP3 pathways) in the entire OE derived from MOR23GFP mice exposed to Lyral (n=4) and non exposed mice (n=4). Gene expression was normalized to the level of Sucg, HPRT and 18S. (Distance Measure: Pearson's correlation, clustering: average linkage, filter type: global view; P value=0,05.

Postnatal exposure to Lyral does not mainly affect the transcriptomic level of the MOE.

Method for collecting MOR23GFP cells

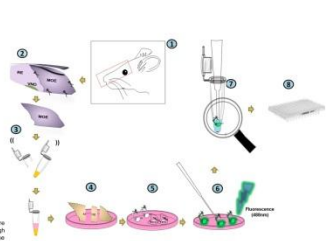


Fig.: Photographic images shows the system to collect an olfactory neurone. After removing the entire septal epithelium (ER+DE), we dissect out the olfactory epithelium (①+②), and we incubated it in PAPAIN ③ for enzymatic dissociation at 37°C for 10 min with shaking.The cells are incubated at RT for 20 min on poly ethylen imine for ④neurons adhesion after mechanical dissociation ⑤. The single GFP cells are collected ⑥ with a glass micropipette under an upright microscope equipped with with micromanipulator and fluorescence. After collecting a single GFP cell, the pipette is detached from the holder, and the tip is broken ⑦into a PCR tube containing a lysis buffer (protecting RNA from RNAse). Then, we can perform ⑧real time PCR.

mRNA

A- We can discriminate betwe... When we perform perforated ... +120 mV (neurons have inta... inward current. G- We harves... AC3 and PDE1C in MOR23 ... exposed mice. Gene expres... expression in control mice

Postnatal expo... MOR23 (X3),...

7. Conclusion

GFP neurons in an intact epithelium. We also developed a technique to perform quantitative analysis of mRNA expression in functional individual GFP-labeled neurons.
of MOR23-GFP neurons. This reduction is compensated by an up regulation of MOR23, CNGA2 and ACIII mRNA expression in single MOR23-GFP neurons.
erties of MOR23 OSNs in response to Lyral stimulation: exposed neurons are more sensitive and exhibit modified dose-response curves while the kinetics are also changed with faster and shorter responses.
ndices plasticity at the cellular level in specific populations of neurons; ii) compensation of morphological effects can be observed for the couple odorant/receptor MOR23/Lyral; iii) the olfactory epithelium may recover from this early olfactory