



Conséquences d'un régime diabétogène enrichi en fructose sur la muqueuse olfactive : aspects anatomiques, fonctionnels et comportementaux

Sébastien Riviere

► To cite this version:

Sébastien Riviere. Conséquences d'un régime diabétogène enrichi en fructose sur la muqueuse olfactive : aspects anatomiques, fonctionnels et comportementaux. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bourgogne, 2015. Français. ⟨NNT : 2015DIJOS052⟩. ⟨tel-01282794v2⟩

HAL Id: tel-01282794

<https://theses.hal.science/tel-01282794v2>

Submitted on 4 Mar 2016

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.



HAL Authorization

Université de Bourgogne

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

UMR 6265 CNRS – UBFC – UMR 1324 INRA

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la Vie

Par :

Sébastien Riviere

Date de soutenance : 4 décembre 2015

Conséquences d'un régime diabétogène enrichi en fructose sur la muqueuse olfactive : aspects anatomiques, fonctionnels et comportementaux.

Directeur de thèse :

Dr. Xavier Grosmaître

Composition du jury :

Pr. Corinne Leloup-Amiot	Professeure des universités	Présidente
Dr. Marie-Christine Lacroix	Chargée de recherche	Rapporteuse
Dr. Hirac Gurden	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr. Cécile Viollet	Directrice de recherche	Examinatrice
Dr. Luc Pénicaud	Directeur de recherche	Examineur



Université de Bourgogne

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

UMR 6265 CNRS – UBFC – UMR 1324 INRA



ÉCOLE DOCTORALE
PRES I Bourgogne I Franche-Comté
Environnements - Santé



THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la Vie

Par :

Sébastien Riviere



INRA
SCIENCE & IMPACT



Date de soutenance : 4 décembre 2015

Conséquences d'un régime diabétogène enrichi en fructose sur la muqueuse olfactive : aspects anatomiques, fonctionnels et comportementaux.

Directeur de thèse :

Dr. Xavier Grosmaître

Composition du jury :

Pr. Corinne Leloup-Amiot
Dr. Marie-Christine Lacroix
Dr. Hirac Gurden
Dr. Cécile Viollet
Dr. Luc Pénicaud

Professeure des universités
Chargée de recherche
Directeur de recherche
Directrice de recherche
Directeur de recherche

Présidente
Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examineur

**« Nos terreurs et les ténèbres de notre esprit
Doivent donc être dissipés, non par les rayons du soleil,
Par les traits lumineux du jour,
Mais par la compréhension de la nature, née de son étude systématique. »**

Lucrèce, *De rerum natura*

Remerciements

Les remerciements sont sûrement la partie la plus lue d'une thèse. Vous êtes nombreux à attendre (oserais-je dire à espérer) voir votre nom figurer ici (et soyons honnêtes, c'est la seule raison qui vous pousse à lire ces quelques lignes^^). Les noms sont indiqués en gras afin de vous aider à localiser plus rapidement les quelques mots vous concernant. Je vais donc essayer de n'oublier personne.

*Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, à commencer par mon directeur de thèse, **Xavier Grosmaître**. Avant de commencer cette thèse, on m'avait dit le plus grand bien de toi et j'ai vraiment pensé que tous ces gens étaient de vils flatteurs. Je suis ravi de m'être trompé. Merci à toi pour, à la fois, m'avoir accordé une grande liberté et avoir été présent lorsque j'en avais besoin (en particulier ces derniers mois). Ce travail de thèse n'aurait pu voir le jour sans ton aide précieuse. Merci à **Eva** et toi pour m'avoir offert un toit pendant les derniers mois de ma thèse et j'espère de tout cœur que ces prochains mois au Japon vont être enrichissants pour toute la famille.*

*Je remercie également **Luc Pénicaud** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci aussi pour le temps qu'il a toujours su m'accorder afin d'éclairer de sa lanterne mes nombreux tâtonnements au cours de cette thèse. Je reste ébahi devant ses connaissances sans fin et ses questions toujours pertinentes, quel que soit le sujet (même si je risque d'en faire les frais lors de la soutenance^^).*

*Un grand merci à **Marie-Christine Lacroix** pour avoir accepté d'être rapportrice de ce travail de thèse. C'est avec toi que j'ai débuté dans le monde de la recherche voilà 6 ans déjà et ta présence dans le jury représente beaucoup à mes yeux. Merci pour toutes les conversations que nous avons eues à propos de cette thèse et pour les conseils que tu n'as jamais manqué de me donner.*

*Merci aussi à **Hirac Gurden** pour avoir accepté de prendre le temps d'être rapporteur de ce travail de thèse.*

*Enfin je remercie **Corinne Leloup-Amiot** et **Cécile Viollet** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.*

*Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'équipe « plasticité fonctionnelle des neurones olfactifs », à commencer par **Vanessa Soubeyre**. Merci pour le temps incroyable et tous les efforts que tu as fournis sur le versant BM de ce projet. Toute cette partie est avant tout ton travail et n'aurait pas vu le jour sans ton implication sans faille. Merci également pour tous les coups de main que tu n'as cessé de me donner pendant cette thèse, et toujours avec le sourire en plus. Grâce à toi les journées « dissection » ont été bien plus agréables que je n'aurais jamais pensé^^.*

Merci aussi à **David Jarriault** pour le temps qu'il a passé à mettre au point les logiciels de comportement, pour avoir fait la « manip cils » et pour son aide dans la relecture de l'article. De façon générale, merci beaucoup pour toutes les conversations fructueuses que nous avons eues pendant cette thèse.

Merci beaucoup à **Jean Gascuel** pour avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse et pour tous les conseils qu'il m'a prodigués au cours de la réalisation de cette thèse.

Je remercie aussi **Frédérique Datiche** et **Anne-Marie Le Bon** pour les discussions sympathiques pendant ces trois ans. Merci aussi à **Sylvie Chaudy** pour ses conseils et pour avoir toujours pris le temps de traiter mes commandes, même lorsque je faisais ça au dernier moment. Enfin je remercie ma stagiaire **Elise Léger-Charnay** pour le travail impeccable qu'elle a réalisé pendant son stage. Bonne chance pour la suite.

Je remercie aussi tous les membres du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation. En particulier, merci à **Xavier Fioramonti** pour ses conseils et pour son aide pour les manips de physio. Merci à **Claire Fenech** pour ses conseils avisés en matière de BM. Merci à **Sylvie Grall** pour sa bonne humeur et pour ses mails communs, toujours un plaisir à lire^^. Je remercie également **Cédric Serrano**, sans qui le labo ne survivrait pas et **Michel Tavan** pour m'avoir construit l'arène de comportement et s'être retenu de piquer dans mon assiette le midi^^.

Merci aussi à toute l'équipe administrative, en particulier **Christine Chabert**, **Daniella Genet**, **Fabienne Peltret**, **Véronique Bué** et **Sabine Duchesne**. Merci les filles pour votre travail impeccable et pour tous les bons moments qu'on a passés.

Enfin je tiens à remercier tout particulièrement **Anne Lefranc** pour avoir pris soin de mes souris pendant ces trois années. Merci beaucoup pour ton aide et ton travail incroyable (et pourtant je t'en ai donné du boulot...). Merci aussi pour toutes les discussions qu'on a pu avoir dans l'animalerie.

Venons-en maintenant à mes camarades galériens, doctorants, post-docs ou stagiaires. Je remercie donc **Camille Allard**, **Chloé Chrétien**, **Stéphanie Goyon**, **Romain Paccoud** et **Vincent Canova** pour les bons moments passés ensemble. Un merci particulier à **Nicolas Dollion**, qui a été mon référent en stats ainsi qu'une oreille attentive durant trois ans.

Je remercie aussi **Aurore Quinault** (oui je te range avec les post-docs^^) pour tous tes conseils (le privilège de l'âge^^), les parties de rigolade et ton soutien (surtout pendant la rédaction de ce manuscrit).

Merci à **Adrien Molinas** pour l'aide apportée pour le comptage de neurones (surtout que c'était pas la partie la plus sympa de la thèse), mais surtout pour tous les bons moments et les innombrables soirées. Ton humour à côté de la plaque me manquera beaucoup.

Merci aussi à **Danaé Nuzzaci**, camarade de headbang et de discussion à la con. Ton arrivée dans le bureau m'a beaucoup aidé pendant cette dernière année de thèse, sûrement parce qu'on se ressemble beaucoup (pas physiquement, heureusement pour toi^^). Courage pour la suite, le plus dur est à venir^^.

Enfin, last but not least, un immense merci à **Lucie Desmoulins**, voisine de bureau puis voisine tout court. Merci pour ton aide avec la bioch, pour toutes les discussions sérieuses et moins sérieuses qu'on a eues et pour ton soutien indéfectible pendant ces trois ans. Clairement cette thèse n'aurait pas été la même sans ta présence au quotidien. Tu as vraiment partagé aussi bien les réussites que les galères (plus un petit verre de temps à autre^^) et a su me motiver lorsque je perdais espoir. J'espère avoir été, au moins, à moitié aussi utile pour toi en tant que compagnon de galère.

Et bien, maintenant que j'ai remercié tout le labo, passons aux autres personnes qui ont permis que cette thèse voie le jour.

Tout d'abord, un très grand merci à **Nicolas Meunier** pour avoir réalisé toutes les manip d'EOG et accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour le temps que tu toujours pris afin d'améliorer la qualité de ce travail, que ce soit pour l'article, les posters et tous les abstracts. Merci aussi pour la qualité de tes cours pendant ma licence, c'est ce qui m'a donné envie de me diriger vers la recherche en premier lieu.

Je remercie aussi tous les gens de Jouy, en particulier **Denise Grebert** pour son aide et **Christine Baly** pour les discussions plaisantes et utiles que nous avons eues (notamment à l'ECRO 2014).

Je remercie aussi **Jean-François Merlin** pour m'avoir permis de réaliser l'écho-mri.

A l'école doctorale, je remercie **Josette Thery** et **Corinne Aquilina** pour leur disponibilité et leur aide dès que j'avais une question.

Je remercie également tous les membres de l'expérimentarium, notamment **Coralie Biguzzi** et **Lionel Maillot**. Ce fût vraiment une super expérience. Je tiens à remercier tout particulièrement **Elise Cellier Holzem** pour sa bonne humeur communicative et pour avoir transformé cette expérience en un festival de fous rires en tout genre^^.

Je remercie aussi l'INRA et le Conseil Régional de Bourgogne pour avoir financé cette thèse.

Je tenais aussi à remercier **Dominique Martel** de la société Safe pour avoir (tardivement il est vrai) appris un faire un devis correct pendant ma troisième année de thèse, ce qui m'a fait économiser un temps précieux^^.

Merci à ma famille, en particulier mes **parents**, mes **grands-parents**, **Céline**, **Dominique** et **Nathalie**, pour le soutien que vous m'avez apporté malgré la distance et pour avoir supporté

de m'écouter discourir sans fin de ma thèse (même si vous deviez pas forcément y comprendre grand-chose^^).

*Merci à mes amis, en particulier **Aude, Lucie, Mathilde** et **Didier** pour votre soutien. On ne s'est pas assez vus depuis trois ans mais on va essayer de remédier à ça très prochainement.*

Je remercie tous les membres du forum Bienvenue à Minas Tirith pour m'avoir redonné envie d'écrire et pour m'avoir offert une vraie bouffée d'oxygène quand j'en avais le plus besoin. Vous n'êtes pas près de vous débarrasser de moi^^.

Je tiens à remercier les souris qui ont participé (doux euphémisme) à cette étude. Merci de ne pas m'avoir mordu une seule fois en trois ans, je vous ai pourtant donné des raisons de le faire...

Enfin, je souhaite remercier mon PC pour m'avoir appris la patience et m'avoir enseigné l'enregistrement compulsif de mes documents. Malgré les bugs et une lenteur d'escargot, tu as été le principal compagnon de cette période de rédaction. Je tiens à préciser qu'aucun ordinateur n'a été maltraité durant cette thèse (même si c'est pas l'envie qui m'en a manquée...).

Vous êtes parvenu au bout de ces remerciements ? Soit vous vous ennuyez ferme, soit vous espériez voir votre nom et ce n'est pas le cas. Qu'à cela ne tienne, cher anonyme, j'ai pensé à tout. Je vous invite donc à compléter la dernière ligne de ces remerciements.

Enfin je tenais à remercier de tout cœur pour son soutien indéfectible. Ce travail n'aurait pas été possible sans lui, elle, eux (rayez la mention inutile).

Merci à tous...

Résumé

L'influence de l'état métabolique sur l'olfaction a été particulièrement étudiée ces dernières années. Le statut nutritionnel et les hormones impliquées dans la prise alimentaire sont capables de moduler le système olfactif, du neurone individuel jusqu'au comportement. Il semble donc logique que les pathologies liées à l'alimentation puissent induire des dysfonctionnements olfactifs. De fait, les patients atteints de diabète de type 2 (DT2) présentent des capacités olfactives réduites bien que les effets du DT2 en lui-même soient toujours inconnus.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'olfaction chez des souris rendues diabétiques après consommation d'un régime enrichi en fructose (HFruD). Les animaux présentent un DT2 précoce après 8 semaines de régime. De plus, ils montrent une baisse de leurs capacités olfactives globales. Les réponses électrophysiologiques aux odorants de la muqueuse olfactive et des neurones sensoriels olfactifs (OSN) sont diminuées après 8 semaines de HFruD. Une augmentation du nombre d'OSN ainsi qu'une diminution de l'apoptose ont lieu dans la muqueuse olfactive, indiquant que le HFruD induit un changement de la dynamique cellulaire dans ce tissu.

Nos résultats démontrent que, chez le rongeur, l'olfaction est modulée par un régime diabéto-gène enrichi en fructose. Des changements fonctionnels, anatomiques et comportementaux surviennent au sein du système olfactif à un stage précoce de la pathologie, indiquant que le DT2 en lui-même est suffisant pour perturber l'olfaction. Les changements métaboliques ayant lieu durant la mise en place du DT2 pourraient être à l'origine des dysfonctionnements olfactifs.

Mots-clés : Olfaction, Diabète de type 2, Physiologie, Comportement animal

Abstract

The influence of metabolic status on olfactory processes has been thoroughly investigated over the last few years. Both nutritional status and hormones implicated in food metabolism can effectively modulate the olfactory system from the single neuron to the behavior. Thus, it seems likely that metabolic disorders such as type 2 diabetes (T2D) can induce olfactory dysfunctions. In fact T2D patients display poor olfactory performances however the effects of diabetes in itself (as well as underlying mechanisms) are still unknown.

In this study, we investigated the modulation of olfaction in young adult male mice caused by a high-fructose diet (HFruD) inducing T2D in rodents. Animals displayed early diabetic state after only 4 weeks of HFruD. In addition, animals exhibited a decrease in olfactory capacities for both neutral and food odors. These behavioral effects persisted and were amplified after 8 weeks of HFruD. Electrophysiological responses to odorants of both olfactory mucosa and olfactory sensory neurons were reduced in HFruD animals after 8 weeks of diet. Immunohistochemistry experiments then revealed an increase in the number of olfactory sensory neurons and a reduction of apoptosis in the OM indicating that HFruD modifies cell dynamics.

Our results demonstrate that, in rodents, olfaction is modified by HFruD-induced diabetes. Functional, anatomical and behavioral changes occurred in the olfactory system even at a very early stage of the disease, indicating that T2D in itself can disrupt olfaction. Metabolic changes taking place during the onset of T2D may trigger olfactory dysfunctions.

Key-words: Olfaction, Type 2 Diabetes, Physiology, Animal behavior

Table des matières

Introduction-Données bibliographiques.....	1
Avant-propos	2
Chapitre 1 : Le système olfactif des mammifères	4
I. Organisation et fonctionnement de la muqueuse olfactive	5
a. Anatomie de la muqueuse olfactive.....	5
Le mucus	5
Les neurones sensoriels olfactifs (OSN).....	5
Les cellules de soutiens	7
Les cellules basales	8
Les cellules à microvillosités	8
b. Développement et régénération de l'EO	9
Développement de l'EO.....	9
Régénération de l'EO	9
c. Transduction et terminaison du signal olfactif.....	10
Transduction du signal olfactif	10
Terminaison du signal olfactif.....	13
II. Les connexions épithélio-bulbaires	14
III. Organisation et fonctionnement du bulbe olfactif	15
a. Anatomie du bulbe olfactif.....	15
b. Fonctionnement du bulbe olfactif.....	16
IV. Structures supérieures et olfaction	19
Chapitre 2 : Les relations entre le système olfactif et le système de régulation de l'énergie homéostasique.....	21
I. L'olfaction agit sur la prise alimentaire	21
II. L'état nutritionnel agit sur le système olfactif.....	22
a. Rôle de l'état nutritionnel	22
b. Rôle des hormones et peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire	24
Molécules orexigènes	25
Molécules anorexigènes	27
Autres facteurs métaboliques	29
c. Rôle des pathologies liées à l'alimentation	29
Chapitre 3 : Le fructose et ses implications dans le développement des maladies métaboliques	31
I. Le diabète	31
a. Définitions et symptômes	31
b. Mécanismes de la mise en place du DT2.....	31
c. Complications dues au diabète	34
d. Modèles animaux pour l'étude du DT2	35
II. Le fructose	36
a. Les sources de fructose	36
b. Evolution de la consommation du fructose	37
c. Devenir du fructose après ingestion : métabolisme intestinal	38
d. Devenir du fructose après absorption : métabolisme hépatique	39
e. Utilisation du fructose par d'autres organes.....	42

III. Le fructose et le diabète	42
a. Implication du fructose dans le diabète et les pathologies liées	42
b. Mécanismes de la mise en place des maladies métaboliques après consommation de fructose à long terme.....	44
c. Cas particulier des HFruD chez la souris C57Bl/6.....	45
Chapitre 4 : Problématique de l'étude : Diabète de type 2 et olfaction	51
Résultats expérimentaux	55
Chapitre 1 : Validation du modèle d'induction du diabète de type 2 par l'utilisation d'un régime enrichi en fructose.....	56
I. Caractéristiques des régimes et des animaux.	56
a. Régimes alimentaires utilisés	56
b. Animaux utilisés et mise sous régime	57
c. Protocole général	58
II. Effets du HFruD sur le métabolisme général des souris	60
Poids et prise alimentaire	60
Néophobie alimentaire ?	61
Palatabilité du HFruD.....	63
Prise hydrique	64
III. Mise en place d'un diabète de type 2 à l'aide du HFruD.....	66
Glycémie et insulinémie	67
Intolérance au glucose.....	68
Résistance à l'insuline.....	69
Répartition de la masse grasse et léptinémie.....	70
IV. Conclusions du chapitre	72
Chapitre 2 : Le diabète de type 2 induit une baisse des capacités olfactives chez la souris.....	74
I. Test de détection olfactive	76
Principe et protocole	76
Résultats	78
II. Test d'habituation / déshabituation (discrimination olfactive)	80
Principe	80
Protocole	82
Détermination des critères pour l'analyse des données	83
Résultats	86
Contre balancement	88
III. Test de la nourriture enfouie ou buried food test.....	90
Principe	90
Protocole	91
Critères retenus pour l'analyse des données	93
Résultats	94
IV. Test de l'open field	96
V. Conclusions du chapitre	99
Chapitre 3 : Le diabète de type 2 induit des changements anatomiques et fonctionnels au sein de la muqueuse olfactive.....	101
I. Etude fonctionnelle de la muqueuse olfactive	101
Principe et protocole	101
Critères d'analyse	103
Résultats	104

II.	Etude anatomique de la muqueuse olfactive	108
	Protocole	108
a.	Etude du taux d'apoptose	109
b.	Etude du taux de prolifération cellulaire.....	111
c.	Etude de la population neuronale.....	112
	Marquage OMP	112
	Comptage des neurones MOR23.....	114
III.	Etude fonctionnelle au niveau du neurone individuel (patch clamp)	116
	Protocole	116
	Résultats : réponses à une stimulation odorante.....	118
	Résultats : capacités de transduction	120
	Résultats : activité spontanée.....	121
	Résultats : excitabilité.....	121
IV.	Anatomie des cils olfactifs et connexions épithélio-bulbaires	123
a.	Anatomie des cils olfactifs.....	123
b.	Connexions épithélio-bulbaires.....	124
	Protocole	124
	Résultats	125
V.	Etude d'un possible mécanisme	127
a.	Etude des transcrits du récepteur à l'insuline dans la MO.....	127
	Extraction d'ARN et transcription inverse	127
	Détermination du gène de référence	128
	Design et tests des amorces	128
	Résultats	130
b.	Expression protéique du récepteur à l'insuline dans la MO	130
c.	Expression d'un marqueur d'inflammation : iba1	132
VI.	Discussion et conclusions du chapitre	132
a.	Implication de l'insuline ?.....	133
	Effets sur l'apoptose	134
	Effets fonctionnels.....	135
	Possibles mécanismes ?.....	136
b.	Autre mécanismes.....	140
	Effets de l'hyperglycémie	140
	Autres hormones ou peptides impliqués dans le métabolisme	141
	Rôle de l'inflammation	141

Conclusions et perspectives.....143

Références bibliographiques 147

Liste des abréviations

ACIII : Adénylyl cyclase III
ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : Acides gras
AMPC : Adénosine mono-phosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BCL : B-cell lymphoma
BO : Bulbe olfactif
CaCC : Canal chlore activé par le calcium (Calcium-activated chloride channel)
CaM Kinase : Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase
CB : récepteur aux endocannabinoïdes
CD11c : Cluster de différenciation 11c
CNG : Cyclic nucleotide-gated channel
COA : Aversion olfactive conditionnée (conditioned olfactory aversion)
Ctrl : Contrôle
DAG : Diacylglycérol
DHP : Dihydroxyacétone phosphate
DRG : Ganglion spinal (dorsal root ganglion)
DT2 : Diabète de type 2
EGF : Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
EO : Epithélium olfactif
EOG : électroolfactogramme
FGF2 : Facteur de croissance des fibroblastes 2 (fibroblast growth factor 2)
G3P : Glycérol 3 phosphate
GBC : Cellule globulaire basale (Globular basal cell)
GC-D : Guanylyl cyclase D
GLUT : transporteur du glucose
GMPc : Guanosine mono-phosphate cyclique
GRK3 : G protein receptor kinase 3
HBC : Cellule basale horizontale (Horizontal basal cell)
HFCS : Sirop de maïs enrichi en fructose (High-fructose corn syrup)
HFruD : régime enrichi en fructose (High-fructose diet)
Iba1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1
icv : intracérébroventriculaire
IL-6 : Interleukine 6
IND : Instillation intranasale d'insuline (Intranasal insulin delivery)
ip : intrapéritoneal
IP3 : Inositol triphosphate
ipGTT : test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale
IR : récepteur à l'insuline
IRS : Substrat du récepteur à l'insuline (insulin receptor substrate)
ITT : test de tolérance à l'insuline
KO : Knock-out
MAP : Mitogen activated protein
Mdm2 : Mouse double minute 2 homolog
MetS : Syndrome métabolique
MMP : Métallo-protéinase matricielle

MO : Muqueuse olfactive
NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique (non alcoholic fatty liver disease)
NPY : Neuropeptide Y
OBP : Odorant binding protein
OGTT : test de tolérance au glucose par voie orale
OMP : Olfactory mature protein
OMS : Organisation mondiale de la santé
OR : Récepteur olfactif (Olfactory receptor)
OSN : Neurone sensoriel olfactif (Olfactory sensory neuron)
OVN : Organe voméro-nasal
OXA : Orexine A
OXB : Orexine B
OXR : récepteur aux orexines
PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
PCR : Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PDE : Phosphodiesterase
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
PLC : Phospholipase C
PNSS : Programme national nutrition santé
qPCR : PCR quantitative
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
RT : Transcription inverse (reverse transcription)
SUS : Cellules de soutien (Sustaining cells)
TAAR : Trace amino-acid receptor
TG : Triglycérides
TGF α : Facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
TNF : Facteur de nécrose tumorale (tumoral necrosis factor)

Liste des tableaux

Table 1 : L'utilisation d'un régime riche en fructose induit des changements métaboliques chez la C57Bl/6. __	48
Table 2 : Composition des régimes contrôle et enrichi en fructose. _____	56
Table 3 : Composition énergétiques des régimes Ctrl et HFruD. _____	57
Table 4 : Anticorps utilisés pour le protocole d'immunohistochimie _____	109
Table 5 : Résultats pour la sélection du gène de référence _____	128
Table 6 : Design des amorces pour la RTqPCR _____	129

Liste des Figures

Figure 1 : Le système olfactif de la souris.	4
Figure 2 : Localisation et anatomie de la muqueuse olfactive.	6
Figure 3 : Le neurone sensoriel olfactif.	7
Figure 4 : Les OSNs sont repérables grâce à l'expression de la protéine OMP.	8
Figure 5 : Schéma possible de la neurogenèse au sein de l'EO.	10
Figure 6 : Transduction du signal olfactif par la voie de l'AMPC.	11
Figure 7 : Schéma présentant le rôle du calcium dans la transduction du signal olfactif.	14
Figure 8 : Organisation zonale de l'EO et connexions épithélio-bulbaires.	15
Figure 9 : Organisation en couches du bulbe olfactif.	17
Figure 10 : Organisation fonctionnelle du bulbe olfactif.	18
Figure 11 : Diversité des types cellulaires de la couche plexiforme externe du bulbe olfactif.	19
Figure 12 : Localisation des récepteurs aux hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique au sein de la muqueuse olfactive.	24
Figure 13 : Sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques chez les patients DT2.	32
Figure 14 : Les dysfonctions mitochondriales dans la mise en place du DT2.	33
Figure 15 : Rôle des ROS dans la mise en place du DT2.	34
Figure 16 : Schéma général de la possible mise en place du DT2.	35
Figure 17 : Schéma d'une molécule de fructose libre ou liée au glucose sous forme de sucrose.	36
Figure 18 : Absorption intestinale du fructose et devenir du fructose après métabolisation par le foie.	39
Figure 19 : Métabolisme hépatique du glucose et du fructose.	40
Figure 20 : Protocole général présentant les différents lots d'animaux utilisés pendant l'étude.	59
Figure 21 : Evolution du poids et de la prise alimentaire des animaux sous HFruD.	60
Figure 22 : Evolution du poids et la prise alimentaire après mise sous régime progressive.	63
Figure 23 : Mesure de la palatabilité du régime enrichi en fructose.	64
Figure 24 : Evolution de la prise hydrique des animaux sous HFruD.	65
Figure 25 : Les souris HFruD présentent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun	67
Figure 26 : Intolérance au glucose chez les animaux HFruD après 4 à 8 semaines de régime.	68
Figure 27 : Les animaux HFruD ne développent pas de résistance à l'insuline après 4 à 8 semaines de régime.	70
Figure 28 : Mesures de la masse grasse et de la masse maigre des animaux	71
Figure 29 : Le HFruD n'induit pas de changement de la leptinémie après 4 et 8 semaines de régime.	72
Figure 30 : Résultats attendus pour le test de détection.	77
Figure 31 : Exemple d'images obtenues avec le logiciel de suivi des animaux mis en place dans l'équipe.	78
Figure 32 : Résultats obtenus pour le test de détection.	79
Figure 33 : Résultats attendus pour le test d'habituation / déshabitude.	81
Figure 34 : Structures chimiques des odorants utilisés pour le test d'habituation / déshabitude.	82
Figure 35 : Détermination du seuil de visite pour le test d'habituation / déshabitude.	84
Figure 36 : Résultats du test d'habituation / déshabitude après un régime enrichi en fructose.	87
Figure 37 : Résultats du test de « contre balancement ».	89
Figure 38 : Illustration du dispositif expérimental du buried food test.	93
Figure 39 : Essais pour le test du buried food.	94
Figure 40 : Résultats du test du buried food.	95
Figure 41 : Résultat du test de motivation à chercher de la nourriture.	96
Figure 42 : Résultats du test de l'open field.	98
Figure 43 : Illustration du protocole d'EOG.	102
Figure 44 : Schéma illustrant les critères étudiés pour l'EOG.	103
Figure 45 : Réponses EOG après 4 semaines de régime.	104
Figure 46 : Cinétiques des réponses EOG après 4 semaines de régime.	105
Figure 47 : Réponses EOG après 8 semaines de régime.	106

Figure 48 : Cinétiques des réponses EOG après 8 semaines de régime. _____	107
Figure 49 : Expression de la caspase 3 clivée au sein de la muqueuse olfactive. _____	110
Figure 50 : Niveau d'apoptose mesuré dans la muqueuse olfactive par la méthode TUNEL. _____	111
Figure 51 : Expression de PCNA au sein de la muqueuse olfactive. _____	112
Figure 52 : Expression de l'OMP au sein de la muqueuse olfactive. _____	113
Figure 53 : Schéma de la dissection de l'épithélium olfactif septal. _____	114
Figure 54 : Mesure de la densité de neurones exprimant MOR23. _____	115
Figure 55 : Les neurones MOR23 répondent au lyral de manière dose-dépendante. _____	117
Figure 56 : Schéma illustrant les critères étudiés pour le patch clamp en mode voltage-clamp. _____	118
Figure 57 : La sensibilité de la réponse aux odorants des neurones MOR23 est réduite après 8 semaines de HFruD. _____	119
Figure 58 : Les cinétiques de réponses des neurones MOR23 au lyral sont modifiées après 8 semaines de HFruD. _____	120
Figure 59 : Activité spontanée des neurones MOR23 après 8 semaines de HFruD. _____	121
Figure 60 : L'excitabilité des neurones MOR23 est modifiée après 8 semaines de HFruD. _____	122
Figure 61 : 8 semaines de HFruD n'induisent pas de changement de l'anatomie des cils olfactifs. _____	124
Figure 62 : Surface des glomérules MOR23 après 8 semaines de régime. _____	126
Figure 63 : Surexpression du transcrit du gène codant pour le récepteur à l'insuline dans la MO après 8 semaines de HFruD. _____	130
Figure 64 : Surexpression du récepteur à l'insuline dans la muqueuse olfactive après un HFruD. _____	131
Figure 65 : Expression d'iba1 dans la muqueuse olfactive après 4 et 8 semaines de HFruD. A _____	132
Figure 66 : Schéma présentant les possibles voies de signalisation anti-apoptotique pouvant être activées par l'insuline. _____	135
Figure 67 : Schéma simplifié de l'implication possible de l'insuline dans les effets anatomiques et fonctionnels constatés après 8 semaines de HFruD chez la souris. _____	139

Introduction

-

Données bibliographiques

Avant-propos

« Nos yeux, nos oreilles, notre odorat, notre goût différent,
créent autant de vérités qu'il y a d'Hommes sur la Terre »

C'est sur cette citation de Guy de Maupassant que je souhaiterais commencer cet avant-propos. Elle met en exergue l'importance des sens qui n'est plus à démontrer pour les êtres humains, et de façon plus générale au sein du règne animal. Les organes des sens nous permettent d'appréhender le monde extérieur et d'interagir avec notre environnement. Ces modalités sensorielles sont nécessaires à la survie d'un individu et il n'est pas étonnant que la sélection naturelle ait favorisé et maintenu leur existence chez une écrasante majorité des espèces animales.

L'olfaction est la modalité sensorielle nous permettant de percevoir les odeurs. Ce sens est présent, à degrés divers si on parle d'animaux macrosmates (tels les rongeurs) ou microsmates (tel l'être humain), chez la quasi-totalité des espèces animales où il joue un rôle crucial : alimentation, interactions sociales, navigation spatiale, etc... Chez les mammifères, il est nécessaire pour chercher et trouver de la nourriture, se reproduire, interagir avec ses congénères ou encore renseigner sur de potentielles menaces pour l'organisme.

Dans ce travail de thèse, l'olfaction a été étudiée sous l'angle de son importance pour l'alimentation. Il est évident de voir en quoi l'olfaction a une importance capitale dans la recherche et la consommation de nourriture et ce point a été étudié dès l'antiquité et jusqu'à nos jours. Cependant, il est aussi vrai que l'alimentation, et de façon plus générale le statut nutritionnel d'un individu, peut moduler la perception que nous avons des odeurs. Si les premières observations de ce phénomène datent du début du 20^{ème} siècle, celui-ci a surtout été étudié au cours des 30 dernières années.

Les études sur les liens étroits qu'entretiennent les systèmes nutritionnels et olfactifs sont aujourd'hui nécessaires étant donné l'augmentation drastique des problèmes de santé dus aux pathologies liées à l'alimentation. Les maladies cardio-vasculaires sont désormais la principale cause de décès dans le monde (31% de la mortalité totale en 2012 selon l'OMS). Les principales causes des maladies cardio-vasculaires restent une mauvaise alimentation, la sédentarité, le tabagisme et la consommation d'alcool.

La prévalence de pathologies telles que l'obésité, le diabète ou encore l'hypertension ne cesse d'augmenter. Prévenir les risques liés à l'alimentation est devenu l'un des enjeux prioritaires au niveau européen. En France, le Programme National Nutrition Santé coordonne les actions relatives aux questions d'alimentation, notamment *via* l'information du grand public sur ce domaine. Par ailleurs, la santé et la sécurité alimentaire sont deux des défis sociétaux décrits dans la stratégie nationale de la recherche.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux liens entre l'olfaction et le diabète de type 2 (DT2). Cette pathologie, causée en majeure partie à cause d'une mauvaise alimentation, est en constante progression dans le monde, à tel point qu'on parle aujourd'hui « d'épidémie de diabète ». Il a été décrit que des patients diabétiques de type 2 éprouvent des difficultés à détecter, identifier, discriminer et reconnaître les odeurs. Cependant l'implication du DT2 en lui-même ainsi que les mécanismes sous-jacents restent à élucider.

Le but de ce travail de thèse a donc été d'étudier les relations entre le DT2 et l'olfaction (et particulièrement au niveau du système olfactif périphérique) en utilisant un modèle animal de DT2 induit par la consommation d'un régime enrichi en fructose (HFruD). Avant de présenter les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude, je présenterai brièvement des données issues de la littérature afin de mieux comprendre les aspects cités ci-dessus.

La section introductive de ce manuscrit est organisée en trois chapitres distincts. Premièrement, l'organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif sera présentée avec une emphase particulière sur le système olfactif périphérique, notre modèle d'étude. Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude des liens entre l'olfaction et la nutrition, en insistant, là aussi, sur les phénomènes se déroulant au niveau périphérique. Le troisième chapitre se focalisera sur le diabète de type 2, le fructose et les relations de cause à effet entre la surconsommation de fructose et le DT2. Enfin, je présenterai brièvement la problématique de cette étude et les questions auxquelles nous avons souhaité répondre durant ce travail de thèse.

Chapitre 1 : Le système olfactif des mammifères

Le système olfactif des mammifères permet la perception des odeurs présentes dans l'environnement. Ces informations odorantes sont tout particulièrement utiles dans les processus liés à l'alimentation ou aux interactions sociales (inter ou intra-espèces). On décrit classiquement le système olfactif comme étant composé de deux niveaux : un niveau périphérique, la muqueuse olfactive (MO) et un niveau central, le bulbe olfactif (BO). Le rôle principal de la MO est la chémoréception des molécules odorantes alors que le BO est responsable de l'analyse et du traitement du message olfactif (Figure 1).

Les molécules odorantes sont de taille et de structure variées. Le nombre de ces dernières pouvant être détectées par le système olfactif varie fortement d'une espèce animale à une autre, y compris au sein des mammifères. Une odeur peut être associée à une unique molécule odorante ou à un mélange de plusieurs odorants. Une étude récente suggère que le nombre d'odeurs pouvant être reconnues par le système olfactif humain serait quasi-illimité (Bushdid et al., 2014).

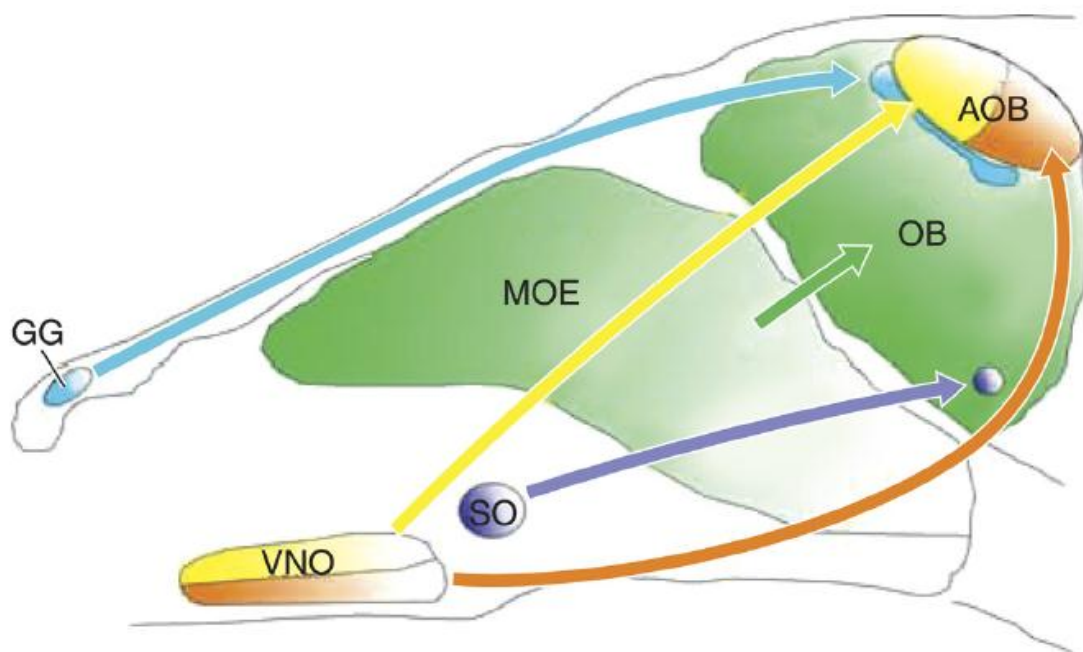


Figure 1 : Le système olfactif de la souris. Les neurones de chaque organe du système olfactif périphérique projettent à un endroit spécifique du bulbe olfactif. GG : Ganglion de Grueneberg ; VNO : Organe voméronasal ; SO : Organe septal ; MOE : Epithélium olfactif principal ; OB : Bulbe olfactif ; AOB : Bulbe olfactif accessoire. D'après (Tirindelli et al., 2009)

Classiquement, il a été décrit que le système olfactif des mammifères est divisé en deux sous-ensembles chez la plupart des espèces : un système principal et un système accessoire. Le système olfactif principal est composé en périphérie de l'épithélium olfactif principal et,

en central, du bulbe olfactif principal. Le système olfactif accessoire est composé, en périphérie, de l'organe voméro-nasal (OVN) et, en central, du bulbe olfactif accessoire.

Jusqu'à récemment il était admis que le système olfactif principal permettait de percevoir les odeurs générales et que le système olfactif accessoire était spécialisé dans la détection des phéromones (Meisami and Bhatnagar, 1998; Firestein, 2001). Cependant il a été prouvé que cette distinction n'était pas aussi évidente que cela, et qu'en fait, les deux systèmes pourraient s'occuper aussi bien de la détection des odeurs générales que des phéromones (Zufall and Leinders-Zufall, 2007; Martinez-Marcos, 2009). Pour la suite de ce manuscrit, je ne parlerai que du système olfactif principal.

I. Organisation et fonctionnement de la muqueuse olfactive

a. Anatomie de la muqueuse olfactive

La muqueuse olfactive est située en profondeur dans la cavité nasale. Elle est répartie au sein des deux fosses nasales, séparées par une cloison cartilagineuse, le *septum*. Avant de rencontrer la MO, les molécules odorantes doivent parcourir plusieurs épithélia dont le rôle est de filtrer, d'humidifier, de dépolluer et de réchauffer l'air inspiré. L'épithélium olfactif (EO) repose sur des excroissances cartilagineuses qu'on appelle les cornets. L'EO est un neuro-épithélium pseudo stratifié reposant sur une *lamina propria*. La MO est donc constituée de l'EO et de la *lamina propria*. L'EO est composé de plusieurs types cellulaires recouvert de mucus (Figure 2).

Le mucus

Le mucus est une couche d'environ 10 μm d'épaisseur. C'est une substance aqueuse et visqueuse composée de sodium, de potassium, de polysaccharides et de diverses protéines, dont les odorant binding proteins (ou OBP) qui aident les odorants (hydrophobes) à traverser le mucus pour atteindre les cils des neurones olfactifs (Löbel et al., 2001). Les OBP ont un rôle de protection face aux produits toxiques, permettent d'éviter la saturation des récepteurs olfactifs (Burchell, 1991) et pourraient servir de cofacteurs aux récepteurs olfactifs (Pelosi, 1994). Le mucus est sécrété par les glandes de Bowman, situées dans la sous-muqueuse, *via* des canaux sécrétoires traversant l'épithélium olfactif.

Les neurones sensoriels olfactifs (OSN)

Les OSNs sont des neurones bipolaires, responsables de la transduction et du codage olfactifs (Figure 3). Leur corps cellulaire sont situés dans la partie médiane de l'EO et représentent 75 à 80% de l'ensemble des cellules de l'EO. Les neurones olfactifs matures sont repérables grâce à l'expression de la protéine OMP (olfactory mature protein) (Farbman and Margolis, 1980) bien que le rôle exact de cette protéine reste toujours inconnu (Figure 4). Les OSNs projettent une unique dendrite vers la lumière de la cavité nasale. Cette

dendrite se termine par un renflement appelé le bouton dendritique, lequel est muni de cils olfactifs. C'est au niveau de ces cils qu'a lieu la fixation de l'odorant sur son récepteur puis la transduction du message olfactif, d'où la présence d'une importante concentration de récepteurs olfactifs (OR) et des éléments de la cascade de transduction (Firestein, 2001). Pour une description détaillée de l'anatomie fonctionnelle des cils olfactifs voir la revue de Dyke P. McEwen (McEwen et al., 2008). Les OSNs sont donc les seuls neurones du corps humain à être en contact direct avec l'environnement extérieur, ce qui les expose aux molécules odorantes mais également à toutes sortes d'agressions. Les phénomènes de développement et de régénération de l'EO seront abordés dans la partie **I.b** et les phénomènes de transduction du signal olfactif seront abordés dans la partie **I.c** de ce chapitre.

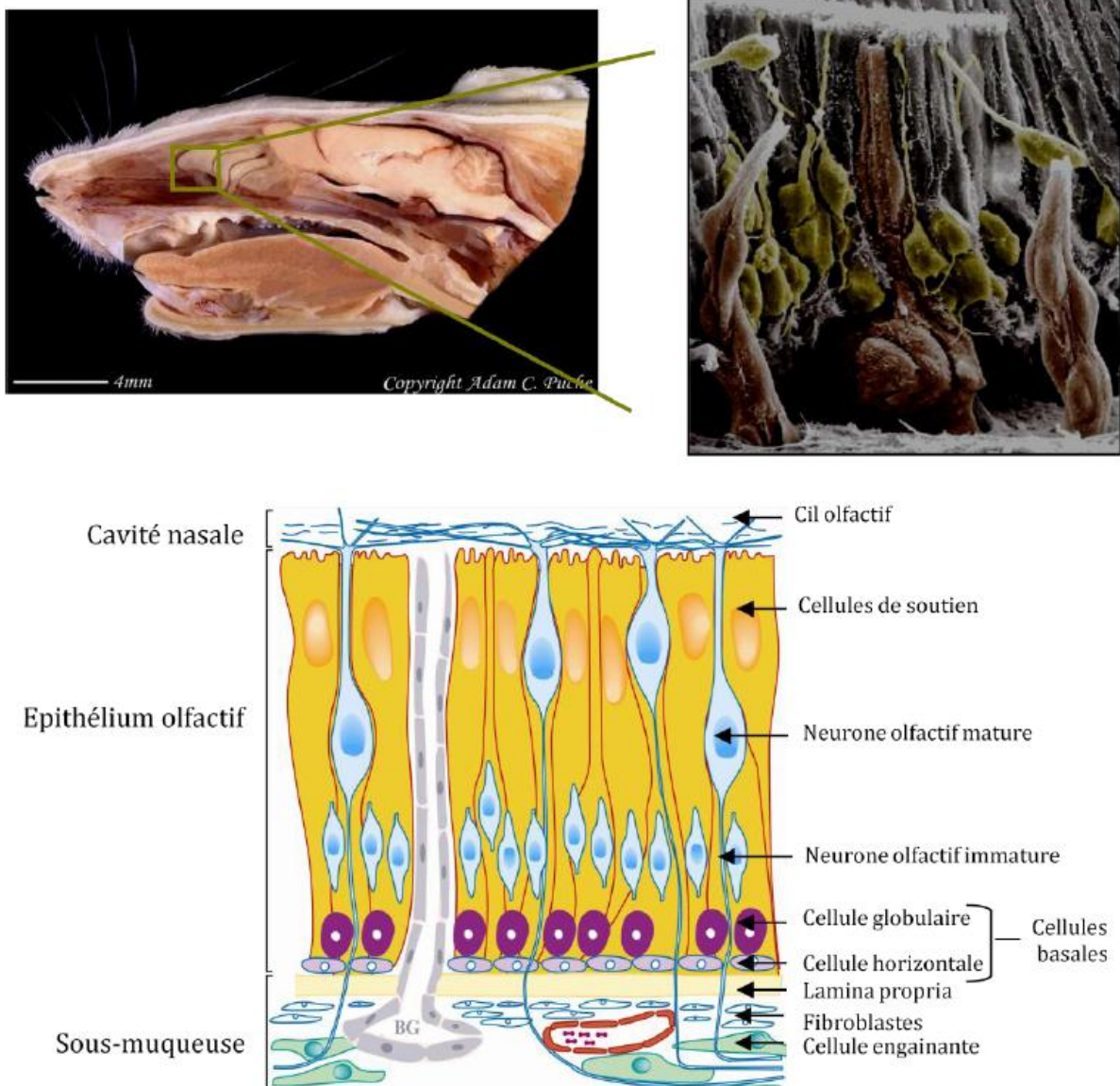


Figure 2 : Localisation et anatomie de la muqueuse olfactive. La MO se compose d'un neuro-épithélium pseudo-stratifié reposant sur une *lamina propria*. Cet EO est composé de neurones olfactifs intercalés entre des cellules de soutien et est renouvelé par la prolifération et la différenciation des cellules basales. BG : glande de Bowman.

Chaque neurone olfactif exprime un récepteur olfactif donné (Buck, 1996; Imai and Sakano, 2008) cependant chaque récepteur (et par extension chaque type de neurones) répond à une gamme de composés chimiques et non à un seul composé chimique (Holley et al., 1974; Malnic et al., 1999). Au sein d'un neurorécepteur olfactif donné, l'expression d'un allèle d'un OR réprime l'expression des autres gènes de la même famille (Chess et al., 1994; Serizawa et al., 2000). Les OSNs exprimant un récepteur donné sont restreints à une zone de l'EO. Ainsi, quatre différentes zones ont été identifiées selon les axes dorso-ventral et médian-latéral (Mori et al., 2000). Les OSNs projettent leur axone vers le bulbe olfactif, à travers la lame criblée de l'éthmoïde selon un schéma particulier. En effet les axones des OSNs exprimant un même récepteur olfactif projettent tous vers le même glomérule dans le bulbe olfactif (Sullivan and Dryer, 1996). Il a d'ailleurs été démontré qu'il y avait une corrélation directe entre le nombre d'OSNs exprimant un OR donné et la taille du glomérule correspondant dans le bulbe olfactif (Bressel et al., 2015). Le pattern particulier des projections épithélio-bulbaires sera abordé dans la partie II de ce chapitre.

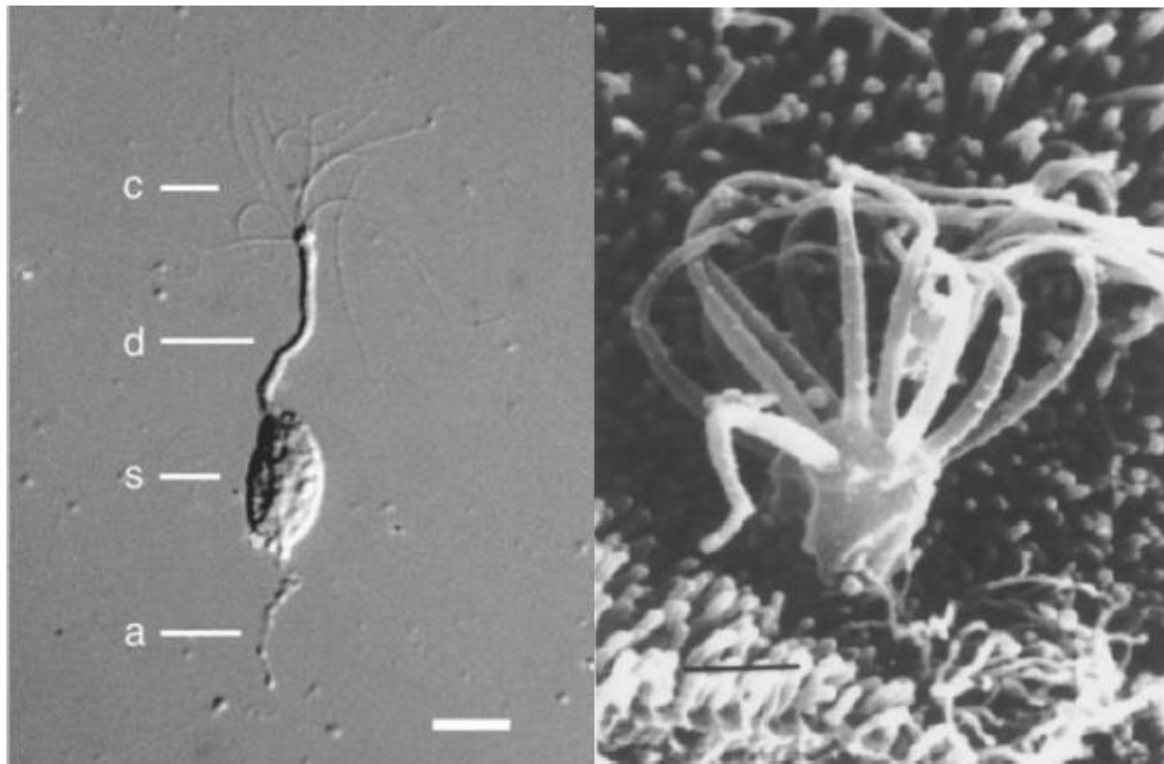


Figure 3 : Le neurone sensoriel olfactif. A gauche : un neurone sensoriel olfactif mature. c : cils olfactifs, d : dendrite, s : soma, a : axone. Barre d'échelle : 10µm. D'après (Kleene and Gesteland, 1981). A droite : photo en microscopie électronique d'un bouton dendritique. Barre d'échelle : 1 µm. D'après (Morrison and Costanzo, 1990).

Les cellules de soutiens

Les cellules de soutien (SUS pour sustaining cells) sont des cellules pourvues de microvillosités à leur pôle apical qui s'intercalent entre les OSNs. Elles représentent 15 à 25%

du nombre de cellules totales de l'EO. Elles assurent la cohésion cellulaire de l'EO grâce à la présence de jonctions serrées à leur pôle basal. Elles jouent un rôle dans la détoxification et la phagocytose des neurorécepteurs apoptotiques (Schwob, 2002). De plus elles sont impliquées dans la régulation de la balance hydrique, de la composition en ions du mucus et même dans la modulation de la sensibilité aux odeurs, *via* leurs récepteurs purinergiques (Menco et al., 1998; Hegg et al., 2003).

Les cellules basales

Dans le tiers basal de l'épithélium olfactif sont situés deux types de cellules basales. Les cellules basales horizontales (ou HBC), au niveau le plus basal, sont de formes allongées et les cellules basales globulaires (ou GBC), à un niveau un peu plus apical que les HBCs, sont de forme sphérique (Graziadei, 1973). Le rôle de ces deux populations cellulaires impliquées dans la régénération de l'EO sera étudié dans la partie **I.b** de ce chapitre.

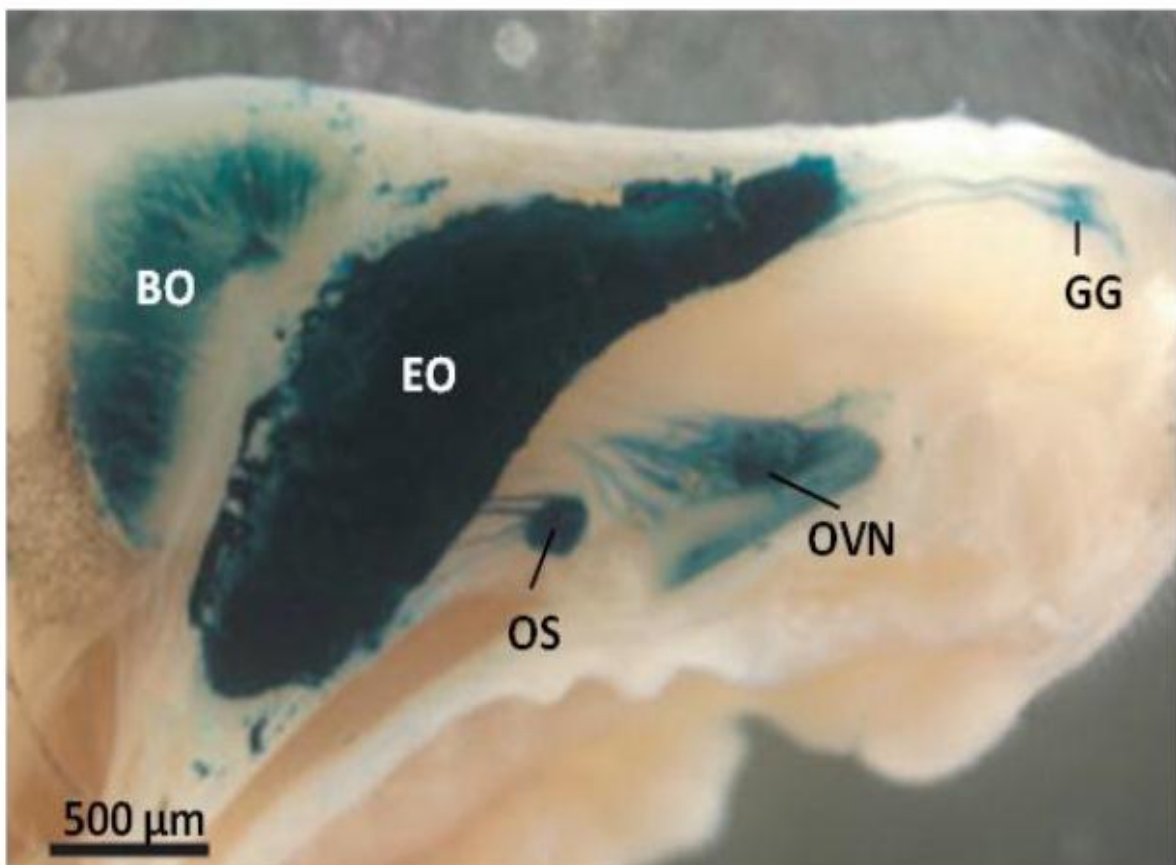


Figure 4 : Les OSNs sont repérables grâce à l'expression de la protéine OMP. BO : Bulbe olfactif ; EO : Epithélium olfactif ; OS : Organe septal, OVN : Organe voméro-nasal ; GG : Ganglion de Grueneberg. D'après (Munger et al., 2009).

Les cellules à microvillosités

En plus des types cellulaires sus-cités, il existe 4 types de cellules à microvillosités, classées en fonction de la morphologie de leurs microvillosités. Leur corps cellulaire se situe dans la

couche superficielle de l'EO. On distingue les cellules à microvillosités (Moran et al., 1982), les cellules de Jourdan de type B (Jourdan, 1975) et les cellules à microvillosités de type 2 et 4. Certaines de ces cellules émettent à la fois une dendrite vers la lumière de la cavité nasale et un axone qui traverse la *lamina propria* mais il n'est toujours pas clair qu'il s'agisse de neurones à part entière. Leur fonction au sein de l'EO reste non élucidée à ce jour bien que des éléments de la cascade de transduction de l'inositol triphosphate (IP3) soient présents dans certaines cellules à microvillosités (Hegg et al., 2010).

b. Développement et régénération de l'EO

Développement de l'EO

La morphogénèse du système olfactif peut se résumer en trois grandes étapes : formation de la placode olfactive, formation de la cavité nasale et maturation de l'EO embryonnaire. Cette dernière étape est elle-même divisée en 5 sous-étapes (Brunjes and Frazier, 1986) : stade placodal (prolifération et différenciation cellulaires), stade de genèse axonale, stade de genèse dendritique, stade de différenciation des neurones et de maturation des cils et un stade final de différenciation des cellules de soutien et des glandes de Bowman. Il est à noter que la maturation du système olfactif se poursuit après la naissance, probablement à cause de l'exposition de l'EO aux molécules odorantes. Enfin le rôle des récepteurs olfactifs dans le câblage des connexions épithélio-bulbaires est critique (Imai and Sakano, 2007; DeMaria and Ngai, 2010) et sera vu plus en détail dans la partie II de ce chapitre.

Régénération de l'EO

Du fait de leur proximité avec l'environnement extérieur, les OSNs sont particulièrement exposés à toutes sortes d'attaques (produits toxiques, fortes concentrations en odorants, variations de température importantes, etc...) et leur durée de vie n'excède pas deux mois chez les mammifères. De plus, les OSNs sont une porte d'entrée vers le cerveau pour les virus et les bactéries (Owen et al., 2009) et sont donc vulnérables à l'apoptose, qui agit comme un mécanisme de défense face à l'infection (Harris et al., 2009). Pour toutes ces raisons les phénomènes de mort cellulaire et de neurogenèse sont hautement contrôlés dans l'EO. La régénération de l'EO est assurée par les cellules basales (HBC et GCB) qui se multiplient et se différencient afin de remplacer les cellules mortes. Lorsqu'on a une perte des OSNs, on observe une hausse de la mitose des cellules basales (Graziadei, 1973). Les neurones mourants relâchent d'ailleurs des facteurs stimulant la prolifération des cellules basales (Bauer et al., 2003; Carter et al., 2004).

Les phénomènes de mort cellulaire et de régénération au sein de l'EO ont été étudiés par des approches de lésion (bulbectomie), où l'apoptose résulte de la destruction de l'axone des OSNs, ou des approches pharmacologiques, par l'utilisation de produits toxiques au niveau de la MO (Gokoffski et al., 2010).

Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques (Calof, 1995; Mackay-Sim, 2010) induisent la prolifération des cellules basales : EGF et TGF α pour les HBC (Farbman and Buchholz, 1996; Newman et al., 2000) et FGF2 pour les GBC (DeHamer et al., 1994; Newman et al., 2000) ainsi que le facteur de transcription Mash-1 (Calof et al., 1996). La concentration en molécules odorantes peut avoir un effet protecteur (si la concentration est faible) (Watt et al., 2004) ou, au contraire, induire l'apoptose des OSNs (en cas de fortes concentrations) (Brauchi et al., 2006). Il est aujourd'hui admis que les véritables cellules souches de l'EO sont les HBC, lesquelles sont totipotentes et peuvent donc produire tous les types cellulaires de l'EO (Carter et al., 2004; Leung et al., 2007) y compris les GBC qui elles sont multipotentes et servent de précurseurs neuronaux (Calof and Chikaraishi, 1989; Newman et al., 2000) (Figure 5).

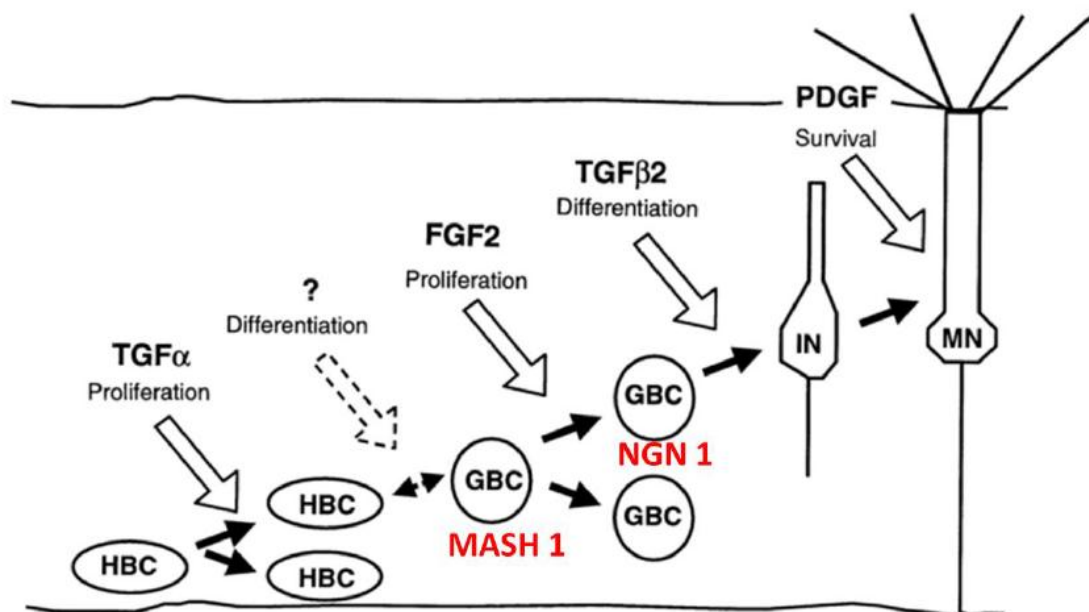


Figure 5 : Schéma possible de la neurogenèse au sein de l'EO. La prolifération et la différenciation des cellules souches est sous le contrôle de facteurs intrinsèques (en rouge) et extrinsèques (en noir). HBC : cellule basale horizontale, GBC : cellule basale globulaire, IN : neurone immature, MN : neurone mature. Modifié d'après (Newman et al., 2000).

c. Transduction et terminaison du signal olfactif

Transduction du signal olfactif

- Voie canonique (voie de l'AMPc)

La transduction du signal olfactif a lieu au niveau des cils olfactifs. La première étape de la transduction est la liaison de l'odorant à son récepteur (Buck, 1996). Celui-ci fait partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), récepteur à 7 domaines transmembranaires chargés d'effectuer la transduction de signaux extracellulaires. Les récepteurs aux odeurs sont codés par plus de 1000 gènes répartis sur un grand nombre de

chromosomes et font partie de la plus grande famille de récepteurs couplés aux protéines G, et probablement de la plus grande famille multigénique de tout le génome (Buck and Axel, 1991; Zhang and Firestein, 2002).

Les OR sont couplés à une protéine G spécifique, hétérotrimère composé des sous-unités $G_{\alpha olf}$, $\beta 1$ et $\gamma 13$ (Jones and Reed, 1989; Kerr et al., 2008). La sous-unité $G_{\alpha olf}$ va activer l'adénylyl cyclase III (ACIII), qui va produire de l'AMPc. L'AMPc permet l'ouverture des canaux CNG (activés par les nucléotides cycliques) qui sont perméables aux cations monovalents et au calcium (Schild and Restrepo, 1998; Gold, 1999). Il en résulte une entrée de calcium et de sodium et donc une dépolarisation de la membrane (Broillet and Firestein, 1999). La concentration basale en AMPc étant proche du seuil d'activation des CNG, même une faible augmentation suffit à entraîner un influx de calcium (Pun and Kleene, 2003).

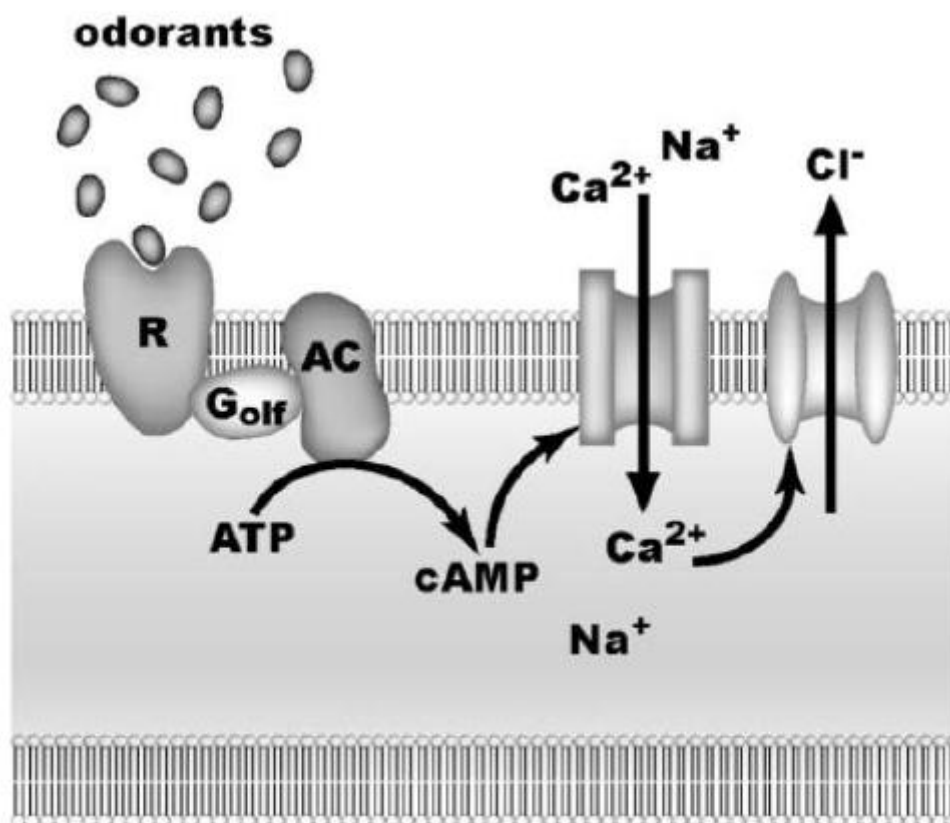


Figure 6 : Transduction du signal olfactif par la voie de l'AMPc. La fixation des odorants au récepteur provoque l'activation de la protéine Golf qui, à son tour, active l'ACIII qui produit de l'AMPc. Ce dernier provoque l'ouverture des canaux CNG, ce qui permet l'entrée de calcium et de sodium et entraîne la dépolarisation. Le calcium se fixe ensuite sur les canaux CaCC, ce qui potentialise la dépolarisation en permettant la sortie de chlore. D'après (Kaneko et al., 2004).

Toutefois le calcium va également bloquer l'activité des CNG (voir sous-partie terminaison du signal), il participe donc peu à la dépolarisation (Frings et al., 1995). Le rôle des canaux CNG serait plutôt d'augmenter le calcium intracellulaire (Leinders-Zufall et al., 1998) qui va activer les canaux CaCC (Calcium-activated Chloride Channel) (Kleene and Gesteland, 1991;

Lowe and Gold, 1993), qui sont des canaux perméables aux ions chlorure et activés par le calcium (Hartzell et al., 2005). Du fait de la forte concentration en ions chlorure due aux canaux NKCC1 (cotransporteur sodium, chlore, potassium) (Kaneko et al., 2004), les ions chlorure sortent de la cellule ce qui entraîne une dépolarisation. Les canaux CaCC sont essentiels dans la transduction du signal olfactif, comme le prouvent les réponses olfactives réduites chez des souris KO pour ce transporteur (Reisert et al., 2005) (Figure 6). Une autre étude a mis en évidence que lorsqu'on supprime le canal chlore responsable de l'amplification du signal (Ano2), les réponses de la MO en réponse aux odorants ne semblent pas modifiées (Billig et al., 2011).

La dépolarisation des OSNs induite par ces mouvements ioniques provoque l'émission de potentiels d'actions transmis le long de l'axone vers le bulbe olfactif (Schild and Restrepo, 1998; Firestein, 2001).

- Autres voies de transduction

Outre la voie de l'AMPC, plusieurs autres voies de transduction pourraient jouer un rôle dans la transduction olfactive. L'existence d'une guanilyl cyclase (GC-D) a été démontrée au sein de certains neurones olfactifs (Juilfs et al., 1997; Meyer et al., 2000; Leinders-Zufall et al., 2007). Le GMPc produit stimulerait les canaux CNG (Leinders-Zufall et al., 2007). Du fait de l'importante localisation de la GC-D au niveau des cils olfactifs, un rôle dans la perception des odorants est probable (Juilfs et al., 1997; Meyer et al., 2000; Leinders-Zufall et al., 2007). Plus précisément, elle serait impliquée dans la détection des stimuli hormonaux et/ou présents dans l'urine (Leinders-Zufall et al., 2007) voire dans la détection du CO₂ (Hu et al., 2007).

Un autre type de récepteurs, les TAARs (pour trace amino acid receptors) a été trouvé au sein de l'EO (Borowsky et al., 2001; Liberles and Buck, 2006). Il s'agit également d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires, mais dont la structure est plus proche des récepteurs dopaminergiques ou sérotoninergiques que des récepteurs olfactifs classiques (Liberles and Buck, 2006). Ces récepteurs se trouvent au niveau des cils olfactifs et répondent aux amino acides volatils trouvés dans l'urine de souris, ce qui suggérerait un rôle dans la détection des stimuli sociaux (Liberles and Buck, 2006). En effet, il a été démontré que ces récepteurs, présents au sein de l'EO principal, joueraient un rôle dans la détection de certaines phéromones murines (Liberles, 2009, 2015).

Mais la voie de transduction alternative la plus étudiée a été la voie IP3/DAG. En effet il a été démontré une réponse de certains neurones olfactifs à des odorants *via* la voie de l'inositol triphosphate (IP3) et de la phospholipase C (PLC) (Boekhoff et al., 1990). Pendant plus d'une décennie, un vif débat a opposé les scientifiques de l'olfaction sur le rôle exact de cette voie de transduction. Est-elle spécifique à certains odorants, IP3 est-il un second messager alternatif à l'AMPC ou encore est-ce que les deux voies agissent ensemble ? Cette dernière

hypothèse est appuyée par le fait que l'activité de l'ACIII augmente lorsqu'on ajoute de l'IP3 à une culture de neurones olfactifs (Ronnett et al., 1993).

Néanmoins la densité de canaux sensibles à l'IP3 par rapport aux canaux sensibles à l'AMPc au niveau des boutons dendritiques est très faible (85 canaux/ μm^2 pour IP3 et 1000 canaux/ μm^2 pour les CNG, i.e. 3,6%) (Lischka et al., 1999). Le rôle de l'IP3 comme second messenger alternatif a été remis en question par le fait que les OSNs de souris KO pour les éléments de la voie de transduction de l'AMPc ne présentent plus de réponses aux odorants (y compris ceux connus pour activer la voie IP3). Les auteurs de ces différentes études concluent que l'AMPc est le seul second messenger nécessaire dans la transduction olfactive - souris KO pour CNG (Brunet et al., 1996), souris KO pour Golf (Belluscio et al., 1998), souris KO pour ACIII (Wong et al., 2000).

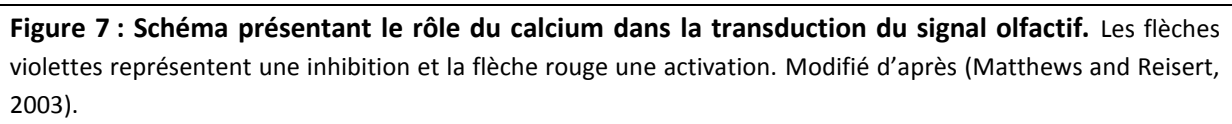
Le rôle de la signalisation IP3 reste donc incompris à ce jour bien que certains auteurs supposent que les cellules exprimant la PLC β 2 pourraient être des cellules à microvillosités. Pour une description détaillée du rôle de l'IP3 dans l'olfaction voir la revue de Rebecca Elsaesser (Elsaesser and Paysan, 2005). Par ailleurs, une étude récente a démontré qu'un même récepteur olfactif pouvait utiliser la voie canonique de l'AMPc ou la voie IP3/DAG en fonction du ligand lié au récepteur (Yu et al., 2014). Il serait également possible que cette voie soit utilisée lorsque le ligand entraîne une inhibition de la réponse du neurone sensoriel olfactif (Ukhanov et al., 2010).

Terminaison du signal olfactif

Outre l'arrêt de la stimulation olfactive, un grand nombre de processus sont à l'œuvre pour terminer le signal olfactif. Le plus évident pour terminer la réponse olfactive est de supprimer la source de stimulation, i.e. l'odorant en lui-même. Il a été prouvé que le complexe odorant/OBP est rapidement internalisé par les cellules de soutien après la stimulation (Strotmann and Breer, 2011).

Au niveau des OSNs, la terminaison du message olfactif a lieu à plusieurs niveaux. La phosphorylation de l'OR par GRK3 (G protein receptor kinase 3) est le principal mécanisme de terminaison du signal au niveau du récepteur olfactif en lui-même. Des études ont montré l'implication de la phosducine (Boekhoff et al., 1997) et de l'arrestine 2 (Dawson et al., 1993) dans ce processus. Une autre façon de mettre fin à la transduction du signal est de faire baisser le niveau intracellulaire en calcium, ce qui est possible grâce à l'action d'un échangeur sodium/calcium au niveau des boutons dendritiques (Noé et al., 1997).

Mais le calcium a également un rôle inhibiteur en lui-même en se liant à la calmoduline. Le complexe calcium/calmoduline va activer la PDE (phosphodiesterase) ce qui va entraîner une baisse de la concentration intracellulaire en AMPc (Yan et al., 1995). Le calcium va aussi diminuer la sensibilité des canaux CNG aux nucléotides cycliques (Zufall et al., 1991; Kramer and Siegelbaum, 1992) *via* une interaction directe entre les canaux CNG et le complexe



Comme expliqué dans la partie précédente, chaque OSN n'exprime qu'un seul OR choisi dans un large répertoire. Or, étant donné le nombre important de neurones au sein de l'EO, plusieurs milliers d'OSNs vont exprimer le même récepteur olfactif. Ces neurones ne sont pas répartis au hasard mais ségrégent dans l'une des 4 zones décrites dans l'EO. Les OSNs exprimant le même OR sont répartis au sein d'une même zone (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). Cette répartition grossière au sein de l'EO (4 zones pour environ 1000 OR différents) va néanmoins permettre aux axones des OSNs de projeter vers le BO de façon précise. En effet, les OSNs exprimant un OR particulier vont projeter vers un ou deux glomérules dans le BO de façon symétrique entre chaque BO (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Mombaerts et al., 1996). La répartition grossière des neurones dans l'EO devient donc une répartition fine et hautement contrôlée au niveau du BO (Figure 8).

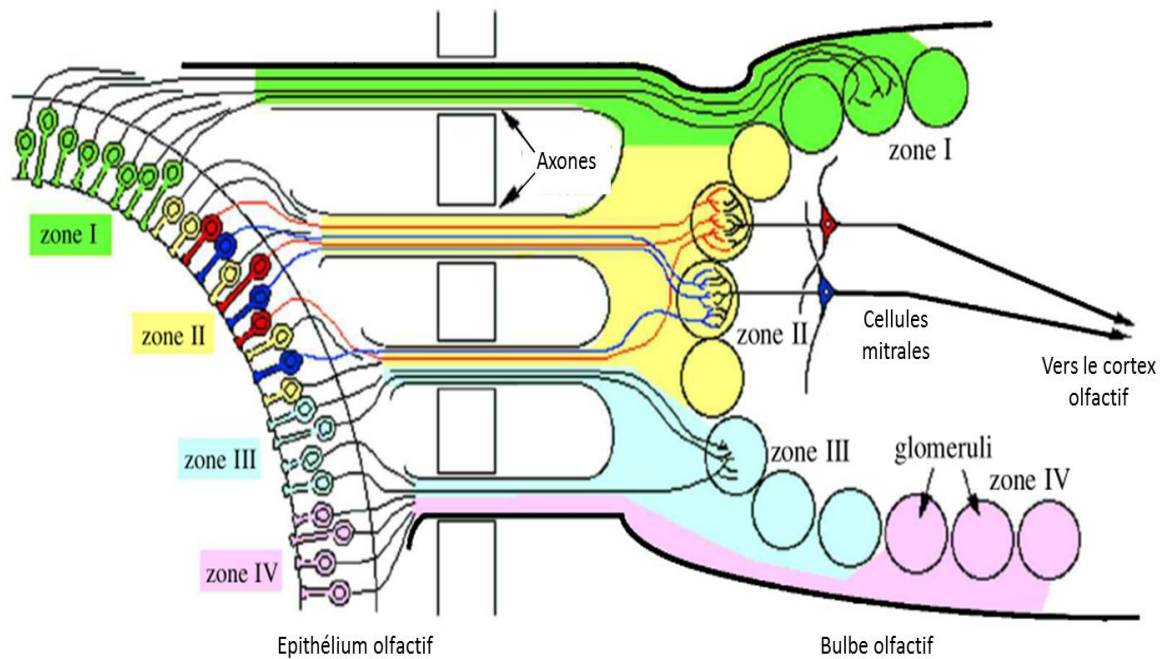


Figure 8 : Organisation zonale de l'EO et connexions épithélio-bulbaires. Les OSNs sont répartis au sein de l'EO en fonction du type d'OR qu'ils expriment. Tous les OSNs exprimant un OR donné projettent vers le même glomérule dans le bulbe olfactif. Modifié d'après (Mori et al., 2000).

Le rôle des ORs dans ce processus semble être des plus importants. Si on supprime l'expression du gène codant pour le récepteur olfactif d'un OSN, alors l'axone de ce dernier projette bien vers le BO mais reste à la surface de ce dernier, sans jamais réussir à prendre sa place au sein du glomérule (Wang et al., 1998). De même si on substitue le gène de l'OR normalement exprimé dans un OSN par un autre gène codant pour un autre OR, des projections glomérulaires anormales se mettent en place (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998; Feinstein et al., 2004). Les récepteurs olfactifs jouent donc un rôle essentiel pour le guidage des axones vers le bon glomérule dans le bulbe olfactif (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998; Zou et al., 2009).

III. Organisation et fonctionnement du bulbe olfactif

a. Anatomie du bulbe olfactif

Le bulbe olfactif est le premier relai de l'information olfactive, le lieu où le message électrique porteur de l'information olfactive est analysé et intégré avant d'être transmis aux structures supérieures dans le cerveau. Historiquement, le bulbe olfactif a été décrit comme étant composé de couches concentriques de cellules et de fibres (axones et dendrites) (Figure 9). Des couches extérieures vers les couches intérieures, se trouvent :

- La couche des nerfs : composée des axones des OSNs arrivant dans le bulbe olfactif (Shepherd, 1972).

- La couche glomérulaire : composée, comme son nom l'indique, des glomérules : des structures sphériques d'environ 100 μm de diamètre. Les axones des OSNs y font synapse avec les dendrites des neurones-relais. C'est également la couche où se trouvent les corps cellulaires des cellules péri-glomérulaires (Pinching and Powell, 1971a). Ces cellules de 8 à 10 μm de diamètre connectent entre eux différents glomérules (Pinching and Powell, 1971b). On y trouve aussi les corps cellulaires des cellules à axone court superficielles. Ces cellules, d'environ 15 μm de diamètre, possèdent des axones plus longs pouvant contacter plusieurs glomérules distants et non uniquement des glomérules adjacents (Pinching and Powell, 1971b).
- La couche plexiforme externe : principalement composée de fibres, notamment les dendrites des neurones-relais, les dendrites des cellules granulaires et les axones des neurones des structures supérieures du cerveau innervant le bulbe olfactif (Pinching and Powell, 1971b). On y trouve également les corps cellulaires des cellules à panaches, l'un des deux types de neurones-relais (Shepherd, 1972).
- La couche des cellules mitrales : composée, comme son nom l'indique, des corps cellulaires des cellules mitrales. Ces dernières constituent le deuxième type de neurones-relais au sein du bulbe olfactif et leur diamètre varie de 10 à 30 μm (Shepherd, 1972; Royet et al., 1988). Certaines cellules granulaires dites superficielles se trouvent également dans cette couche.
- La couche plexiforme interne : composée de fibres exclusivement. On y trouve les axones des neurones-relais, des projections axonales centrifuges (vers le bulbe olfactif) ainsi que des dendrites des cellules granulaires (Shepherd, 1972).
- La couche granulaire : composée des cellules granulaires, interneurones de 6 à 10 μm de diamètre. Ces cellules, les plus nombreuses au sein du bulbe olfactif, possèdent une arborisation dendritique très développée (Price and Powell, 1970a). Cette couche est traversée par les axones des neurones-relais qui se regroupent en un faisceau appelé le tractus olfactif latéral (Shepherd, 1972), qui convoie l'information olfactive vers les structures supérieures du cerveau.

b. Fonctionnement du bulbe olfactif

L'information olfactive en provenance des neurones sensoriels olfactifs est donc transmise vers le cerveau grâce aux neurones-relais du bulbe olfactif (cellules mitrales et cellules à panaches) *via* des synapses excitatrices au niveau du glomérule (Pinching and Powell, 1971a). Néanmoins l'information n'est pas transmise telle quelle et deux niveaux de modulation du signal olfactif interviennent dans le bulbe olfactif (Figure 10).

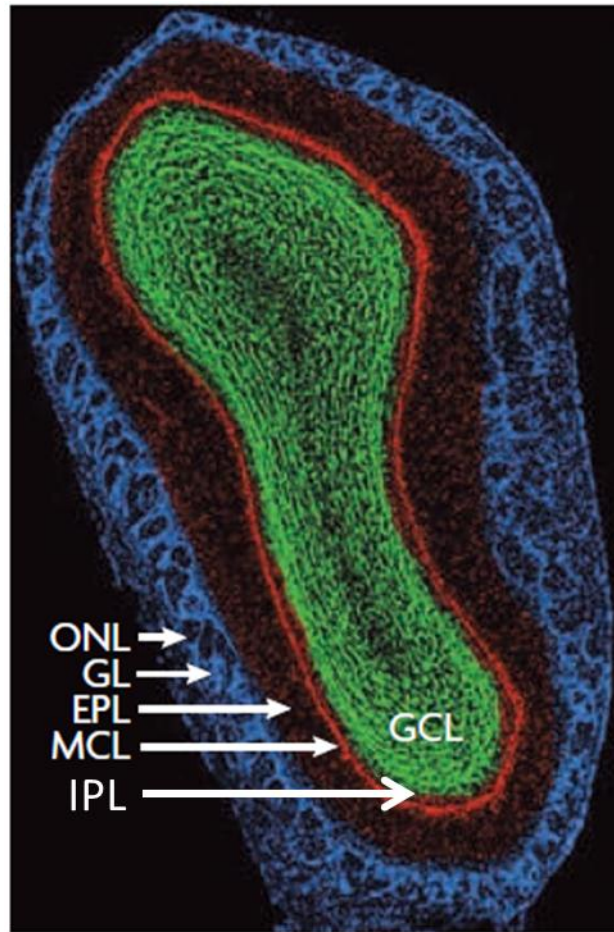


Figure 9 : Organisation en couches du bulbe olfactif. ONL : couche des nerfs olfactifs, GL : couche glomérulaire, EPL : couche plexiforme externe, MCL : couche des cellules mitrales, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche granulaire. Modifié d'après (Zou et al., 2009).

Le premier niveau de modulation se situe au niveau du glomérule où les dendrites des neurones-relais forment des synapses excitatrices vers les dendrites des cellules péri-glomérulaires (Pinching and Powell, 1971a; Giustetto et al., 1996). En retour ces dernières projettent des synapses inhibitrices gabaergiques vers les dendrites des neurones-relais (Pinching and Powell, 1971a; Mugnaini et al., 1984). Ces synapses inhibitrices sont également présentes directement au niveau des axones des OSNs (Nickell et al., 1994; Bonino et al., 1999). Les cellules péri-glomérulaires vont donc limiter la quantité d'informations et, de façon plus générale, moduler l'information olfactive en provenance de l'épithélium olfactif. Les cellules à axone court superficielles sont, quant à elles, impliquées dans les phénomènes d'inhibition latérale *via* leurs synapses projetant vers les cellules péri-glomérulaires (Aungst et al., 2003).

Le deuxième niveau de régulation de l'information olfactive se situe dans la couche plexiforme externe où les dendrites des neurones-relais forment des synapses réciproques avec les dendrites des interneurons de la couche granulaire (Price and Powell, 1970b) permettant les phénomènes d'inhibition latérale (Yokoi et al., 1995). Cette organisation

fonctionnelle particulière du bulbe olfactif permet donc d'affiner la réponse aux stimuli odorants (Mori et al., 1999).

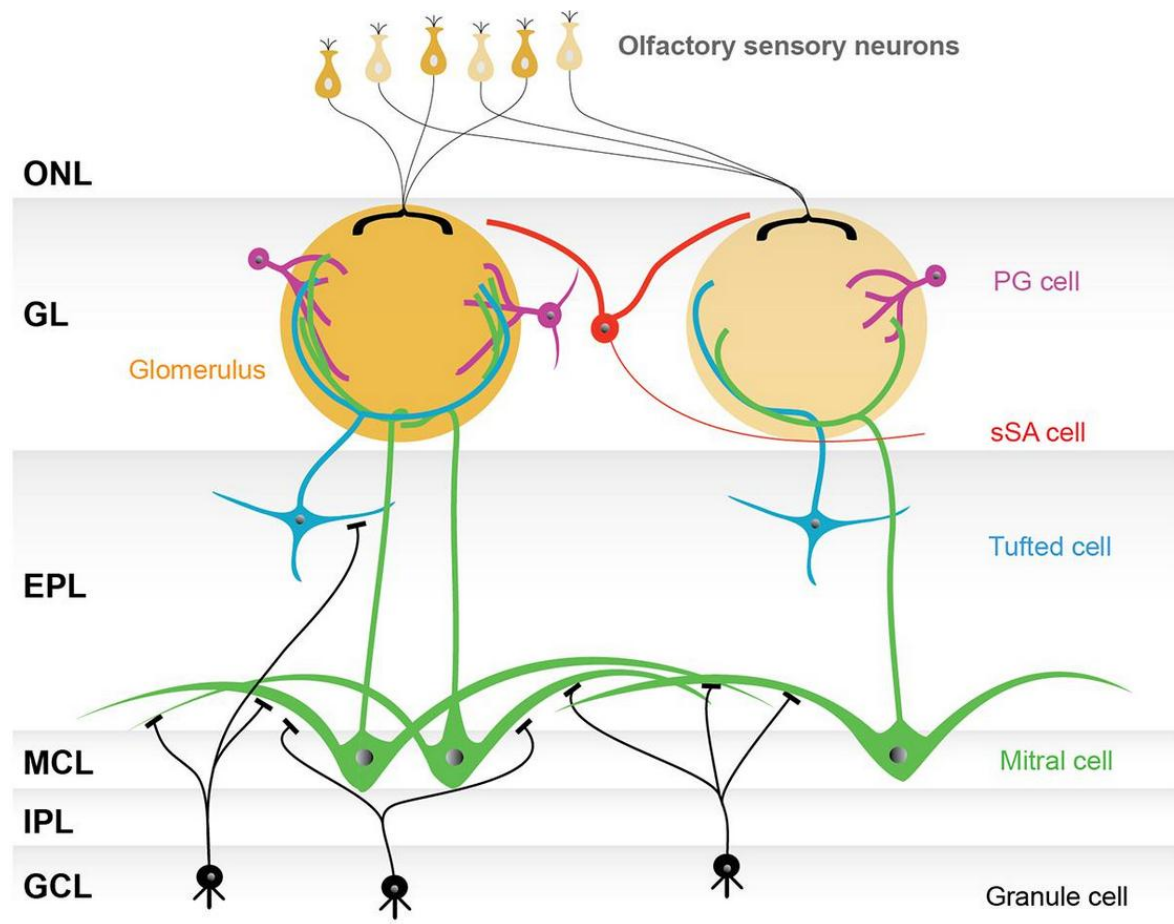


Figure 10 : Organisation fonctionnelle du bulbe olfactif. ONL : couche des nerfs olfactifs, GL : couche glomérulaire, EPL : couche plexiforme externe, MCL : couche des cellules mitrales, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche granulaire, PG cell : cellule péri-glomérulaire, sSA cell : cellule à axone court superficielle. D'après (Nagayama et al., 2014)

Plus récemment, la compréhension de l'anatomie fonctionnelle du bulbe olfactif s'est améliorée et reflète davantage la diversité des types cellulaires présents dans les différentes couches le composant, notamment dans les couches glomérulaires et granulaires (Nagayama et al., 2014). De plus, de nouveaux types cellulaires ont été découverts au niveau de la couche plexiforme externe, en particulier des interneurons inhibiteurs GABAergique (Nagayama et al., 2014).

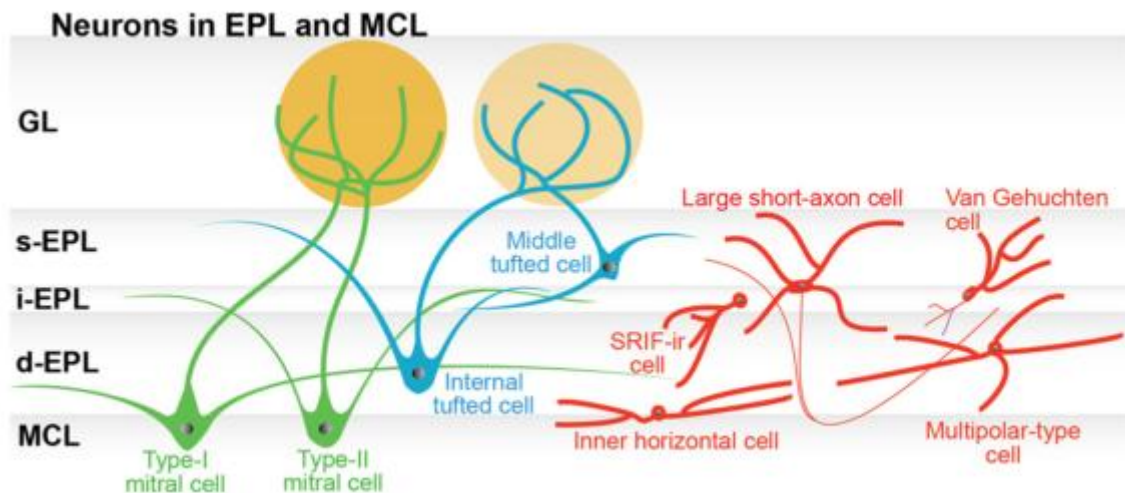


Figure 11 : Diversité des types cellulaires de la couche plexiforme externe du bulbe olfactif. De nombreux neurones existent permettant une régulation fine de la transmission du message olfactif. GL : couche glomérulaire, s-EPL : couche plexiforme externe superficielle, i-EPL : couche plexiforme externe intermédiaire, d-EPL : couche plexiforme externe distale, MCL : couche des cellules mitrales, SRIF-ir cell: cellule immunoréactive à la somatostatine. D'après (Nagayama et al., 2014).

IV. Structures supérieures et olfaction

Les neurones-relais du bulbe olfactif projettent vers différentes structures dans le cerveau au moyen de deux voies principales. Par la voie latérale, les axones des neurones-relais, regroupés au sein du tractus olfactif latéral, projettent directement sur plusieurs structures cérébrales : le tubercule olfactif, le cortex piriforme ou encore le cortex entorhinal (Haberly and Price, 1977; Ennis et al., 2007). Par la suite des projections sont envoyées vers l'amygdale, le thalamus ou encore l'hypothalamus (Barone et al., 1981; Price et al., 1991). L'information olfactive est donc envoyée vers des structures limbiques et / ou cognitives (par l'intermédiaire du thalamus).

Les collatérales des axones des neurones-relais projettent principalement vers le noyau olfactif antérieur par la voie médiane (Shepherd, 1972; Haberly and Price, 1977; Ennis et al., 2007). Le noyau olfactif antérieur se projette également au niveau du cortex piriforme, du tubercule olfactif et de l'hypothalamus (Barone et al., 1981; Price et al., 1991). De façon générale, les structures recevant des afférences du bulbe olfactif rétro-projettent ensuite vers ce dernier au niveau des couches plexiformes internes et externes (Ennis et al., 2007).

Le bulbe olfactif va aussi recevoir des projections noradrénergiques en provenance du *locus coeruleus*, sérotoninergiques en provenance du raphé et cholinergiques en provenance du noyau de la bande latérale de Broca (Ennis et al., 2007). Enfin le bulbe olfactif est fortement innervé par l'hypothalamus (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999), ce qui est particulièrement intéressant étant donné le rôle prépondérant de cette structure dans la régulation de la prise alimentaire.

Le système olfactif est donc relié, aussi bien anatomiquement que fonctionnellement, avec différentes structures cérébrales. Cela permet une modulation importante de l'information olfactive en fonction de différents états internes, notamment l'état nutritionnel. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons donc aux liens étroits qui unissent le système olfactif et le système de régulation du métabolisme énergétique.

Chapitre 2 : Les relations entre le système olfactif et le système de régulation de l'énergie homéostasique

L'olfaction est un sens primordial dans la recherche et la consommation de nourriture. La plupart des animaux se fient à leur odorat dans leur recherche de nourriture et une perte de l'odorat induit de nombreuses perturbations du comportement alimentaire. Cependant il est aussi vrai que l'état nutritionnel d'un animal peut moduler son système olfactif. Ces deux systèmes semblent donc agir réciproquement l'un sur l'autre.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, il existe des voies neuro-anatomiques communes entre le système olfactif et le système de régulation de la prise alimentaire, notamment l'hypothalamus. Le bulbe olfactif projette directement vers l'hypothalamus, au niveau du noyau supra-optique (Smithson et al., 1989). D'ailleurs la stimulation électrique du bulbe olfactif induit une réponse de l'hypothalamus (Guevara-Aguilar et al., 1988; Price et al., 1991). De plus, de nombreuses structures recevant des afférences du BO se projettent ensuite vers l'hypothalamus.

De façon réciproque, l'hypothalamus émet des projections directement vers le bulbe olfactif (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999) ainsi que vers d'autres structures impliquées dans l'olfaction (de Olmos et al., 1978; Newman and Winans, 1980; Shipley and Adamek, 1984). Enfin, de façon générale, de nombreux récepteurs aux hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sont exprimés à tous les niveaux du système olfactif (Palouzier-Paulignan; Lacroix et al., 2012).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés en particulier au système olfactif périphérique et au comportement olfactif de l'animal diabétique. C'est pourquoi, dans la suite de ce chapitre, j'aborderai principalement l'étude des liens entre le système olfactif et le système de régulation de la prise alimentaire au niveau de la muqueuse olfactive et au niveau du comportement en général. Bien évidemment, cela ne signifie pas que de tels liens ne sont pas présents au niveau du bulbe olfactif. Bien au contraire, de nombreux liens, aussi bien anatomiques que fonctionnels, unissent le BO et les structures en charge du contrôle de la prise alimentaire. Nous verrons, dans un premier temps, l'importance de l'olfaction dans le contrôle de la prise alimentaire, puis les effets du statut nutritionnel sur le système olfactif.

I. L'olfaction agit sur la prise alimentaire

La perception sensorielle de la nourriture agit sur la prise alimentaire dès l'arrivée de la nourriture dans la cavité buccale et même avant cela. Les organes des sens (en particulier l'olfaction ou la vision), en réponse à un stimulus alimentaire, peuvent induire des changements physiologiques préparant à l'ingestion et à la digestion de la nourriture.

L'exemple le plus connu nous vient de Pavlov, où ce dernier observait la salivation d'un chien en réponse à un stimulus sensoriel préalablement associé à la consommation de nourriture (Pavlov, 1902).

La perception sensorielle de nourriture induit également une rapide et légère hyperinsulinémie qui participe au déclenchement de la prise alimentaire (Louis-Sylvestre, 1976). Si, dans ces études, la perception sensorielle est traitée comme un tout (sans faire de distinction entre les différentes modalités sensorielles), l'olfaction en elle-même est suffisante pour agir sur la prise alimentaire. En effet, le simple fait de sentir de la nourriture suffit à augmenter la sécrétion de salive et celle de la gastrine dans l'estomac (Pangborn et al., 1979).

De plus, la variation de la qualité sensorielle d'un repas (plats odorisés avec un seul odorant *versus* plusieurs odorants) augmente la quantité de nourriture ingérée au cours du repas (Le Magnen, 1999). Ce phénomène, appelé « rassasiement sensoriel spécifique », a été décrit pour la première fois par Le Magnen en 1956 et a été intensément étudié par la suite. Non seulement, la quantité de nourriture ingérée augmente lorsque la variété sensorielle du repas augmente, mais c'est aussi le cas du nombre total de calories (Rolls et al., 1984). Le plaisir ressenti en mangeant joue aussi un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire. La palatabilité d'un aliment, i.e. sa valeur hédonique, module la quantité de nourriture ingérée, même dans le cas où cette palatabilité n'a été évaluée que grâce à des indices olfactifs sans ingestion de la nourriture (Rolls et al., 1984; Sørensen et al., 2003).

Afin de mieux comprendre l'influence de l'olfaction sur le contrôle de la prise alimentaire, des études chez l'animal anosmique ont été réalisées. Dans la plupart des études, l'anosmie était obtenue par bulbectomie bilatérale. L'ablation des bulbes olfactifs provoquerait une diminution de la taille des repas mais une augmentation du nombre de ces derniers chez le rat et ce phénomène serait transitoire (Meguid et al., 1993, 1997). D'autres auteurs ont pu observer l'installation d'une hyperphagie chez les animaux anosmiques, accompagnée de la mise en place d'une obésité (Miro et al., 1980, 1982; Séguin and Perret, 2005). Cependant le contrôle de la prise alimentaire est régi par de nombreux mécanismes que la perte de l'olfaction ne suffit pas à dérégler totalement. De plus l'anosmie résultante de la bulbectomie bilatérale a d'autres effets adverses sur l'organisme, tels que la perturbation des relations sociales des animaux et la mise en place d'un phénotype dépressif (Song and Leonard, 2005).

II. L'état nutritionnel agit sur le système olfactif

a. Rôle de l'état nutritionnel

Les premières études sur le rôle de l'état nutritionnel sur l'olfaction remontent au début du 20^{ème} siècle. A cette époque, Langfeld remarquait déjà que les capacités olfactives d'un

individu augmentaient en situation de jeûne prolongé (Langfeld, 1914). Il s'agissait de la première observation de la modulation olfactive par l'état nutritionnel.

Depuis, de nombreux travaux ont été menés sur l'influence du jeûne sur la perception olfactive chez l'humain. Chez l'individu sain, les études sur les effets du jeûne ont donné des résultats mitigés. Les études réalisées dans les années quarante et cinquante ont conclu alternativement à une augmentation des capacités olfactives après le jeûne et à une diminution en état de satiété (Goetzl and Stone, 1947, 1948; Goetzl et al., 1950) ou à l'exact opposé (Janowitz and Grossman, 1949; Zilstorff-Pedersen, 1955). Certaines études ont notamment conclu qu'une satiété artificielle induite par l'ingestion de sucrose ou par distension gastrique diminuait la perception olfactive (Ahokas and Goetzl, 1951; Goetzl et al., 1951).

Plus récemment, deux études ont également trouvé des résultats contradictoires concernant l'effet du jeûne qui augmenterait la sensibilité olfactive pour une odeur neutre (Stafford and Welbeck, 2011) alors qu'une autre équipe ne trouve aucune influence de l'effet du jeûne sur la sensibilité olfactive à une odeur neutre (Albrecht et al., 2009). De plus pour une odeur de nourriture, les conclusions des deux équipes sont opposées. En effet la sensibilité olfactive à une odeur de nourriture serait plus élevée en état de satiété (Albrecht et al., 2009) ou en état de jeûne (Stafford and Welbeck, 2011). En résumé, les deux équipes retrouvent les résultats de Berg et collaborateurs selon lesquels l'état nutritionnel chez l'humain module la sensibilité olfactive pour une odeur de nourriture (Berg et al., 1963). De plus il a été montré que l'état nutritionnel a une influence sur la palatabilité des aliments consommés (Sørensen et al., 2003; Yeomans, 2006). Bien entendu, la disparité des études chez l'être humain peut, en partie, s'expliquer par le fait qu'il est difficile de contrôler avec exactitude la quantité et la qualité des repas.

Les études chez l'animal sont plus tranchées. Chez le rongeur en particulier, le jeûne augmente la détection d'une odeur neutre (Aimé et al., 2007) ainsi que l'exploration d'une boule à thé contenant une odeur de nourriture (Prud'homme et al., 2009). De plus, des rats ayant eu un accès limité à la nourriture de façon répétée présentent des comportements olfactifs altérés (Badonnell et al., 2012). La plupart des études se sont focalisées sur le bulbe olfactif et il a été démontré que le jeûne augmente l'activité des cellules mitrales alors que cette dernière est diminuée en état de satiété (Pager et al., 1972). Cependant cette étude n'arrivait à cette conclusion que pour des odeurs alimentaires et non des odeurs neutres. Depuis, d'autres études ont prouvé que l'activité des cellules mitrales était augmentée en période de jeûne et diminuée en état de satiété, et ce, que les odeurs soient alimentaires ou non (Apelbaum and Chaput, 2003).

Lorsque le phénomène de satiété est imité par distension gastrique, une diminution de l'activité des cellules mitrales est observée (Chaput and Holley, 1976). A l'inverse lorsque l'hypoglycémie en état de jeûne est imitée chez des animaux rassasiés par injection

périphérique d'insuline, une augmentation de l'activité des cellules mitrales est observée (Pager et al., 1972; Cain, 1975). L'insuline n'est pas la seule molécule à avoir été utilisée afin d'imiter les changements hormonaux liés à l'état nutritionnel et d'autres études utilisant diverses hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique ont trouvé des résultats similaires au niveau du système nerveux central (Palouzier-Paulignan; Lacroix et al., 2012). La partie suivante se focalisera sur les études menées au niveau du système olfactif périphérique et au niveau comportemental.

b. Rôle des hormones et peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Les molécules impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique peuvent être classées en fonction de leurs effets sur la prise alimentaire : d'un côté les molécules stimulant la prise alimentaire (orexigènes) et de l'autre celles inhibant la prise alimentaire (anorexigènes). Les récepteurs à ces molécules sont présents au sein de la muqueuse olfactive et permettent aux hormones orexigènes et anorexigènes d'agir directement sur le système olfactif périphérique (Figure 12).

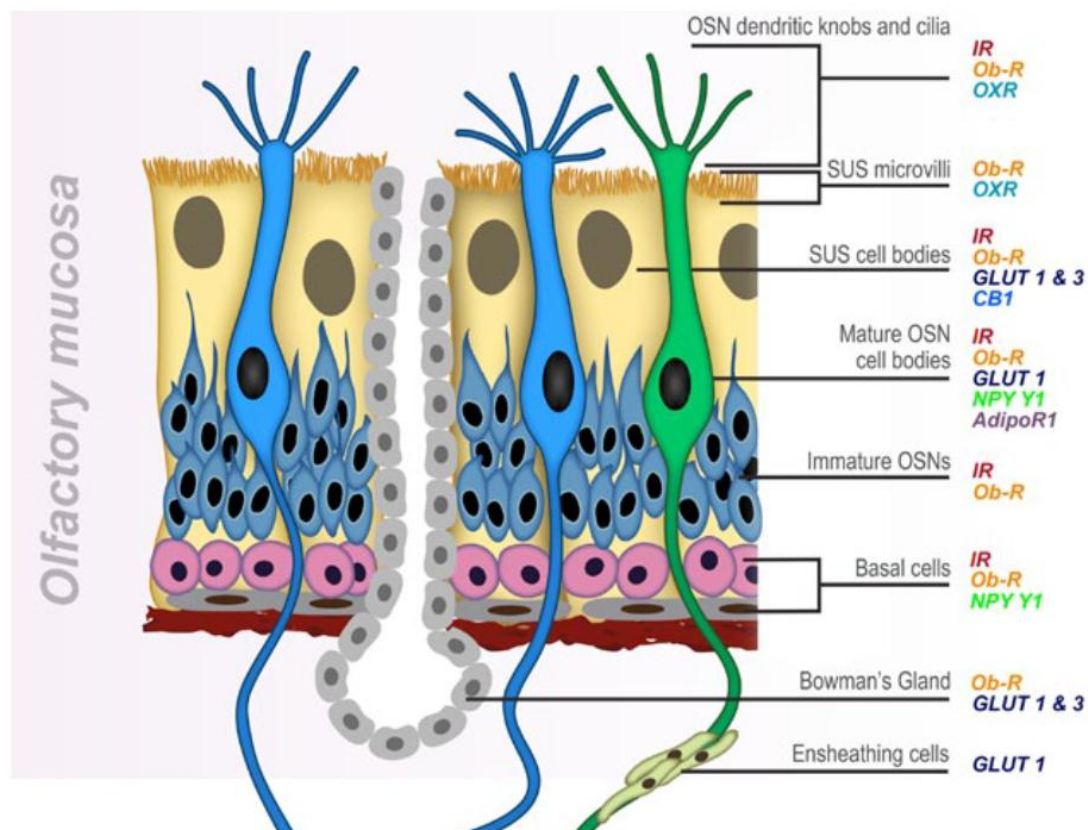


Figure 12 : Localisation des récepteurs aux hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique au sein de la muqueuse olfactive. IR : récepteur à l'insuline, Ob-R : récepteur à la leptine, OXR : récepteur à l'orexine, GLUT : transporteur du glucose, CB1 : récepteur aux endocannabinoïdes, NPY Y1 : récepteur au NPY, AdipoR1 : récepteur à l'adiponectine. D'après (Palouzier-Paulignan; Lacroix et al., 2012)

Molécules orexigènes

- Neuropeptide Y (NPY)

Le NPY est un peptide produit par l'hypothalamus, le thalamus ou encore l'hippocampe (Chronwall et al., 1985). Après un repas le niveau de NPY augmente dans l'hypothalamus où il joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire (Nguyen et al., 2011). Dans la muqueuse olfactive le NPY se retrouve au niveau des cellules de soutien (Hansel et al., 2001), dans certaines cellules à microvillosités (Montani et al., 2006), dans les cellules engainantes (Ubink and Hökfelt, 2000) et dans les corps cellulaires des neurones sensoriels olfactifs (Doyle et al., 2008).

Deux isoformes du récepteur au NPY, Y1 et Y5, sont impliqués dans la prise alimentaire (Beck, 2006). Y1 est exprimé dans les OSNs (Negroni et al., 2012) et dans les cellules basales (Hansel et al., 2001). De plus chez des souris KO pour le récepteur Y1, le nombre d'OSNs est diminué (Doyle et al., 2008) et les capacités olfactives des animaux sont altérées. Dans une étude récente, Negroni et collaborateurs ont prouvé que 1) l'amplitude de la réponse à un odorant de la muqueuse olfactive (par électroolfactogramme) est augmentée après application de NPY (et d'un agoniste de Y1) et que 2) le récepteur Y1 est surexprimé après un jeûne de 14h chez le rat (Negroni et al., 2012). Le NPY pourrait agir à plusieurs niveaux dans la muqueuse olfactive. Il a notamment été prouvé qu'il pourrait agir sur le guidage axonal des connexions épithélio-bulbaires (Ubink and Hökfelt, 2000) et qu'il aurait un rôle dans les phénomènes d'apoptose et de régénération de l'épithélium olfactif (Montani et al., 2006; Martin et al., 2009).

- Orexines

Les orexines A et B (OXA et OXB) sont des neuropeptides synthétisés par l'hypothalamus latéral (Broberger et al., 1998) qui stimulent la prise alimentaire (Tsujino and Sakurai, 2009). Chez l'humain, on sait que les patients narcoleptiques et cataleptiques qui n'ont pas de neurones produisant OXA ont une détection et une discrimination olfactives réduites (Baier et al., 2008; Bayard et al., 2010; Buskova et al., 2010). Cette baisse des capacités olfactives peut être annulée par l'instillation intranasale d'OXA (Baier et al., 2008).

Chez l'animal, Julliard et collaborateurs ont utilisé des injections intracérébroventriculaires (icv) d'OXA dans le ventricule latéral chez des animaux rassasiés afin d'imiter un état de jeûne (Julliard et al., 2007). Grâce au protocole de COA (conditioned olfactory aversion), qui consiste à mesurer la détection olfactive des animaux en les rendant aversifs à un odorant, ils ont montré une hausse de la détection olfactive chez les animaux rassasiés ayant reçu de l'OXA en icv par rapport aux animaux rassasiés contrôles. Néanmoins les animaux à jeun détectent mieux les odeurs que les animaux rassasiés ayant reçu de l'OXA en icv. De plus une administration orale d'antagonistes des récepteurs OX1R et OX2R chez des animaux à jeun, induit une baisse du comportement de flairage pour une odeur de nourriture (Prud'homme

et al., 2009). Néanmoins la baisse de l'activité locomotrice observée dans cette étude, bien que cohérente avec les résultats d'autres études (Nakamura et al., 2000), doit nous faire considérer ces résultats avec prudence.

Au niveau de la muqueuse olfactive, Caillol et collaborateurs (Caillol et al., 2003) ont localisé OXA et OXB au niveau apical, dans les boutons dendritiques et les cils des OSNs et dans les microvillosités des cellules de soutien, ainsi qu'au niveau basal (vaisseaux sanguins et nerfs). OXB se retrouve dans les vésicules des SUS proches de la membrane, ce qui laisserait penser à un phénomène d'endocytose et/ou d'exocytose. De plus, l'expression des orexines au niveau du réticulum endoplasmique ainsi que celle de son ARNm laisserait penser qu'une synthèse locale d'orexine par la MO est possible (Caillol et al., 2003). Enfin les récepteurs OX1R et OX2R sont localisés uniquement au niveau apical de la MO (SUS et OSNs). Il a également été démontré qu'OXA et OXB activent les voies de l'adénylyl cyclase et de la phospholipase C dans les OSNs (Gorojankina et al., 2007).

- Ghréline

La ghréline est une hormone produite principalement par l'estomac et le tractus gastro-intestinal (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). Elle a une action orexigène et participe à l'initiation du repas (Cummings, 2006) ainsi qu'à la régulation de la prise alimentaire (Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001). En outre, la ghréline augmente la sensibilité olfactive chez l'humain et le rat (Tong et al., 2011), qu'elle soit injectée en systémique ou en icv (pour le rat). De plus, dans une étude récente, Loch et collaborateurs ont prouvé que le gène du récepteur à la ghréline *ghsr1a* est exprimé dans la MO et plus précisément dans les OSNs. Par ailleurs, un traitement à la ghréline augmente l'activité des OSNs, l'expression du gène d'activité précoce *Egr1* étant augmentée dans ces derniers (Loch et al., 2015).

- Endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont des dérivés lipidiques produits par clivage des phospholipides de la membrane post synaptique. Deux récepteurs aux endocannabinoïdes, CB1 et CB2, existent mais seul CB1 semble être impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (Di Marzo et al., 2001). Il a été prouvé que les endocannabinoïdes augmentent la détection d'une odeur alimentaire et la consommation de nourriture *via* l'implication de CB1 dans le bulbe olfactif (Soria-Gómez et al., 2014). Au niveau de la muqueuse olfactive, il a été démontré la présence des récepteurs CB1 et CB2 chez le rongeur. Lorsque les souris ne possèdent pas ces récepteurs, le nombre d'OSNs est diminué. Les auteurs indiquent cependant que ces récepteurs ne jouent aucun rôle dans la modulation de l'olfaction mais les résultats de leurs tests comportementaux ne sont pas concluants (Hutch et al., 2015). Chez la larve du xénope, en revanche, il a été montré que l'endocannabinoïde 2-arachidonoylglycérol (2-AG) est produit dans les OSNs et agit *via* CB1 pour diminuer le seuil de réponse des OSNs en état de jeûne (Breunig et al., 2010).

Molécules anorexigènes

- Insuline

L'insuline est une hormone produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est sécrétée dans le sang en cas d'élévation de la glycémie (Henquin, 2011). Dans l'hypothalamus elle agit comme un peptide anorexigène (Williams et al., 2011). Chez le rongeur, des instillations intranasales d'insuline entraînent une hausse des capacités de discrimination olfactive (Marks et al., 2009). En effet, on observe une augmentation du temps d'exploration des animaux pour une nouvelle odeur. Néanmoins cette conclusion est biaisée par le fait que les animaux explorent aussi plus un nouvel objet (ce qui laisse supposer une curiosité accrue ou un effet sur la mémoire à court et à long terme). Les instillations intranasales d'insuline ne semblent pas non plus affecter le seuil de détection des odorants. Il est de toute façon difficile d'étudier les capacités olfactives d'un animal avec la méthode d'instillation intranasale d'insuline en aigu. C'est pour cela que les auteurs ont utilisé un protocole d'instillations répétées ce qui rend difficile de conclure avec précision sur les effets de l'insuline sur l'olfaction.

Une autre étude a été effectuée en utilisant des injections d'insuline icv dans le ventricule latéral d'animaux à jeun afin d'imiter les effets du rassasiement (Aimé et al., 2012). Il en résulte une baisse du seuil de détection olfactive des animaux (par la méthode du COA). Les auteurs trouvent également une diminution du comportement de flairage pour une odeur de nourriture. En résumé, il semblerait bien que l'insuline diminue les capacités olfactives des animaux, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en utilisant des animaux rassasiés.

Comme pour les autres tissus périphériques, il est probable que l'insuline présente dans la muqueuse olfactive provienne principalement de la circulation générale mais selon un mécanisme encore inconnu à ce jour. En effet l'épithélium olfactif possède au niveau basal des jonctions serrées qui rendent difficile le passage de l'insuline des vaisseaux sanguins vers les cellules de l'épithélium olfactif (Hussar et al., 2002).

Cependant on retrouve de l'insuline au sein de la muqueuse olfactive. Il est possible que l'insuline puisse être produite localement car des études en qPCR ont montré l'expression de Pdx1 (un facteur de transcription de l'insuline) et de la prohormone convertase (impliquée dans la maturation de l'insuline) au sein de la muqueuse olfactive (Lacroix et al., 2008). Néanmoins cette synthèse d'insuline est très faible par rapport à l'insuline de la circulation générale (environ 1 versus 200).

Le récepteur de l'insuline est lui aussi exprimé dans la muqueuse olfactive. On le retrouve dans les OSNs au niveau des boutons dendritiques et des cils olfactifs mais également dans les cellules basales, les cellules de soutien et au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins (Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009). De façon intéressante les deux isoformes

du récepteur à l'insuline, ir-a et ir-b, sont exprimés en quantité égale dans la muqueuse alors qu'en générale seule la forme courte ir-a est exprimée dans les tissus nerveux (Lacroix et al., 2008). Traditionnellement ir-a est décrit comme ayant un rôle mitogénique et anti-apoptotique alors qu'ir-b est impliqué dans les processus de différenciation cellulaire (Sciacca, 2003). De plus, après 48h de mise à jeun chez le rat, on constate une augmentation des transcrits du récepteur à l'insuline ainsi qu'une hausse du nombre de récepteurs dans la muqueuse olfactive (Lacroix et al., 2008). Enfin des effecteurs de la voie de signalisation de l'insuline sont également exprimés dans ces cellules, notamment IRS 1 et 2 ou la PI3 kinase (Lacroix et al., 2008).

Des expériences en patch clamp ont montré que l'insuline était capable d'augmenter la fréquence de décharge spontanée des OSNs (Savigner et al., 2009). De façon surprenante l'insuline augmente l'excitabilité des OSNs mais diminue leur réponse à une stimulation olfactive. De plus l'amplitude de la réponse de la muqueuse olfactive à une odeur neutre (obtenue en EOG) est diminuée après application d'insuline (Lacroix et al., 2008; Savigner et al., 2009). L'augmentation de la fréquence de décharge spontanée des neurones et la diminution de la réponse obtenue en EOG après application d'insuline correspond donc à une diminution du ratio signal sur bruit au niveau de la muqueuse olfactive (Savigner et al., 2009). L'insuline pourrait aussi agir sur les phénomènes de mort et de régénération de l'épithélium olfactif puisqu'il a été prouvé que l'insuline a un effet anti-apoptotique sur la muqueuse olfactive (Lacroix et al., 2011).

- Leptine

La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux et sécrétée dans la circulation sanguine après un repas (Saladin et al., 1995). Grâce à des souris transgéniques ob/ob (pas de production de leptine) et db/db (récepteur non fonctionnel), Getchell et collaborateurs ont étudié l'effet de la leptine sur l'olfaction (Getchell et al., 2006). Les souris ob/ob et db/db retrouvent plus facilement de la nourriture enfouie sous la litière que les souris contrôles. De plus en injectant de la leptine en intrapéritonéal (ip) chez les souris ob/ob, le temps nécessaire à trouver la nourriture est ramené à celui des animaux contrôles. De plus il a été montré, par la méthode du COA, que la leptine injectée icv chez des animaux à jeun (afin d'imiter un état rassasié) diminue la détection olfactive (Julliard et al., 2007) ainsi que le temps d'exploration d'une odeur de nourriture (Prud'homme et al., 2009).

Au niveau de la muqueuse olfactive, deux isoformes du récepteur à la leptine sont présents, la forme longue Ob-Rb et une des formes courtes Ob-Ra. On les retrouve notamment à la surface de l'épithélium, dans les boutons dendritiques des OSNs ainsi que dans les OSNs immatures (Baly et al., 2007). Ils sont également exprimés dans les cellules de soutien et les cellules des canaux des glandes de Bowman (Getchell et al., 2006; Baly et al., 2007). Une faible production locale de leptine est également présente dans la muqueuse olfactive (Baly et al., 2007).

De même que pour l'insuline, il a été prouvé que 48h de mise à jeun chez le rat entraîne une augmentation de la transcription de la forme longue du récepteur à la leptine, Ob-Rb (Baly et al., 2007). Des expériences en patch clamp ont montré que la leptine était capable d'augmenter la fréquence de décharge spontanée des OSNs (Savigner et al., 2009). A l'instar de l'insuline, la leptine augmente l'excitabilité des OSNs et diminue leur réponse à une stimulation olfactive. De plus l'amplitude de la réponse de la muqueuse olfactive à une odeur neutre (EOG) est diminuée après application de leptine (Savigner et al., 2009). L'augmentation de la fréquence de décharge spontanée des neurones et la diminution de la réponse obtenue en EOG après application de leptine correspond donc à une diminution du ratio signal sur bruit au niveau de la muqueuse olfactive (Savigner et al., 2009).

Autres facteurs métaboliques

D'autres facteurs intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique pourraient agir sur la muqueuse olfactive. Le récepteur à l'adiponectine (orexigène), AdipoR1 est présent au sein des OSNs (Hass et al., 2008) et l'adiponectine augmente l'activité électrique de la muqueuse olfactive (Loch et al., 2013). Le peptide YY (anorexigène) est seulement présent dans les cellules de soutien. Cependant chez des souris KO YY $-/-$, le nombre d'OSNs est augmenté, ce qui laisserait penser que le peptide YY a un rôle dans la différenciation des OSNs (Doyle et al., 2012).

Enfin il est possible que le glucose lui-même puisse agir directement sur la muqueuse olfactive. Dans le système nerveux central, le glucose entre dans les cellules *via* les transporteurs au glucose de la famille des GLUT (McEwen and Reagan, 2004). Au sein de la muqueuse olfactive, il a été montré que GLUT1 et 3 sont exprimés au niveau des glandes de Bowman et des cellules de soutien. Au niveau des OSNs en revanche, seul GLUT1 est exprimé (Nunez-Parra et al., 2011). Il semblerait aussi que le transporteur au glucose sensible à l'insuline, GLUT4, soit présent dans la MO (Lacroix et al., 2015). Cependant, malgré l'expression de ces protéines, il n'est pas encore déterminé si les OSNs sont capables de détecter le glucose, comme c'est le cas pour certains neurones du bulbe olfactif (Tucker et al., 2010; Al Kaborssy et al., 2014).

c. Rôle des pathologies liées à l'alimentation

Au niveau pathologique, l'olfaction est perturbée dans de nombreuses pathologies liées au comportement alimentaire : diabète (Le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1993), obésité (Obrebowski et al., 2000; Richardson et al., 2004), anorexie (Fedoroff et al., 1995; Roessner et al., 2005; Aschenbrenner et al., 2008) ou encore boulimie (Fedoroff et al., 1995; Aschenbrenner et al., 2008; Rapps et al., 2010). Le cas particulier des liens entre le diabète de type 2 et l'olfaction sera abordé plus en détails au cours du **Chapitre 4** où je présenterai la problématique de l'étude.

Chez l'animal, plusieurs d'études ont été menées sur l'influence des pathologies liées à l'alimentation sur l'olfaction. Certains modèles animaux d'obésité et / ou de diabète, tel le rat Zucker (fa/fa), présentent une insulino-résistance du bulbe olfactif se traduisant par des changements fonctionnels de la réponse à l'insuline dans ce tissu (Baskin et al., 1985; Figlewicz et al., 1985; Aimé et al., 2014). L'insuline, appliquée directement sur le bulbe olfactif ou délivrée par voie intranasale (IND pour intranasal insulin delivery), induit un changement fonctionnel du bulbe olfactif (Fadool et al., 2000, 2004, 2011; Marks et al., 2009; Tucker et al., 2010). Cependant aucun de ces modèles ne correspond à un modèle animal de diabète exclusivement.

Au niveau de la muqueuse olfactive, l'influence à long terme d'un régime obésogène et diabétogène enrichi en graisses a été étudiée chez la souris (Thiebaud et al., 2014; Lacroix et al., 2015). Les souris soumises à ce type de régime présentaient des changements fonctionnels et anatomiques de la muqueuse olfactive, laissant penser que le régime alimentaire et / ou les pathologies liées à l'alimentation peuvent induire des modifications du système olfactif périphérique. Cependant, il est impossible de différencier les effets dus à l'obésité de ceux dus au diabète dans ces études.

Il semble donc établi que les maladies métaboliques entraînent des effets nocifs au niveau du système olfactif. Différentes études ont mis en évidence des difficultés olfactives chez des patients diabétiques (voir **Chapitre 4**). Dans le chapitre suivant, nous verrons les causes de la mise en place de cette pathologie et, en particulier, le rôle du fructose dans ce processus.

Chapitre 3 : Le fructose et ses implications dans le développement des maladies métaboliques

Le fructose est un monosaccharide retrouvé principalement dans les fruits et le miel. Ces quarante dernières années, son utilisation s'est faite plus fréquente dans le régime alimentaire humain, notamment *via* l'introduction des high fructose corn syrup (HFCS). Dans le même temps, l'augmentation des maladies métaboliques, comme le diabète par exemple, s'est considérablement amplifiée, dans les pays occidentaux d'abord, puis de façon généralisée dans le monde. De nombreuses études ont pointé du doigt le rôle de l'augmentation de la consommation de fructose dans l'épidémie de diabète actuelle (DiNicolantonio et al., 2015) mais, après plusieurs décennies de débat, la lumière est encore loin d'être faite sur un possible lien de cause à effet.

I. Le diabète

a. Définitions et symptômes

Selon le *vulgaris medical*, le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Les symptômes les plus courants sont : une soif intense, une polyurie importante, une grande fatigue, des douleurs abdominales et parfois une augmentation de la sensation de faim. Cette pathologie est connue depuis l'antiquité (description dans l'empire romain et dans la civilisation indienne il y a plus de 3000 ans).

Il est plus juste de parler des diabètes que du diabète. En effet, il existe plusieurs pathologies regroupées sous le nom de diabète. On distingue principalement le diabète de type I (ou insulino-dépendant, DT1) et le diabète de type II (ou non insulino-dépendant, DT2). Le DT1 représente environ 10% des cas de diabètes dans le monde (Cefalu, 2006) et le DT2 environ 90% (Korc, 2004). Pour le reste de ce rapport, je ne parlerai que du DT2, étant celui le plus impacté par le style de vie (dont l'alimentation) et dont la progression a le plus augmenté ces dernières années (80% d'augmentation dans le monde entre 2000 et 2013) (International Diabetes Federation, 2013). L'augmentation de la prévalence du DT2 dans le monde (8,3% en 2013) fait que l'on parle désormais d'épidémie de diabète (Chen et al., 2011; Lam and LeRoith, 2012; Kharroubi and Darwish, 2015).

b. Mécanismes de la mise en place du DT2

Le DT2 est classiquement décrit par une hyperglycémie chronique à jeun, provoquant à terme, une résistance à l'insuline puis une diminution de la synthèse et de la production d'insuline. De façon générale, le métabolisme énergétique est complètement bouleversé après l'établissement d'un DT2, en particulier le métabolisme glucidique. Au niveau hépatique, le DT2 est caractérisé par une synthèse de glycogène anormale, due à la fois à

une baisse de l'activité de la glycogène synthase et à un problème de captation du glucose par le foie. De plus l'activité de la voie de la néoglucogenèse est augmentée (Van den Berghe, 1978).

La baisse de la production de glycogène et l'augmentation de la production de glucose participent à l'hyperglycémie constatée chez les diabétiques. Cette hyperglycémie provoque une résistance à l'insuline, aussi bien chez les animaux (Rossetti et al., 1990) que chez les humains (Yki-Järvinen et al., 1987). Sans rentrer dans les détails de la mise en place de la résistance à l'insuline (Pessin and Saltiel, 2000), cela va se traduire par une augmentation de la sécrétion et de la synthèse de l'insuline par les cellules β du pancréas jusqu'à épuisement de ces dernières (Cavaghan et al., 2000). Le DT2 est alors caractérisé par une diminution de la masse des cellules β (Jackerott et al., 2006), une baisse de leur activité électrique et une baisse de la sécrétion d'insuline (Bell and Polonsky, 2001; Florez et al., 2003).

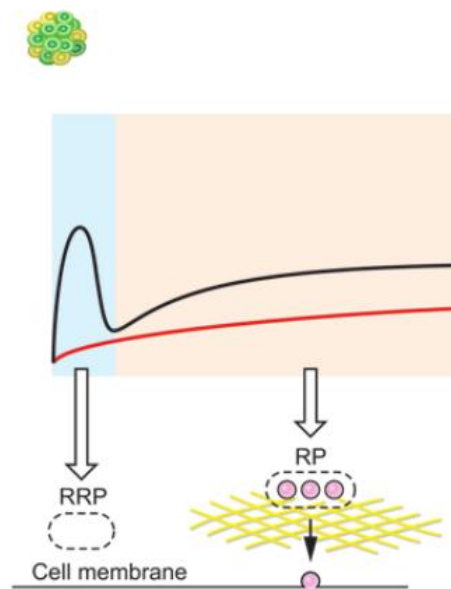


Figure 13 : Sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques chez les patients DT2. Chez les patients DT2, la première phase de libération de l'insuline par exocytose est absente et la seconde phase est diminuée. En noir : sécrétion normale, en rouge : sécrétion chez les DT2. RRP : readily releasable pool (pool d'insuline prêt à être sécrété, RP : reserve pool (pool de réserve). D'après (Seino et al., 2011).

Les concentrations sanguines de glucose et d'insuline suivent un rythme journalier chez les animaux (Jolin and Montes, 1973; Peret et al., 1973; Lesault et al., 1991) et chez les humains (Carroll and Nestel, 1973; Bolli et al., 1984; Van Cauter, 1990). Plus précisément, la sécrétion d'insuline suit des oscillations ultradiennes (de l'ordre de 1 à 2h (Polonsky et al., 1988)) ainsi que des oscillations plus rapides (10 à 15 minutes (Lang et al., 1979)). L'insuline est d'ailleurs plus efficace lorsqu'elle est libérée de manière pulsatile que de manière continue (Matthews et al., 1983). Or, les patients atteints d'un DT2 présentent une absence de rythme circadien de la sécrétion d'insuline (Van Cauter et al., 1997; Boden et al., 1999). De plus si on supprime

le rythme circadien de la libération de l'insuline, un DT2 se met en place chez l'animal (Oster et al., 1988; Velasco et al., 1988; Shimomura et al., 1990).

La sécrétion d'insuline par le pancréas en réponse au glucose se fait par un mécanisme en deux phases : une première phase rapide et transitoire suivie d'une phase plus longue (Cerasi and Luft, 1967; Curry et al., 1968; Luzi and DeFronzo, 1989). La première phase consiste en la libération par exocytose d'un pool de vésicules contenant de l'insuline prête à être sécrétée. La deuxième phase nécessite la mobilisation des granules contenant de l'insuline et dure tant que le stimulus induit par le glucose est présent (Rorsman and Renström, 2003). Or, la perte de la première phase et une seconde phase réduite est caractéristique du DT2 (Cerasi and Luft, 1967; Davis et al., 1993) (Figure 13).

Pendant la mise en place du DT2 (lors de l'hyperinsulinémie chronique), il semble probable que l'insuline puisse agir au niveau du noyau *accumbens* en inhibant la clairance de la dopamine et ainsi diminuer le plaisir ressenti en mangeant (Anderzhanova et al., 2007). De plus l'insuline inhibe la signalisation de la leptine au niveau central (Kellerer et al., 2001; Hill et al., 2008), ce qui va entraîner une hausse de la prise alimentaire.

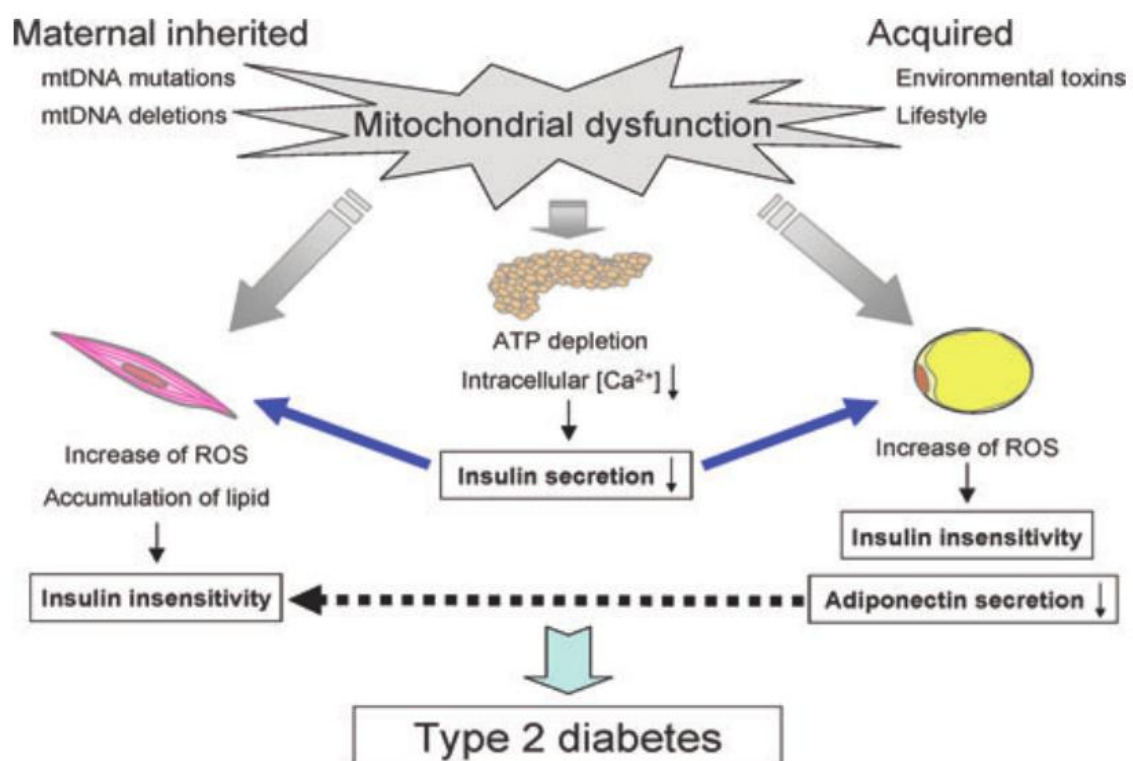


Figure 14 : Les dysfonctions mitochondriales dans la mise en place du DT2. Les dysfonctions des mitochondries présentes dans différents organes peuvent participer à la mise en place du DT2, en particulier en favorisant l'apparition d'une résistance à l'insuline généralisée. D'après (Wang et al., 2010).

Parmi les causes de l'établissement du DT2, le style de vie a énormément d'influence. En effet, on estime que l'évolution du régime alimentaire humain (contenant plus de gras et de

sucres), associé à une diminution de l'activité physique sont parmi les causes majeures de la mise en place du DT2 (International Diabetes Federation, 2013). En effet, 80% des patients DT2 sont obèses et 25 à 30% des obèses vont développer un DT2 (Vaag and Lund, 2007). Néanmoins les facteurs génétiques et épigénétiques ne sont pas à négliger pour autant (Bernard et al., 2013). De plus, des dysfonctionnements mitochondriaux sont aussi impliqués dans le phénomène de résistance à l'insuline (Martínez, 2006) (Figure 14), notamment au niveau du tissu adipeux (Choo et al., 2006). La hausse de la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) par les mitochondries est aussi responsable de la diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Kawahito et al., 2009) (Figure 15). Enfin, la hausse de la production des acides gras (AG) par le foie, et la hausse résultante du taux de triglycérides (TG) dans le sang, sont également parmi les premiers facteurs de la mise en place du DT2 (pour un schéma récapitulatif : Figure 16).

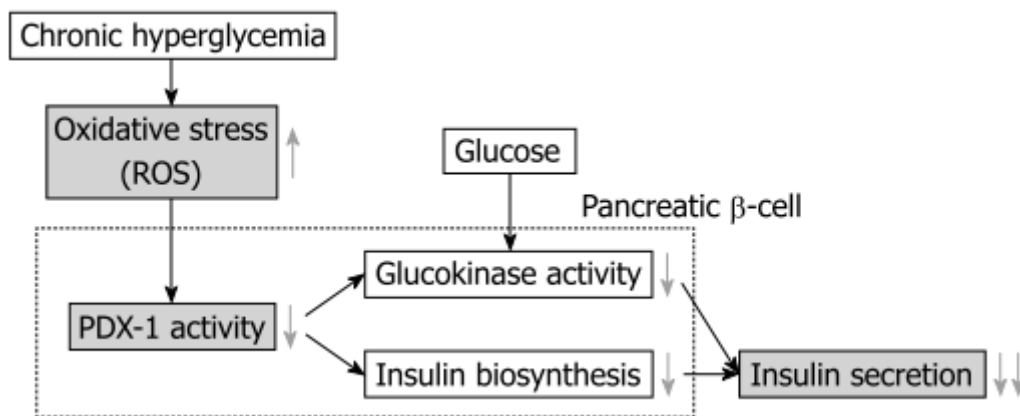


Figure 15 : Rôle des ROS dans la mise en place du DT2. La hausse de la production de ROS va agir sur la cellule β pancréatique afin de diminuer la synthèse et la sécrétion d'insuline. D'après (Kawahito et al., 2009).

c. Complications dues au diabète

A mesure de la progression du DT2, de nombreuses complications peuvent apparaître. En effet, le DT2 est souvent accompagné d'hypertension, de dyslipidémie, d'obésité et / ou de maladies cardiovasculaires (Després and Lemieux, 2006). On parle alors plus volontiers de syndrome métabolique (MetS). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le MetS est caractérisé par un DT2, une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose ou une résistance à l'insuline ainsi qu'au moins deux des pathologies suivantes : hypertension, hyperlipidémie, obésité, microalbuminurie (Bruce and Byrne, 2009).

Les maladies rénales et / ou hépatiques sont aussi fortement associées au DT2. La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD pour non-alcoholic fatty liver disease) est l'une des complications les plus courantes (Angulo, 2002; Clark and Diehl, 2002). D'ailleurs une étude a prouvé que les patients DT2 ayant développé un NAFLD étaient plus insulino-résistants que les patients DT2 chez qui cette pathologie n'était pas présente (Kelley et al., 2003).

Enfin les complications les plus connues (car les plus courantes et les plus sévères) sont les complications vasculaires. Elles se divisent en deux groupes : les complications macro et micro-vasculaires (Forbes and Cooper, 2013). Les complications macro-vasculaires touchent principalement les artères. Elles sont la cause des maladies cardiovasculaires, de l'infarctus du myocarde ou des attaques. Les complications macro-vasculaires sont d'ailleurs la première cause de décès chez les patients DT2, où elles sont 2 à 8 fois plus fréquentes que dans la population générale (Kannel and McGee, 1979; Cefalu, 2006). Les complications micro-vasculaires touchent les petits vaisseaux sanguins et provoquent des pathologies telles que la rétinopathie diabétique ou les neuropathies diabétiques. Les conséquences de ces pathologies peuvent être très sérieuses (cécité, amputation). De plus 40 à 50% des patients atteints de neuropathie diabétique éprouvent des douleurs chroniques (Obrosova, 2009).

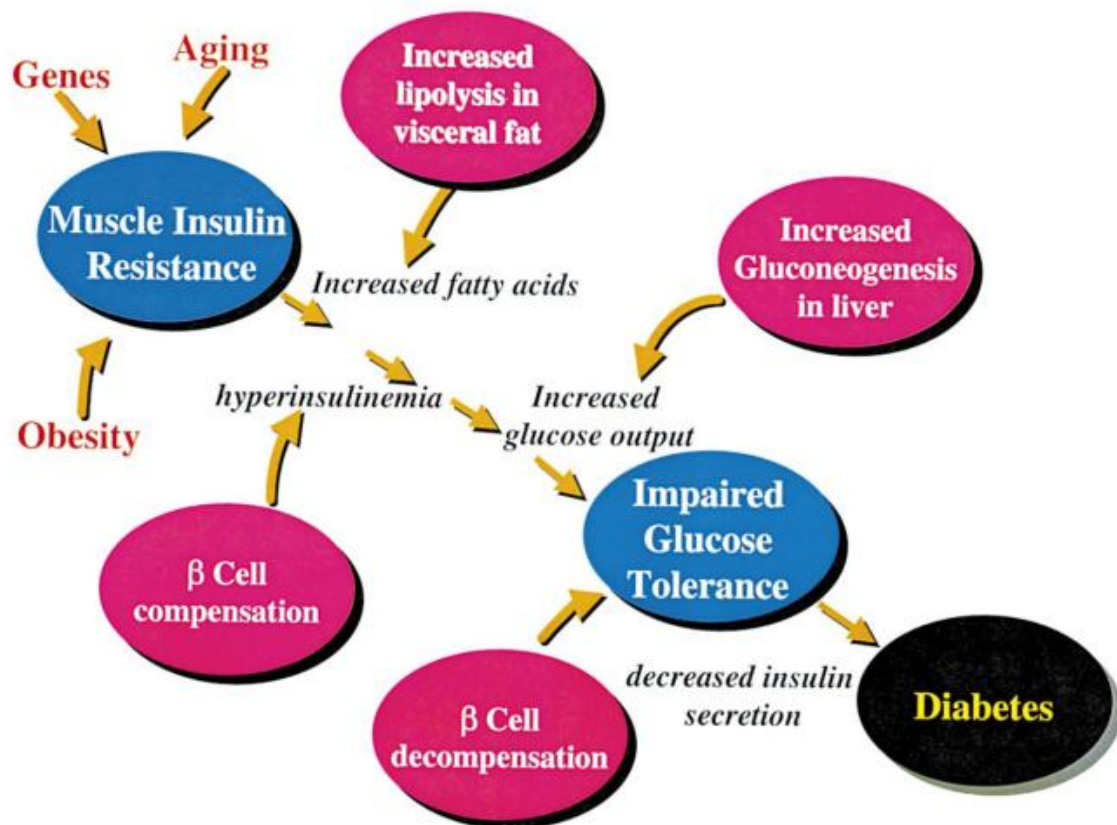


Figure 16 : Schéma général de la possible mise en place du DT2. Les facteurs endogènes et exogènes provoquent la mise en place d'une résistance à l'insuline au niveau du muscle, ce qui conduit à l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques jusqu'à leur épuisement, établissant ainsi un DT2. D'après (Saltiel, 2001).

d. Modèles animaux pour l'étude du DT2

Il existe de très nombreux modèles animaux pour l'étude du DT2 chez le rongeur. Cela va des cas de diabète spontané aux manipulations génétiques, en passant par des inductions

chirurgicales, chimiques ou encore en modifiant le régime alimentaire des animaux (Rees and Alcolado, 2005; Cefalu, 2006; Chatzigeorgiou et al., 2009; Panchal and Brown, 2011; Islam, 2013). Il existe d'ailleurs de nombreux outils diagnostiques du DT2 chez le rongeur (McMurray and Cox, 2011).

Parmi les modèles d'étude du DT2, la souris C57Bl/6J (issue de chez Jackson laboratory) présente une intolérance au glucose, indépendante de l'obésité (Kaku et al., 1988; Kooptiwut et al., 2002; Fergusson et al., 2014). Cette souche possède une insulínémie normale à jeun mais, durant la phase postprandiale, la sécrétion de l'insuline par le pancréas est diminuée (Kaku et al., 1988; Kayo et al., 2000). De plus la glycémie et l'insulínémie sont peu corrélées chez cette souche (Surwit et al., 1991; Stoehr et al., 2000; Burcelin et al., 2002) qui a été particulièrement utilisée pour étudier le DT2 après induction par un régime riche en graisses (Burcelin et al., 2002; Toye et al., 2005). En revanche, les études réalisées sur cette souche après induction du DT2 par un régime riche en fructose, une autre modification du régime alimentaire des rongeurs bien connue pour induire un DT2, sont moins concluantes (voir **partie III** de ce chapitre).

II. Le fructose

a. Les sources de fructose

Le fructose est un sucre que l'on trouve principalement sous deux formes dans l'alimentation humaine : sous forme de monosaccharide dans les fruits ou le miel ou sous forme de disaccharide que l'on appelle le sucrose (le fructose étant alors lié à une molécule de glucose) et qui est très présent dans l'alimentation humaine (Figure 17).

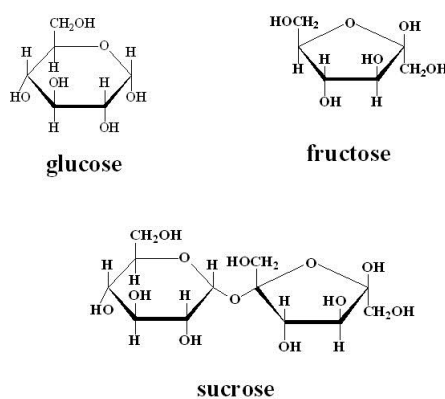


Figure 17 : Schéma d'une molécule de fructose libre ou liée au glucose sous forme de sucrose.

Le fructose est aussi retrouvé sous forme de monosaccharide au sein des sirops de maïs enrichis en fructose (HFCS). Ces derniers ont été introduits à la fin des années 60 aux USA et depuis leur consommation n'a fait qu'augmenter (voir **partie II.b**). En effet, le fructose présente de nombreux avantages pour l'industrie agroalimentaire par rapport au glucose ou au sucrose. Le premier d'entre eux est le prix des HFCS par rapport à celui du sucrose. Avant

l'introduction des HFCS, le fructose ne pouvait s'obtenir que par extraction, ce qui en faisait un produit très coûteux. Cependant, le fructose des HFCS s'obtient par isomérisation du glucose obtenu après hydrolyse de l'amidon du maïs. Le fructose ainsi obtenu est ensuite purifié et mélangé à du glucose avec des proportions variées (Bhosale et al., 1996). On retrouve jusqu'à 90% de fructose dans les HFCS mais la proportion la plus largement utilisée est un ratio de 55% de fructose pour 45% de glucose (Guzmán-Maldonado and Paredes-López, 1995). Or le sucrose est produit dans des régions équatoriales et son prix est soumis à de nombreuses fluctuations alors que les USA sont les premiers producteurs de maïs. La production de fructose *via* les HFCS est donc beaucoup plus économique et son prix plus stable que celui du sucrose (White, 2008).

Le fructose a d'autres avantages pour l'industrie agroalimentaire. Premièrement, il est plus soluble que le glucose et forme moins de cristaux à la cuisson, ce qui fait qu'il est très utile dans l'élaboration des sucreries et des pâtisseries industrielles (Hallfrisch, 1990). De plus, le sucrose s'hydrolyse en milieu acide et a besoin d'être solubilisé avant usage. Les HFCS sont stables en milieu acide et n'ont besoin que d'être dilués, ce qui en fait un excellent produit pour l'élaboration des boissons sucrées. De plus, le fait que les HFCS soient sous forme de sirop est également un avantage non négligeable pour le stockage de ce produit (White, 2008). Enfin le fructose est un sucre qui nous paraît très sucré. A titre de comparaison, si on fixe le pouvoir sucrant du sucrose à 100, alors le glucose se situe à 74 et le fructose à 173 (Krause and Mahan, 1984). Pour toutes ces raisons, l'utilisation des HFCS est devenue de plus en plus fréquente dans l'industrie agroalimentaire et, par voie de conséquence, au sein du régime alimentaire humain. En effet, les sucres ajoutés représentaient 16% des calories totales aux USA en 1996 (Nielsen et al., 2002) et les HFCS représentaient 40% de ces sucres ajoutés (Bray et al., 2004).

Enfin, il est à signaler que le fructose est produit naturellement en petite quantité par le corps humain. On retrouve une production endogène de fructose dans le cristallin, les vésicules séminales et le placenta. Il peut également être produit à partir du glucose par la voie du sorbitol (Mayes, 1993).

b. Evolution de la consommation du fructose

Les HFCS ont été introduits aux USA en 1967 et une rapide hausse de leur consommation s'est effectuée pendant les 20 premières années (Hallfrisch, 1990). La consommation des HFCS est ainsi passée de 200g par an et par habitant en 1970 à 23,3kg par an et par habitant en 1997. Dans le même temps la consommation de sucrose a diminué, passant de 38kg à 25kg (Elliott et al., 2002). Ramenée au taux de fructose présent dans ces composés, la consommation de fructose est donc passée de 64g/j/hab en 1970 à 81g/j/hab en 1997, soit une augmentation de 26%. En revanche si on considère la consommation de fructose uniquement sous forme de monosaccharide alors la consommation est passée de 0,5g/j/hab

à 40g/j/hab. La tendance s'est poursuivie par la suite, la consommation de fructose augmentant encore de 16% entre 1986 et 2007 (Tappy and Lê, 2010).

Enfin il est à signaler que ces chiffres, s'ils peuvent être surestimés, car basés sur la disparition du fructose *per capita*, sont peut-être sous-estimés car ils sont basés sur l'estimation que le ratio fructose / glucose des HFCS est de 55 / 45. Or, une étude a mis en évidence qu'il y a plus de fructose dans les boissons sucrées que ce que l'on pense, trouvant des quantités de fructose allant jusqu'à 70% au lieu de 55% (Ventura et al., 2011).

Malheureusement, il est difficile d'estimer la consommation mondiale de fructose et tous ces chiffres représentent la consommation des USA uniquement. Cependant les USA ne sont pas les seuls producteurs de HFCS. Ces derniers sont également produits en grande quantité au Japon, au Canada, en Corée du Sud, en Chine ou encore en Argentine (Vuilleumier, 1993).

c. Devenir du fructose après ingestion : métabolisme intestinal

Comme dit précédemment, le fructose peut être ingéré sous deux formes : sous forme pure ou sous forme de sucrose. Même si une enzyme clivant le sucrose en glucose + fructose est présente dans les entérocytes, la sucrase (Rosenweig and Herman, 1969), le fructose ne sera pas absorbé de la même manière s'il est, ou non, accompagné de glucose. Chez le rongeur, le fructose est absorbé par l'intestin par transport passif et par diffusion facilitée, grâce aux transporteurs GLUT5 au niveau de la lumière des entérocytes et GLUT2 au niveau basolatéral (Skoog and Bharucha, 2004). L'absorption du fructose est plus importante dans le jéjunum que dans l'iléon. Si le fructose est absorbé avec du glucose, alors le transport du fructose par l'intestin est augmenté (Hallfrisch, 1990). En effet, le fructose est moins facilement absorbé sous forme libre que sous forme de sucrose. De même, il a été prouvé qu'un régime enrichi en fructose allait modifier l'absorption intestinale du glucose (Tobin et al., 2008).

On estime que 80 à 90% du fructose ingéré est absorbé par l'intestin (Cook, 1969). Néanmoins, l'absorption intestinale du fructose est incomplète chez la plupart des individus (80% des sujets sains après un bolus de 50g de fructose (Skoog and Bharucha, 2004)). Lorsqu'il est non absorbé, le fructose induit des problèmes de transit et des crampes intestinales.

Si la majorité du fructose absorbé passe dans la circulation sanguine et est ensuite métabolisée par le foie, une faible partie (moins de 10%) est métabolisée directement dans les entérocytes (Van den Berghe, 1986). Le fructose métabolisé dans les intestins donne principalement du lactate et du glucose (Tappy and Lê, 2010). Néanmoins, la majeure partie du fructose traverse intacte les entérocytes et parvient alors au foie par la veine porte, où il va être métabolisé (Figure 18).

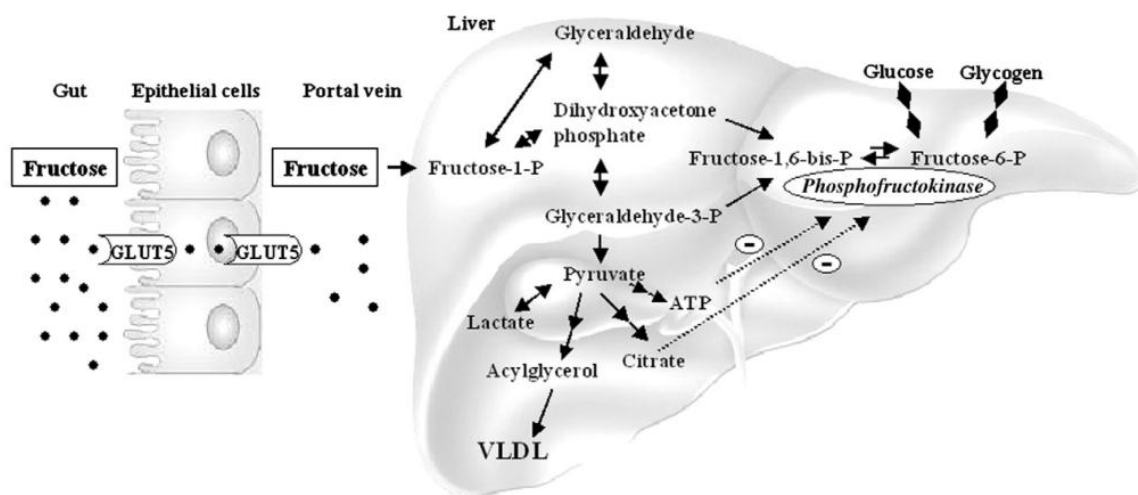


Figure 18 : Absorption intestinale du fructose et devenir du fructose après métabolisation par le foie. Le fructose arrive au foie par la veine porte, après passage par les entérocytes. Là, il va être transformé en glucose, en glycogène, en lactate, en AG ou produire de l'énergie. D'après (Spruss and Bergheim, 2009).

d. Devenir du fructose après absorption : métabolisme hépatique

Le foie est un excellent capteur de fructose. Près de 90% du fructose absorbé pénètre dans le foie où il est ensuite métabolisé (Mayes, 1993). A titre de comparaison, seul 20 à 30% du glucose absorbé est capté par le foie (DeFronzo et al., 1978; Pagliassotti and Cherrington, 1992). Le fructose rentre dans les hépatocytes par l'intermédiaire de GLUT2 et subit ensuite de nombreuses modifications (Hallfrisch, 1990; Mayes, 1993) (Figure 19). La première étape du métabolisme du fructose est sa phosphorylation. Cette dernière peut se faire par l'intermédiaire de deux enzymes : l'hexokinase, ubiquitaire, qui va phosphoryler le fructose sur le carbone 6 (F-6P) et la fructokinase, spécifique du foie, qui va phosphoryler le fructose sur le carbone 1 (F-1P). La fructokinase a une très forte affinité pour le fructose. Au niveau du foie c'est donc par elle que le catabolisme du fructose va passer.

Le F1P est ensuite clivé en dihydroxyacétone phosphate (DHP) et en glycéraldéhyde par la F-1P aldolase. Si cette enzyme est absente, alors on parle d'intolérance au fructose, ce qui peut se traduire par un retard de croissance et des dommages au foie pouvant être létaux. Lorsque la consommation de fructose est importante, l'activité de la F-1P aldolase est augmentée.

Les deux oses formés vont ensuite suivre différentes voies. Le DHP peut être isomérisé en glycéraldéhyde phosphate, lequel va ensuite entrer dans la voie de la glycolyse pour donner du pyruvate. Ce pyruvate peut ensuite donner du lactate ou entrer dans le cycle de Krebs pour donner de l'ATP ou participer à la biosynthèse des acides gras (AG). Le DHP peut aussi être réduit en glycérol triphosphate (G-3P), lequel va rejoindre la voie de biosynthèse des AG. Enfin le DHP et le G-3P, sous l'action de l'aldolase, vont donner du fructose 1,6-

[illegible]

Le glycéraldéhyde peut être phosphorylé par la triokinase pour donner du glycéraldéhyde phosphate, lequel peut ensuite rentrer dans les voies de la glycolyse ou de la néoglucogenèse. Enfin le glycéraldéhyde, sous l'action de l'alcool déshydrogénase ou de l'aldose reductase, peut donner du glycérate, qui va rejoindre la voie de la glycolyse, ou du glycérol, qui va rejoindre la voie de la biosynthèse des AG.

produits en quantités égales. Après un bolus de fructose en état de jeûne, le fructose va être transformé en : 66% de glucose, 25% de lactate, 8% de glycogène, 1% d'AG et autres. Ces chiffres sont à peu près les mêmes dans plusieurs études réalisées chez l'animal (Exton and Park, 1967; Sestoft and Fleron, 1974) et chez l'humain (Björkman and Felig, 1982).

Le métabolisme du glycogène est régulé par deux enzymes clés : la glycogène synthase (pour produire du glycogène) et la glycogène phosphorylase (pour dégrader le glycogène) (Mayes, 1993). Or le fructose va activer la glycogène synthase et inhiber la glycogène phosphorylase (Thurston et al., 1974; Whitton and Hems, 1975). Comment expliquer alors la faible production de glycogène après un bolus de fructose ? Il se trouve que le fructose a besoin d'être ingéré avec du glucose pour avoir un effet glycogénique (Topping and Mayes, 1976). Seul, le fructose ne va donner que peu de glycogène.

Nous avons vu précédemment que le fructose va également donner du lactate. Or, il a été prouvé que c'est uniquement en état de satiété que le fructose va être transformé préférentiellement en lactate (Macdonald and Turner, 1968). Concernant la faible production en AG, celle-ci est suffisante pour provoquer une augmentation des TG dans le sang. D'ailleurs un régime riche en fructose induit une plus forte augmentation de la triglycéridémie que les autres glucides (Reiser, 1985). Signalons également que la phosphorylation du fructose par la fructokinase est un mécanisme utilisant de l'ATP, ce qui va augmenter le niveau d'AMP et ainsi la synthèse de l'acide urique (Reiser, 1985).

Néanmoins le produit le plus abondamment donné par le métabolisme du fructose reste le glucose. A cela, il y a plusieurs explications. Le métabolisme du glucose est un processus hautement régulé, en particulier par l'action de plusieurs enzymes clés de la glycolyse. La phosphofructokinase est l'étape régulatrice par excellence, or elle est complètement contournée par l'ingestion de fructose (Underwood and Newsholme, 1965). Néanmoins, une forte absorption de fructose devrait augmenter la concentration en F1,6-2P et activer la voie de la glycolyse. L'activation de la néoglucogenèse, au détriment de la glycolyse, est due à une autre molécule : le fructose 2,6-biphosphate (F2,6-2P). La concentration de ce dernier est élevée après un repas, car il est produit à partir du F-6P, lui-même produit à partir du glucose dans la voie de la glycolyse. Or le F2,6-2P va activer la phosphofructokinase (et donc la glycolyse (Underwood and Newsholme, 1965)) et inhiber la fructose 1,6-bisphosphatase (et donc la néoglucogenèse (Hers and Van Schaftingen, 1982)). Lors de la consommation de fructose, le F2,6-2P n'est pas produit, ce qui fait qu'il n'y a pas d'inhibition de la néoglucogenèse par le fructose, et donc production de glucose.

En résumé, un repas riche en fructose va donner principalement du glucose et secondairement du lactate même si la faible production en AG n'est pas à dédaigner aux vues de ses implications pour la santé.

e. Utilisation du fructose par d'autres organes

Comme cela a été mentionné plus haut, le foie possède un très fort taux d'absorption du fructose. Il n'est donc pas surprenant que l'on retrouve peu de fructose dans le sang (Macdonald and Turner, 1968; Crossley and Macdonald, 1970; Topping and Mayes, 1971). Le transporteur du fructose GLUT5 est présent dans le rein et dans le tissu adipeux, même si on ignore l'utilisation qui peut en être faite par ces tissus (Corpe et al., 2002; Litherland et al., 2004). GLUT5 est également exprimé dans les cellules β pancréatiques mais faiblement (Sato et al., 1996). La sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation de fructose est donc de faible importance (Grant et al., 1980; Curry, 1989). De même GLUT5 est présent dans le cerveau, au niveau des cellules microgliales et de la barrière hémato-encéphalique, mais il est absent dans les neurones (Mantych et al., 1993; Payne et al., 1997). L'hexokinase du cerveau a d'ailleurs 20 fois moins d'affinité pour le fructose que pour le glucose (Hallfrisch, 1990).

En conclusion, le fructose est donc principalement métabolisé par le foie et donne en majeure partie du glucose, sécrété dans la circulation sanguine. Néanmoins, l'ingestion de fructose à long terme va avoir des effets délétères sur l'organisme et est notamment suspectée de provoquer des pathologies telles que le DT2.

III. Le fructose et le diabète

a. Implication du fructose dans le diabète et les pathologies liées

Historiquement, le fructose est un sucre conseillé aux diabétiques. En effet, il est reporté dès 1874 que le fructose est mieux toléré que le sucrose ou le glucose par les diabétiques (Hallfrisch, 1990). Le fructose induit une hausse de la glycémie moins forte que le glucose (Koivisto, 1978; Olefsky and Crapo, 1980; Bantle, 1989; Henry et al., 1991). De même, la hausse de l'insulinémie induite par le fructose est moins importante qu'avec du glucose (Lamar, 1959; Bruckdorfer and Yudkin, 1975; Crapo and Kolterman, 1984; Henry et al., 1991). Pour ces raisons, le fructose a longtemps été conseillé comme sucre de remplacement pour les patients diabétiques.

Néanmoins, les effets à long terme du fructose peuvent être délétères. Ainsi les régimes riches en fructose (HFruD) sont suspectés d'induire de l'hypertension, une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose, une obésité et une dyslipidémie. De façon plus générale la consommation excessive de fructose semble être l'une des causes de l'établissement du MetS (Bray et al., 2004; Bray, 2008; Tran et al., 2009; Tappy and Lê, 2010; Tappy et al., 2010).

Les premières études ont été réalisées avec des régimes enrichis en sucrose. Ainsi un régime riche en sucrose induit une intolérance au glucose, à la fois chez l'animal (Uram et al., 1958)

et chez l'humain (Cohen et al., 1966) ainsi qu'une hyperinsulinémie (Bruckdorfer and Yudkin, 1975; Reaven et al., 1979; Sleder et al., 1980).

Chez le rat, il a été démontré que les HFruD induisaient une résistance à l'insuline (Hallfrisch, 1990) ainsi qu'une hyperlipidémie (Storlien et al., 1993; Okazaki et al., 1994; Inoue et al., 1995) et une hypertension (Verma et al., 1994; Dai and McNeill, 1995; Erlich and Rosenthal, 1995; Suzuki et al., 1997). Les mécanismes de la mise en place de l'hypertension chez des rats nourris avec un HFruD ont été résumés par Tran en 2009 (Tran et al., 2009).

Ainsi, des rats nourris avec un HFruD ont une triglycéridémie plus élevée qu'avec une quantité égale de glucose (Verschoor et al., 1985). De façon générale, on observe une hausse de la concentration plasmatique des TG après un régime HFruD comparé à d'autres régimes enrichis avec d'autres glucides, ce qui représente un risque important pour le développement des maladies cardiovasculaires (Carlson and Böttiger, 1972). En revanche, l'augmentation du cholestérol ne se retrouve pas dans toutes les études (Klevay, 1975; Reiser et al., 1985; Failla et al., 1988).

Les HFruD vont également induire d'autres pathologies associées au MetS : NAFLD (Tuovinen and Bender, 1975), maladies rénales (Johnson et al., 2010) ou encore DT2 (Cohen et al., 1977). Il a également été montré que l'augmentation de l'acide urique produit par la consommation de fructose était un facteur de risque pour le développement du DT2 (Dehghan et al., 2008).

Bray a été le premier à dénoncer l'implication du fructose, et particulièrement des HFCS, dans l'épidémie d'obésité actuelle (Bray et al., 2004). Par la suite, beaucoup d'études ont critiqué cette affirmation en se basant sur le fait que les proportions en fructose des HFCS ne sont pas différentes de celles du sucrose (White, 2008, 2013; Rippe, 2013; Rippe and Angelopoulos, 2013). Ils dénonçaient également le fait que les doses de fructose employées dans les études animales étaient bien supérieures à celles retrouvées dans l'alimentation humaine.

Cependant d'autres études ont démontré qu'il était prématuré d'exclure tout lien de cause à effet entre l'utilisation des HFCS et le développement des maladies métaboliques. En effet, un régime contenant 15% de fructose pendant 15 mois (soit des doses proches de ce qu'il est observé dans l'alimentation humaine) est suffisant pour induire une hyperinsulinémie chez le rat (Blakely et al., 1981). Il a aussi été prouvé que les effets à long terme du sucrose étaient dus principalement au fructose (Vrána and Fábry, 1983) et qu'il ne semblait pas y avoir de différence entre les effets du fructose sous forme libre ou lié au glucose (Tappy et al., 2010). De plus, il est possible que les effets du fructose présent dans les fruits et le miel soient différents de ceux du fructose contenu dans les HFCS ou le sucrose, grâce à la présence d'antioxydants et de fibres dans ces produits (Busserolles et al., 2003; Montonen et al., 2007).

Chez l'humain, il a été démontré que la consommation de fructose et de glucose dans les boissons sucrées était associée à un risque de développer un DT2 (Montonen et al., 2007). Une étude sur 8 ans a également prouvé que les femmes qui consommaient le plus de boissons sucrées étaient plus susceptibles de développer un DT2 (Schulze et al., 2004). De plus, la consommation de boissons sucrées est également associée à une hyperinsulinémie (Yoshida et al., 2007). Enfin, une étude récente a démontré que la prévalence du diabète était plus importante dans les pays où la disponibilité des HFCS était la plus forte (Goran et al., 2013).

Cependant certaines revues arrivent à la conclusion inverse, selon laquelle la consommation des HFCS n'est pas associée à l'obésité, au diabète ou au MetS (White, 2008, 2013; Rippe, 2013; Rippe and Angelopoulos, 2013). Néanmoins, ces revues citent principalement des études portant sur une faible durée de consommation de fructose. Il est également à signaler que dans toutes les revues arrivant à cette conclusion, les auteurs ont reçu des financements de la part de l'industrie agroalimentaire.

En conclusion, il semble donc que la consommation de fructose à long terme soit associée au développement d'un certain nombre de maladies métaboliques. Comment expliquer que le fructose puisse avoir de tels effets délétères sur l'organisme ?

b. Mécanismes de la mise en place des maladies métaboliques après consommation de fructose à long terme

Il est assez évident de voir que l'importante production de glucose par le foie après l'ingestion de fructose va avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. En effet, l'hyperglycémie résultante de la consommation de fructose va obliger le pancréas à sécréter plus d'insuline, ce qui constitue l'une des premières étapes de la mise en place du DT2.

De plus, plusieurs adaptations enzymatiques vont avoir lieu après une surconsommation à long terme de fructose. Tout d'abord, le fructose va induire une baisse de la synthèse de glycogène à partir du glucose (Vrána et al., 1978b) alors que la synthèse de glycogène résultant du fructose va être augmentée (Freedland and Harper, 1957). De façon générale, le fructose va diminuer la capacité du foie à métaboliser le glucose (Bender and Thadani, 1970; Tuovinen and Bender, 1975). Ce phénomène va également se produire dans le muscle (Vrána et al., 1978a) et le tissu adipeux (Bender and Thadani, 1970; Vrána et al., 1974).

Au niveau hépatique, le fructose provoque une hausse de l'activité de la fructokinase (Heinz, 1973) et diminue l'activité de l'hexokinase, de la pyruvate kinase et de la fatty acid kinase alors que, au contraire, la surconsommation de glucose à long terme induit une hausse de l'activité de ces enzymes (Vrána and Fábry, 1983). Le fructose va également stimuler la voie de biosynthèse des AG par le foie alors que celle-ci va être diminuée dans le tissu adipeux (Naismith, 1971; Bruckdorfer et al., 1972; Moser and Berdanier, 1974; Waterman et al., 1975; Winder et al., 1975; Sturton et al., 1978). Cela explique pourquoi on assiste à une

hausse des TG dans le sang alors que le HFruD n'est pas considéré comme un régime obésogène.

Le fructose va aussi diminuer la sensibilité du foie et des tissus périphériques à l'insuline (Tappy et al., 2010). Cela est dû à l'augmentation de la synthèse des AG par le foie (Stanhope and Havel, 2008). En effet celle-ci va produire du diacylglycérol (DAG) qui va activer la protéine kinase C (PKC) laquelle va phosphoryler le récepteur à l'insuline. Cela va inhiber la signalisation de l'insuline, ce qui va diminuer la sensibilité du foie à l'insuline. Le foie va alors produire plus de VLDL (very low density protein), augmentant ainsi le taux de TG dans le sang, et plus de glucose, ce qui va stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas et participer à la mise en place d'une insulino-résistance généralisée dans l'organisme (Stanhope and Havel, 2009).

Une surconsommation à long terme de fructose va induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives aux carbonyles (RCS), ce qui va avoir des effets délétères sur l'organisme (Semchyshyn, 2013).

Enfin, l'augmentation de la synthèse d'acide urique va inhiber l'eNOS, l'enzyme responsable de la production du monoxyde d'azote (NO). Or l'utilisation de glucose par les muscles en réponse à l'insuline est possible grâce à la hausse du débit sanguin au niveau des muscles squelettiques, processus contrôlé par le NO produit par l'activation de l'eNOS par l'insuline (Steinberg et al., 1994). L'inhibition de l'eNOS provoquée par l'augmentation de l'acide urique après une surconsommation de fructose va donc diminuer la vasodilatation des vaisseaux sanguins desservant les muscles squelettiques, ce qui va participer à la mise en place de l'insulino-résistance de ces derniers. D'ailleurs, si on diminue la concentration en acide urique dans le sang grâce à un agent uricosurique chez des rats HFruD, ces derniers ne développent pas de résistance à l'insuline (Nakagawa et al., 2006).

En conclusion, la surconsommation de fructose induit des effets délétères dans l'organisme entier et notamment l'apparition d'une hyperglycémie et d'une résistance à l'insuline caractéristiques du DT2.

c. Cas particulier des HFruD chez la souris C57Bl/6

Si l'utilisation des HFruD pour induire un DT2 chez le rat est bien documentée (Cohen et al., 1977; Panchal and Brown, 2011), les choses semblent être plus compliquées chez la souris. Il existe de nombreuses souches de souris de laboratoire, certaines étant consanguines afin de diminuer la variabilité génétique des animaux. Or, une étude, réalisée par Nagata et collaborateurs (Nagata et al., 2004), a testé l'effet d'un HFruD (66% de fructose) pendant 8 semaines sur différentes souches de souris mâles âgées de 5 semaines. Une partie des souris était mise à jeun 14h avant les expériences et l'autre non. Il en résultait une hyperinsulinémie à jeun et / ou postprandiale, une hyperglycémie à jeun, une hypertriglycéridémie et une accumulation de graisse viscérale chez certaines souches mais

pas chez la C57Bl/6J. Les résultats étaient très différents d'une souche de souris à une autre. Pour les mesures faites à jeun, la nourriture des animaux était retirée la veille. De plus, les animaux étaient anesthésiés avant récolte du plasma, bien que la méthode d'anesthésie ne soit pas précisée.

Cette étude m'a incité à faire une bibliographie plus poussée de l'utilisation de HFruD sous forme solide (et non rajouté dans l'eau de boisson) chez la souris C57Bl/6. Avant de présenter les différents articles et leurs résultats, il faut préciser plusieurs points qui ont rendu difficile l'interprétation des résultats.

Premièrement, les auteurs se contentent la plupart du temps de dire que les souris sont des C57Bl/6 sans préciser de quel laboratoire elles sont issues. Or, comme nous l'avons vu dans la **partie I.d.** de ce chapitre, seules les souris issues de chez Jackson Laboratory présentent une intolérance au glucose, une sécrétion d'insuline postprandiale anormale et une susceptibilité accrue de développer un DT2. Ensuite, les compositions des HFruD varient sensiblement d'une étude à l'autre ainsi que l'âge des souris et la durée du régime. Afin d'éviter d'introduire un biais supplémentaire, je n'ai inclus que les études faites sur des mâles.

Une autre précision rarement donnée dans ces études est la période de la journée à laquelle sont réalisés les prélèvements sanguins. La durée de la mise à jeun des souris avant le prélèvement est également très variable. Or, chez les rongeurs, pendant le jeûne, on constate une baisse de l'insulinémie et une inversion du rythme jour / nuit (l'insulinémie devenant plus élevée pendant la période diurne (La Fleur et al., 1999)). Il est possible que la baisse de l'insulinémie pendant la nuit soit due à une hausse de l'activité locomotrice, qui est connue pour être augmentée durant le jeûne (Sclafani and Rendel, 1978). En effet, la hausse de l'activité locomotrice (expliquée par une intense recherche de nourriture) va augmenter le relargage de la noradrénaline par le système nerveux sympathique, ce qui va diminuer la sécrétion d'insuline par le pancréas (Scheurink et al., 1989).

Enfin, j'ai précisé, lorsqu'il était connu, le type d'anesthésie. Une augmentation de la glycémie intervient toujours peu de temps après anesthésie, seulement il n'est jamais précisé dans les articles si les auteurs attendent que la glycémie retombe à un niveau basal avant de prélever le sang des animaux. De plus le type d'anesthésie a également son importance. Il est conseillé d'utiliser du pentobarbital car celui-ci n'augmente pas la glycémie de façon significative par rapport aux autres anesthésiants chez le rat wistar (Guarino et al., 2013). Néanmoins certaines études sont en désaccord avec ce résultat et trouvent une augmentation, à la fois de la glycémie et de l'insulinémie chez le rat wistar (Vera et al., 2002). Pour la C57Bl/6, une étude a mis en évidence une hausse de la glycémie après anesthésie avec un mélange kétamine + xylazine ainsi qu'avec l'isoflurane, alors que le pentobarbital n'avait pas d'effet (Zuurbier et al., 2014). Dans tous les cas, il est préférable de ne pas anesthésier les souris avant de collecter le plasma.

Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **Table 1**.

Article	souche	âge au début de la mise sous régime	Proportion de fructose dans le régime	Durée du régime	anesthésie	Durée de mise à jeun	poids	Prise alimentaire	glycémie	insulinémie	triglycéridémie	Intolérance au glucose	Résistance à l'insuline
Farah, 2006	C57Bl\6	NA	66%	10 semaines	non	NA	Pas d'effet	NA	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	Oui (ipGTT)	NA
Chess, 2008	C57Bl\6J	NA	61%	8 semaines	isoflurane	Pas de mise à jeun	baisse	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	NA	NA
Mellor, 2010	C57Bl\6J	4 à 5 semaines	60%	6 semaines	pentobarbital	12h	baisse	Pas d'effet	baisse	Pas d'effet	NA	NA	NA
Mellor, 2011	C57Bl\6J	4 à 5 semaines	60%	12 semaines	pentobarbital	3 à 4h	baisse	NA	hausse	Pas d'effet	NA	Oui (?)	NA
Mellor, 2012	C57Bl\6J	4 à 5 semaines	60%	12 semaines	non	6h	baisse	NA	hausse	NA	NA	NA	NA
Lee, 2012	C57Bl\6	4 semaines	60%	8 semaines	non	12h	NA	NA	hausse	hausse	NA	Oui (OGTT)	NA
Chan, 2013	C57Bl\6J	14 semaines	35%	2 semaines	non	5 à 7h	hausse	hausse	hausse	NA	hausse	Oui (OGTT)	NA
Schultz, 2013	C57Bl\6	12 semaines	34%	18 semaines	pentobarbital	6h	Pas d'effet	Pas d'effet	hausse	hausse	hausse	Oui (OGTT)	oui
Singh, 2015	C57Bl\6	6 semaines	70%	18 semaines	Xylazine + thiopentane sodium	NA	Pas d'effet	NA	hausse	hausse	Pas d'effet	NA	NA
Sodhi, 2015	C57Bl\6	8 semaines	66%	8 semaines	pentobarbital	8h	NA	NA	hausse	NA	hausse	NA	NA
Sun, 2015	C57Bl\6J	14 semaines	35%	1 semaine	NA	4h	Pas d'effet	hausse	hausse	hausse	NA	Oui (?)	NA
Sun, 2015	C57Bl\6J	14 semaines	35%	8 semaines	NA	4h	Pas d'effet	hausse	hausse	hausse	NA	Oui (?)	NA
Wang, 2015	C57Bl\6J	12 à 14 semaines	35%	2 semaines	non	5 à 7h	hausse	hausse	hausse	Pas d'effet	NA	Oui (ipGTT)	NA

Table 1 : L'utilisation d'un régime riche en fructose induit des changements métaboliques chez la C57Bl/6. Les principaux changements métaboliques induits par un HFruD chez la souris C57Bl/6 sont présentés. Les différences dans les protocoles peuvent expliquer la variabilité importante des résultats de ces différentes études. NA : non étudié.

Etant données les différences de composition et de durée de régime enrichi en fructose dans ces études, les conditions nécessaires pour faire une méta-analyse ne sont pas atteintes ici. Je me contenterai juste de faire un rapide résumé des études. Il semble que des effets délétères d'une surconsommation de fructose se développent chez la souris C57Bl/6 à partir de 8 semaines de régime, lorsque le régime contient plus de 60% de fructose. Or, le seul article où la durée de régime est inférieure à 8 semaines est contradictoire avec une étude ultérieure menée par le même groupe (Mellor et al., 2010, 2011, 2012). Pour les articles utilisant un régime enrichi en fructose ne contenant « que » 35% de fructose, des changements métaboliques surviennent également mais ne coïncident pas forcément avec ceux des autres études (Chan et al., 2013; Schultz et al., 2013; Sun et al., 2015; Wang et al., 2015). Il convient donc de traiter ces études séparément lors de l'analyse de ces paramètres. De façon générale, il semble difficile d'estimer le temps de régime nécessaire pour l'apparition des changements métaboliques.

Concernant le poids des souris, il semble que le HFruD induise une baisse du gain de poids des animaux même si celle-ci n'est pas expliquée dans ces papiers. Pour les études ne trouvant pas cette baisse de poids, soit la durée de régime est très importante (4 mois (Singh et al., 2015)), soit on ne sait pas si les animaux ont été mis à jeun (non renseigné (Farah et al., 2006)). De plus, la baisse de poids se retrouve dans des études où le changement de régime alimentaire se fait sur le jeune animal (4 à 5 semaines). On retrouve donc ici l'une des caractéristiques du HFruD chez le rat, à savoir un régime non obésogène.

Pour les études utilisant un régime à 35% de fructose, les résultats sont plus mitigés. Certaines études ne trouvent pas d'effet du HFruD sur le gain de poids (Schultz et al., 2013; Sun et al., 2015) et confirment donc que ce type de régime ne semble pas obésogène chez la souris alors que d'autres concluent à une augmentation du gain de poids (Chan et al., 2013; Wang et al., 2015). Cependant, il convient de nuancer l'importance de cette prise de poids (3% chez Chan et collaborateurs et poids total non renseigné chez Wang et collaborateurs).

De même, il ne semble pas y avoir d'effets de ce régime sur la prise alimentaire pour les études réalisées avec des régimes contenant une forte proportion de fructose. En revanche, pour les études utilisant des régimes enrichis à 35% de fructose, une hausse de la prise alimentaire est observée (Chan et al., 2013; Sun et al., 2015; Wang et al., 2015). Seuls Schultz et collaborateurs ne retrouvent pas cet effet sur la prise alimentaire mais la durée de régime est, au minimum, deux fois plus longue comparée à celle des articles cités précédemment (Schultz et al., 2013). Il est possible que la palatabilité du HFruD soit différente en fonction de la proportion de fructose utilisée. Le fructose pourrait être palatable jusqu'à une certaine proportion où il deviendrait neutre voire répulsif.

Une hyperglycémie à jeun est retrouvée par la quasi-totalité des études hormis chez Farah et collaborateurs où on ignore si les animaux ont été mis à jeun ou non (Farah et al., 2006) et chez Chess et collaborateurs où de l'isoflurane a été employé (Chess et al., 2008). Vue

l'augmentation de la glycémie provoquée par cet anesthésiant, il n'est pas surprenant qu'il n'y ait pas de différence significative entre les animaux contrôle et les animaux HFruD. Une seule étude (Mellor et al., 2010) fait état d'une baisse de la glycémie mais se trouve être en contradiction avec deux études ultérieures menées par le même groupe (Mellor et al., 2011, 2012).

Il est, en revanche, bien plus difficile de conclure concernant l'insulinémie des animaux au sein de ces études. La moitié des études ne trouvent pas d'augmentation de l'insulinémie (Farah et al., 2006; Chess et al., 2008; Mellor et al., 2010, 2011; Wang et al., 2015) alors que les autres études font état d'une hyperinsulinémie à jeun (Lee et al., 2012; Schultz et al., 2013; Singh et al., 2015; Sun et al., 2015). Cependant, comme expliqué plus haut, la période de la journée, l'anesthésie ainsi que la durée de mise à jeun sont des paramètres cruciaux à prendre en compte lorsque l'on souhaite doser l'insuline plasmatique.

De même, il est difficile de conclure sur une possible augmentation du niveau des triglycérides plasmatiques, les études se partageant entre l'absence d'effet du HFruD (Farah et al., 2006; Chess et al., 2008; Singh et al., 2015) et une hausse de la triglycéridémie (Chan et al., 2013; Schultz et al., 2013; Sodhi et al., 2015).

Une intolérance au glucose semble se mettre en place chez la C57Bl/6 après un HFruD. Cependant la plupart de ces études ont été réalisées en faisant un test de tolérance oral au glucose (OGTT) ou alors la méthode utilisée n'a pas été précisée (symbolisé par un point d'interrogation dans le tableau). Or, comme précisé dans la **partie II.c.**, le fructose va modifier l'absorption intestinale du glucose. Il serait alors plus juste de vérifier l'intolérance au glucose des animaux en utilisant un test de tolérance au glucose par voie intra-péritonéale (ipGTT). Néanmoins, deux études parviennent à cette conclusion en réalisant une ipGTT (Farah et al., 2006; Wang et al., 2015). Il semble donc raisonnable d'avancer que le HFruD entraîne une intolérance au glucose.

Enfin, il est difficile de conclure concernant la mise en place d'une résistance à l'insuline car le nombre d'études prenant en compte ce paramètre est bien trop restreint.

En conclusion, l'utilisation d'un HFruD pour induire un DT2 chez la souris est une méthode qui reste à clarifier, bien que l'on puisse affirmer que des changements métaboliques ont bien lieu avec ce type de régime chez la C57Bl/6. Dès lors, il est important de bien prendre en compte les différents paramètres d'évaluation du DT2 lorsque ce dernier est induit à l'aide d'un HFruD chez des souris C57Bl/6J.

Chapitre 4 : Problématique de l'étude : Diabète de type 2 et olfaction

Comme cela a été précisé dans les chapitres précédents, les liens entre le diabète et les déficits olfactifs restent encore à élucider. Cependant, il existe plusieurs études, menées sur des patients diabétiques, qui concluent à une relation entre cette pathologie et des difficultés à réaliser des tâches olfactives simples. Certains auteurs avancent même qu'il serait intéressant de mettre au point un outil diagnostique du diabète à l'aide d'un test olfactif (Brady et al., 2013).

Chez l'être humain, toute une série de tests servant à évaluer les capacités olfactives a été mise au point. Ces tests sont souvent regroupés sous l'appellation de « Sniffin' Sticks », du nom des bâtonnets odorisés présentés aux participants. Différentes modalités peuvent ainsi être étudiées : seuil de détection d'un odorant, capacité à discriminer entre deux odeurs, identification d'une odeur, etc... Souvent (mais pas toujours), ces modalités sont toutes testées et le résultat présenté sous forme d'un index général de « performance olfactive » appelé TDI (Threshold-Discrimination-Identification).

Les patients diabétiques présentent des difficultés à identifier les odeurs (Le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1993; Naka et al., 2010; Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014; Sanke et al., 2014), une hausse du seuil de détection (Jorgensen and Buch, 1961; Patterson et al., 1966; Hubert et al., 1980; Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014; Mehdizadeh Seraj et al., 2015), une difficulté à discriminer les odeurs (Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014) ainsi qu'un risque plus élevé d'anosmie (Brämerson et al., 2004).

Cependant, bon nombre de ces études ne précisent pas si les patients sont atteints de diabète de type 1 ou de diabète de type 2 (Jorgensen and Buch, 1961; Patterson et al., 1966; Hubert et al., 1980; Le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1993; Brämerson et al., 2004). Néanmoins, les études réalisées sur des patients diabétiques de type 2 sont concordantes et affirment toutes que cette pathologie est reliée à une baisse générale des capacités olfactives.

De plus, la plupart de ces études n'indiquent pas le niveau de progression du DT2 et, en particulier, s'il est accompagné ou non de complications dues au diabète. Dans une étude en 2010, Naka et collaborateurs ont mis en évidence que les patients DT2 n'avaient pas de problèmes olfactifs hormis ceux qui avaient développé des pathologies secondaires, en l'occurrence des maladies hépatiques et rénales (Naka et al., 2010). Cependant seule la capacité à reconnaître les odeurs était testée dans cette étude.

Une étude plus récente (Brady et al., 2013) conclut que les problèmes olfactifs des patients DT2 se retrouvent uniquement chez les patients ayant développé une neuropathie diabétique accompagnée de douleurs neuropathiques. Cela se retrouve uniquement pour le

seuil de détection. Les patients ayant une neuropathie diabétique sans douleur neuropathique, et les patients DT2 n'ayant pas de neuropathie diabétique ne semblent pas rencontrer de problème olfactif particulier. Néanmoins, il est curieux que, lorsqu'on prend en compte l'intégralité des patients, alors des problèmes olfactifs surviennent, non seulement pour le seuil de détection, mais également pour la discrimination, la reconnaissance et l'intensité des odeurs. Il est donc probable que d'autres mécanismes, en plus des douleurs neuropathiques, soient à l'œuvre pour expliquer les faibles résultats des patients DT2 à ces différents tests olfactifs.

Dans une autre étude, Gouveri et collaborateurs, concluent à une baisse généralisée des capacités olfactives en utilisant le même protocole que Brady en 2013 (Gouveri et al., 2014). Ils concluent que la présence de pathologies secondaires, en l'occurrence la rétinopathie diabétique et la neuropathie diabétique périphérique, diminuent le score TDI des patients par rapport à ceux n'ayant pas développé ces pathologies secondaires. En revanche, les auteurs n'arrivent pas à la conclusion que les patients DT2 n'ayant pas développé ces pathologies présentent une olfaction normale contrairement à l'étude précédente.

Enfin, dans une autre étude récente, il a été montré que les patients diabétiques de type 2 présentaient un seuil de détection plus élevé (Mehdizadeh Seraj et al., 2015). En revanche, un seul odorant a été utilisé pour faire le test dans cette étude, ce qui rend difficile de conclure sur ces résultats. Cependant, il est intéressant de noter que les auteurs n'ont pas retrouvé d'association entre l'augmentation du seuil de détection et des pathologies secondaires au DT2 (en l'occurrence, rétinopathie et neuropathie diabétiques).

Il est donc difficile, à la suite de ces études, de conclure quant à l'implication du DT2 en lui-même ou à celle d'autres pathologies sur la baisse constatée des performances olfactives chez l'humain.

Le même problème se pose pour l'étude des liens entre le DT2 et l'olfaction chez l'animal. Comme cités précédemment, les quelques travaux réalisés sur le sujet ont utilisé des modèles génétiques (Baskin et al., 1985; Figlewicz et al., 1985; Aimé et al., 2014) ou des modèles animaux utilisant un changement de régime alimentaire (Thiebaud et al., 2014). Cependant, ces modèles n'induisent pas uniquement un DT2 (accompagné ou non de complication) mais un modèle plus proche du syndrome métabolique (notamment DT2 et obésité). Le DT2 a aussi été étudié en utilisant des instillations intranasales d'insuline (Marks et al., 2009), mais, là encore, il est difficile de conclure sur l'effet du DT2 dans son ensemble car seul l'effet de l'hyperinsulinémie (et uniquement au niveau de la MO et du BO) est alors étudié. De plus les doses d'insuline utilisées sont de très loin supérieures à celles retrouvées dans le sang d'animaux diabétiques (facteur 1 pour 1 000 000).

En conclusion, s'il est admis que le DT2 et des capacités olfactives réduites peuvent aller de pair chez l'être humain, il est bien plus difficile d'être aussi catégorique concernant les études chez l'animal. De plus, il n'est toujours pas clair que le DT2 en lui-même soit

responsable de la baisse des performances olfactives constatée chez les patients diabétiques de type 2. Enfin, les mécanismes possibles pouvant expliquer ce phénomène (et tout particulièrement au niveau de la muqueuse olfactive) restent totalement inconnus à ce jour.

La question principale que nous nous sommes posée a donc été de savoir si, dans un modèle animal de diabète de type 2 (et uniquement de DT2), les animaux présentaient une capacité olfactive réduite, à l'instar de ce qu'on retrouve chez l'être humain. L'effet du DT2 sur le système olfactif périphérique a, quant à lui, fait l'objet de la deuxième grande question de ce travail de thèse.

Celui-ci s'inscrit dans une étude plus large, menée au sein de l'équipe, sur l'effet du régime alimentaire sur l'olfaction, et en particulier sur le système olfactif périphérique. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser un régime enrichi en fructose pour induire le DT2, ce régime étant connu pour être diabétogène mais non obésogène, afin d'être certains de ne pas induire d'autre pathologie chez nos animaux (hors complications secondaires au DT2).

De plus, l'étude électrophysiologique des OSNs ne peut être réalisée que sur une population de neurones exprimant un OR particulier (afin de savoir quel odorant utiliser pour la stimulation olfactive du neurone). Cela est possible grâce à l'existence d'une lignée de souris transgéniques, chez qui une population de neurones donnée va être fluorescente.

Différentes lignées existent (fluorescentes pour différentes populations d'OSNs exprimant un OR donné) mais toutes ces souches sont réalisées chez des souris présentant un fond génétique C57Bl/6J. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'induction d'un DT2 chez cette souche de souris particulière nécessite de bien mesurer les différents paramètres de mise en place du DT2, étant données les divergences de résultats entre les différentes études.

C'est pourquoi, il a été décidé de séparer la partie « résultats expérimentaux » de cette étude en trois chapitres distincts, correspondant chacun à une question précise. Le premier chapitre (**Chapitre 1**) est donc consacré à la validation de notre modèle expérimental de DT2. Le DT2, induit par un régime enrichi en fructose, a donc été évalué chez nos animaux à l'aide de méthodes anatomiques, métaboliques et biochimiques.

Le deuxième chapitre (**Chapitre 2**) est consacré à l'étude de l'olfaction des animaux en général afin de savoir si, à l'instar des patients diabétiques, des animaux diabétiques présentent ou non une diminution de leurs capacités olfactives globales. Ces dernières ont été étudiées à l'aide de différents tests comportementaux, mesurant l'olfaction des animaux dans des tâches olfactives simples (détection, discrimination, etc...).

Enfin, le dernier chapitre (**Chapitre 3**) est consacré à l'étude de l'effet du régime diabétogène sur le système olfactif périphérique des animaux. Ce dernier a été étudié à l'aide de méthodes histologiques (afin de mesurer de possibles changements anatomiques)

et électrophysiologiques (afin de repérer des changements fonctionnels). L'étude d'un possible mécanisme au niveau de la MO a été réalisée à l'aide de techniques de biochimie et de biologie moléculaire.

Résultats expérimentaux

Chapitre 1 : Validation du modèle d'induction du diabète de type 2 par l'utilisation d'un régime enrichi en fructose

Comme expliqué dans les chapitres 3 et 4 de l'introduction, l'induction d'un diabète de type 2 chez la souris C57Bl/6J à l'aide d'un régime enrichi en fructose a donné des résultats contradictoires en fonction des études. Il nous a donc semblé nécessaire de mesurer différents paramètres physiologiques afin de vérifier la mise en place de la pathologie. Les paramètres classiques utilisés pour mesurer la mise en place du DT2 ont donc été testés ici : présence d'une hyperglycémie et / ou d'une hyperinsulinémie à jeun, intolérance au glucose et résistance à l'insuline. L'induction d'un DT2 par un HFruD donnant un profil particulier (notamment pas d'effet obésogène), le poids, la prise alimentaire, la répartition de la masse grasse ainsi que la leptinémie des animaux ont également été mesurés. Enfin, pour aller un peu plus loin que les études citées précédemment, la palatabilité du régime ainsi que la néophobie alimentaire ont aussi été étudiées.

Dans ce chapitre, nous passerons en revue tout d'abord, les caractéristiques générales des animaux employés et des régimes (fructose et contrôle) utilisés, ainsi que le protocole général de mise sous régime utilisé pour toutes les études réalisées au cours de ce travail. La deuxième partie sera consacrée à l'étude des effets du HFruD sur le métabolisme général des souris (poids, prise alimentaire et hydrique) ainsi qu'à la palatabilité du régime. La troisième et dernière partie se focalisera sur l'induction du DT2 à proprement parler.

I. Caractéristiques des régimes et des animaux.

a. Régimes alimentaires utilisés

Les deux régimes alimentaires utilisés pour cette étude ont été achetés auprès de la société Safe. Le régime contrôle (Ctrl) est un régime classique d'entretien des rongeurs de laboratoires (A04) et le régime fructose, un régime à façon proposé par Safe. La **Table 2** résume la composition des deux régimes.

Composition	Ctrl	HFruD
Protéines	19%	22%
Glucides	60% (amidon)	60% (fructose)
Lipides	6% (mélange acides gras)	5% (huile soja)
Fibres	7%	5% (cellulose)
Vitamines	traces	1%
Minéraux	8%	7%

Table 2 : Composition des régimes contrôle et enrichi en fructose.

Les deux régimes ne sont pas exactement les mêmes mais les proportions des différents éléments les composants sont à peu près similaires. La principale différence tient à la nature des carbohydrates (sous forme d'amidon pour le régime contrôle et sous forme de fructose pour le HFruD). La **Table 3** représente le pourcentage d'énergie fourni par chaque catégorie de nutriments ainsi que l'énergie totale fournie par le régime.

Composition énergétique	Ctrl	HFruD
Protéines	20%	21.6%
Glucides	65% (amidon)	65,5% (dont fructose 60%)
Lipides	15%	12,9%
Energie totale	2900 kcal/kg	3481 kcal/kg

Table 3 : Composition énergétiques des régimes Ctrl et HFruD.

Les deux régimes utilisés apportent une énergie à peu près similaire, bien qu'ils ne soient pas isocaloriques. Là encore, la principale différence est liée à la nature du sucre apportant l'énergie sous forme de glucides (amidon pour le régime Ctrl et fructose pour le HFruD). De cette façon, nous limitons au maximum les biais entre les deux régimes.

b. Animaux utilisés et mise sous régime

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris issues de la lignée dite *MOR23-IREStau-GFP*. Ces souris expriment la GFP au sein d'un ensemble d'OSNs exprimant le récepteur olfactif MOR23 (Vassalli et al., 2002). Ces souris sont particulièrement utiles pour l'approche électrophysiologique car elles permettent l'enregistrement de la réponse d'un neurone suite à la stimulation olfactive avec un ligand approprié. Ici, la lignée exprimant la GFP sous le promoteur du gène codant pour le récepteur olfactif MOR23 a été choisie, car ces neurones ségrègent dans la zone 4 de l'EO, soit la zone la plus dorso-médiane, ce qui les rend facilement accessibles (Vassar et al., 1993). Si la transgénèse se fait initialement chez des souris issues de la souche 129, les animaux transgéniques sont ensuite croisés avec des souris C57Bl/6J jusqu'à ce que le fond génétique des animaux soit identique à celui de la souche B/6J.

Dans cette étude, uniquement des souris mâles ont été utilisées. Premièrement, cela permet de réduire les variabilités interindividuelles entre les animaux car les cycles hormonaux peuvent avoir une influence sur les résultats. De plus, il a été prouvé chez le rat qu'un régime enrichi en fructose n'a pas les mêmes conséquences chez les mâles et chez les femelles. En effet, si les femelles développent également une résistance à l'insuline après un HFruD, celle-ci est plus limitée que chez les mâles. De plus, les femelles ne développent pas d'hypertension, contrairement aux mâles (Galipeau et al., 2002).

Les animaux naissent et sont hébergés dans une salle placée en cycle inversé avec 12h de jour et 12h de nuit, les lumières s'allumant à 17h et s'éteignant à 5h, sauf spécifié

différemment. Les conditions de température ($22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) et d'humidité ($50 \pm 2\%$) sont maintenues stables en permanence. Après sevrage, les animaux sont répartis à 2 ou 3 par cage, en prenant soin d'affecter des animaux issus de la même portée aux deux groupes expérimentaux. Jusqu'à 5 semaines, les animaux sont nourris avec le régime contrôle *ad libitum*. Par la suite, les animaux sont nourris pendant 4 à 8 semaines avec, soit le régime contrôle, soit le régime enrichi en fructose *ad libitum*. L'accès à l'eau est également fourni *ad libitum* tout au long des procédures expérimentales. Ces dernières ont toutes été approuvées par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (numéro d'autorisation : 01286.02).

L'âge de mise sous régime (5 semaines) a été choisi en fonction, à la fois de critères pratiques et scientifiques. Notre protocole d'électrophysiologie des OSNs sur une préparation intacte d'épithélium olfactif se fait traditionnellement entre 3 et 12 semaines chez la souris. Sur des animaux plus âgés, des données empiriques dans l'équipe ont montré une dégradation plus rapide du tissu et de la réponse des neurones aux odorants. Il était donc important de ne pas utiliser des souris trop âgées pour être en mesure de faire ces expériences.

Cependant, il fallait également que les animaux soient suffisamment résistants pour supporter la mise sous régime. Le même régime utilisé sur des souris par une autre équipe au sein du laboratoire a entraîné la mort des animaux lorsque le changement de régime était effectué directement après le sevrage (non publié). Pour ces raisons pratiques, nous avons donc décidé de faire la mise sous régime à 5 semaines chez nos animaux.

Enfin, même s'il n'y a pas à proprement parlé de période d'adolescence chez le rongeur comme nous l'entendons chez l'être humain, à 5 semaines, les souris sont considérées comme étant de jeunes adultes. Cet âge était intéressant car plusieurs études ont fait état que les principaux consommateurs de produits enrichis en fructose (et notamment de boissons sucrées, contenant de fortes proportions de HFCS) étaient les adolescents et les jeunes adultes et que cette consommation était associée à un risque plus important de développement de pathologies tels l'obésité ou le DT2 (Drewnowski and Bellisle, 2007).

c. Protocole général

Différents lots d'animaux ont été utilisés afin de répondre aux questions soulevées dans le chapitre 4 de l'introduction. La validation de notre modèle de DT2 à l'aide d'un HFruD (chapitre 1) a été effectuée sur deux lots d'animaux distincts, le premier restant sous régime durant 4 semaines et le second pendant 8 semaines. Les effets comportementaux induits par le HFruD sur l'olfaction (chapitre 2) ont été étudiés grâce à 3 lots d'animaux : un groupe pour les expériences d'habituation / déshabituation ainsi que pour l'open field, un groupe pour le contre balancement et un groupe pour les expériences de buried food. Chaque groupe d'animaux était soumis à 3 tests comportementaux : avant mise sous régime puis après 4 et 8 semaines de régime. A la fin des expériences de comportement, les animaux étaient

sacrifiés et les tissus olfactifs (frais ou après perfusion intracardiaque de PFA à 4%) étaient prélevés (chapitre 3). A cela, il faut rajouter un groupe supplémentaire d'animaux ayant servis à réaliser les pré-tests comportementaux (chapitre 2) ainsi que le test de palatabilité (chapitre 1).

Deux lots d'animaux ont été utilisés pour les expériences d'électroolfactogramme : après 4 et après 8 semaines de régime (chapitre 3). Les EO de ces animaux étaient prélevés à la fin des expériences (tissus frais) afin de servir pour les expériences de biologie moléculaire et de western blot (chapitre 3). Enfin, un dernier lot d'animaux a été mis sous régime durant 4 semaines, perfusés avec une solution de PFA à 4% et les EO ont été prélevés afin de réaliser les expériences d'anatomie après 4 semaines de régime (chapitre 3).

A l'exception des deux lots d'animaux servants à la validation du modèle de DT2, les animaux étaient placés en cycle inversé (obscurité de 5h à 17h) et les prélèvements effectués une heure après le retrait de la nourriture (Figure 20).

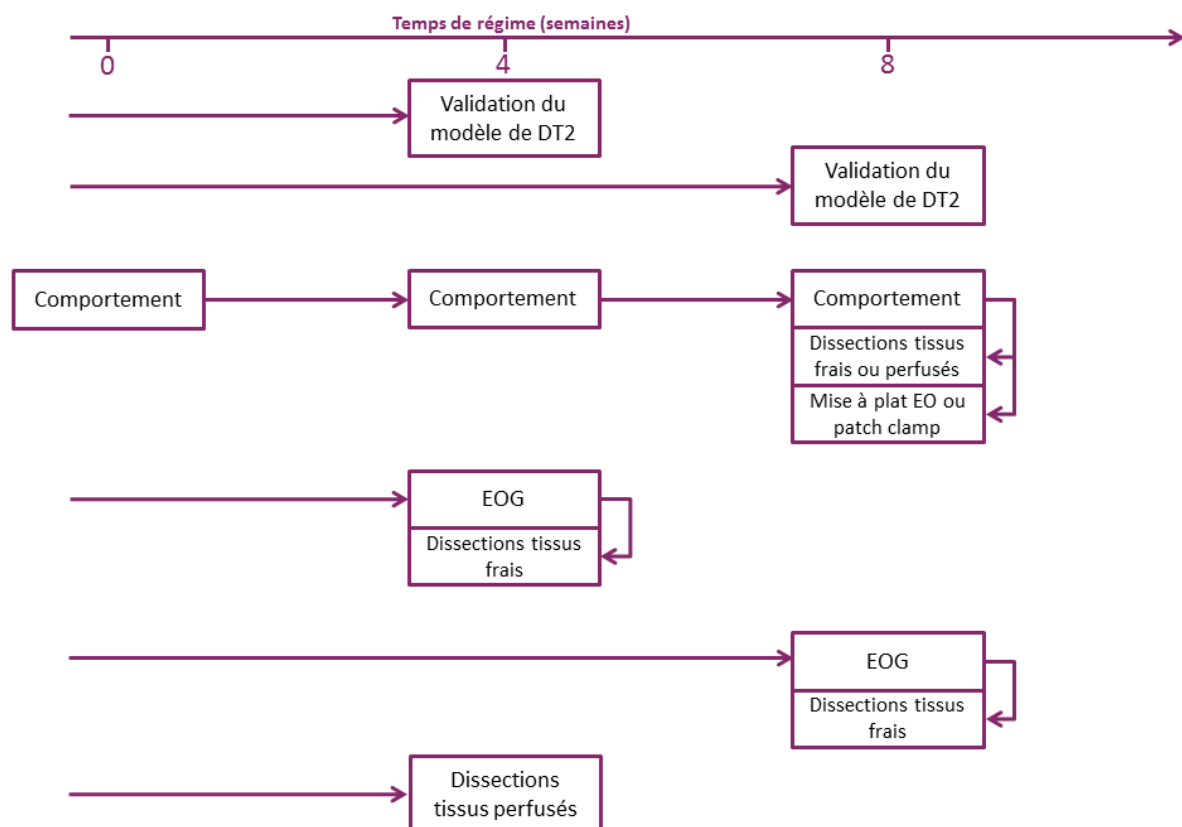


Figure 20 : Protocole général présentant les différents lots d'animaux utilisés pendant l'étude.

II. Effets du HFruD sur le métabolisme général des souris

Le poids, la prise alimentaire et la prise hydrique des animaux ont été mesurés deux fois par semaine, dans l'heure suivant le début de la phase diurne. Néanmoins, pour plus de simplicité de lecture, les données ont été transformées pour avoir une valeur unique chaque semaine (hormis pour la première semaine suivant la mise sous régime).

Poids et prise alimentaire

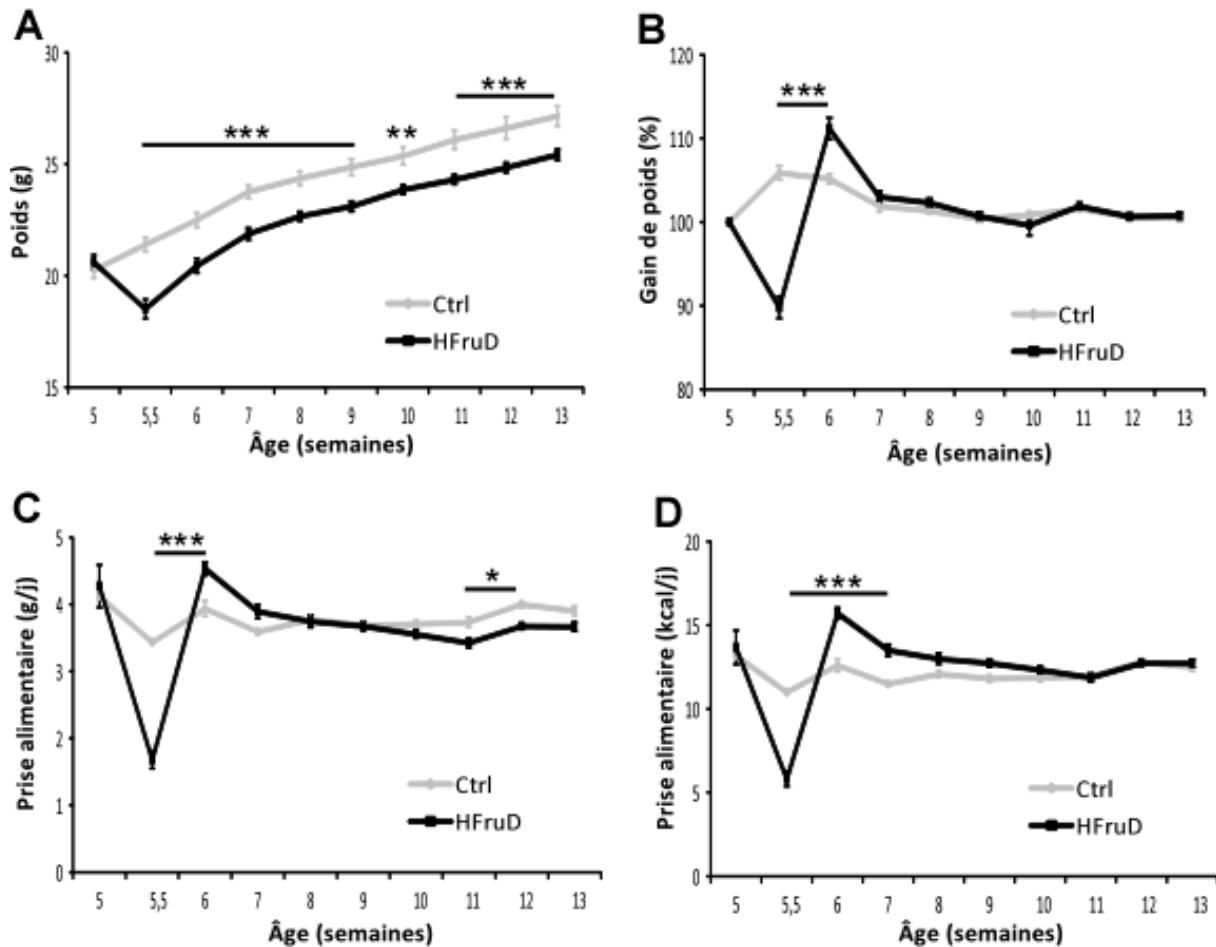


Figure 21 : Evolution du poids et de la prise alimentaire des animaux sous HFruD. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les lignes grises représentent les animaux sous régime Ctrl (n=24) et les lignes noires les animaux sous HFruD (n=34). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. A. Evolution du poids. B. Evolution du gain de poids. C. Evolution de la quantité de nourriture ingérée. D. Evolution de l'énergie ingérée.

Premièrement, le régime enrichi en fructose induit une baisse du poids total des animaux ($F_{(1,56)} = 19,32$; $p < 0,001$). Lorsqu'on regarde dans le détail, on voit qu'une baisse de poids d'environ 10% a lieu durant les premiers jours et que celle-ci n'est jamais rattrapée par les animaux HFruD (Figure 21.A). Si on calcule le gain de poids par rapport à la mesure précédente, on doit obtenir un poids stable pour des animaux ayant fini leur croissance (un peu plus de 100% chez la souris jeune adulte qui gagne du poids très lentement). Ici, on peut

voir qu'à 5 semaines les animaux sont toujours dans leur phase de croissance mais que leur gain de poids se stabilise (environ 101%) à 7 semaines (Figure 21.B). De façon générale, les animaux sous HFruD présentent un gain de poids plus faible que les animaux contrôle ($F_{(1,56)} = 6,6$; $p < 0,05$). En revanche, grâce à cette représentation, on peut voir que la baisse de poids initiale (environ 10% du poids des animaux) suivant la mise sous HFruD est suivie juste après par une hausse plus importante du gain de poids. Dès 7 semaines, ce dernier est stable par rapport à celui des animaux contrôle.

La prise alimentaire des animaux a été mesurée en termes de quantité de nourriture et de calories ingérées. La quantité de nourriture consommée par les souris HFruD est diminuée par rapport à celles des animaux contrôle ($F_{(1,56)} = 4,12$; $p < 0,05$) (Figure 21.C). De façon plus détaillée, on se rend compte qu'une baisse importante de la prise alimentaire a lieu juste après la mise sous régime puis est compensée les jours suivants (les animaux HFruD mangeant plus que les animaux contrôle). On observe également une baisse de la quantité de nourriture ingérée par les souris HFruD après 6 et 7 semaines de régime.

Etant donné que le régime enrichi en fructose est légèrement plus calorique que le régime contrôle, il convient de mesurer la prise alimentaire en termes de calories ingérées plutôt qu'en termes de quantité (Figure 21.D). De façon générale, le régime enrichi en fructose n'induit pas de changement de la prise alimentaire ($F_{(1,56)} = 0,52$; $p = 0,47$). Si on regarde de façon plus détaillée, une baisse de la prise alimentaire a lieu les jours suivants la mise sous HFruD puis est compensée par une hausse de la prise alimentaire jusqu'à deux semaines après le changement de régime. Par la suite, la prise alimentaire des souris HFruD se stabilise et ne diffère plus de celle des animaux contrôle.

Ces résultats sont cohérents avec ce que l'on sait des études concernant le HFruD chez la C57Bl/6J (Chess et al., 2008; Mellor et al., 2010, 2011, 2012). A l'instar des études ayant utilisé un HFruD contenant une forte proportion de fructose ($\geq 60\%$), une baisse du poids total des souris est retrouvée chez nos animaux. De même, notre régime enrichi en fructose n'induit pas de changement global de la prise alimentaire, conformément à ce que nous attendions. Notre étude retrouve donc les résultats attendus avec ce type de régime lorsque la mise sous régime se fait chez la souris jeune adulte (Mellor et al., 2010).

Cependant, contrairement aux études citées précédemment, nous avons établi le décours temporel de l'évolution du gain de poids et de la prise alimentaire. Ces derniers concordent parfaitement entre eux ($r^2 = 0,97$; $p < 0,05$), ce qui indique que la baisse de poids des animaux est probablement due à une diminution de la prise alimentaire dans les premiers jours suivant la mise sous régime.

Néophobie alimentaire ?

Comment expliquer cette importante baisse de la prise alimentaire suivant la mise sous régime enrichi en fructose ? Tout d'abord, il est possible qu'il s'agisse de néophobie

alimentaire. Les rongeurs, comme de nombreux autres animaux, sont réticents à manger autre chose que leur nourriture habituelle (File, 2001). La néophobie alimentaire chez le rongeur se manifeste par une diminution de la quantité de nourriture ingérée lors de la première et / ou de la deuxième journée après un changement de régime alimentaire.

Afin de tester ce paramètre, nous avons proposé à nos animaux, un mélange graduel de leur régime alimentaire traditionnel (Ctrl) et du HFruD. Pendant une semaine, les animaux (âgés de 4 semaines) ont eu droit, pour le groupe contrôle à 100% de régime contrôle et, pour le groupe HFruD, à un mélange des deux régimes dont la proportion en fructose augmentait graduellement (proportion Ctrl / HFruD : 75 / 25, 50 / 50 puis 25 / 75). A 5 semaines, les animaux HFruD étaient passés sous 100% de régime enrichi en fructose. De cette façon, les animaux avaient plus d'une semaine pour s'habituer au nouvel aliment, ce qui nous permet d'exclure la néophobie alimentaire si des différences entre les deux groupes apparaissent après la mise sous régime totale (100% de HFruD). Le poids, le gain de poids et la prise alimentaire ont été mesurés comme précédemment mais uniquement durant les deux premières semaines après la mise sous régime, puisque les différences entre les groupes surviennent uniquement à cette période.

Une baisse de poids similaire à celle observée lorsque les animaux étaient passés sous HFruD sans période de transition (environ 10% du poids total) est retrouvée chez les animaux avec mise sous régime progressive ($F_{(1,52)} = 8,57$; $p < 0,01$) (Figure 22.A). Cette dernière se maintient durant les deux semaines suivantes. De même, l'évolution du gain de poids suit les mêmes variations que celle des animaux n'ayant pas eu de mise sous régime progressive, *i.e.* un gain de poids plus faible pour les animaux sous HFruD ($F_{(1,52)} = 6,16$; $p < 0,05$) (Figure 22.B). Là aussi, la baisse de poids initiale est compensée par une hausse du gain de poids quelques jours après.

Enfin, l'évolution de la prise alimentaire des animaux ayant bénéficié d'une période de transition entre les deux régimes est similaire à celle des animaux sous HFruD n'ayant pas eu de mise sous régime progressive (Figure 22.C). De façon générale, l'ANOVA ne détecte pas de changement de la prise alimentaire ($F_{(1,52)} = 0,68$; $p = 0,41$) car la baisse initiale est compensée par une hausse rapide de l'énergie ingérée par les souris sous HFruD.

La mise sous régime progressive ne semble donc pas avoir d'impact sur le poids et la prise alimentaire des animaux par rapport à ceux ayant eu une mise sous régime directe. La néophobie alimentaire étant transitoire, il semble peu probable que la baisse de la prise alimentaire des souris sous HFruD ne soit due qu'à ce phénomène car ces dernières ont eu une semaine entière pour s'habituer au nouveau régime avant de ne plus avoir le choix. Il est donc possible que le goût du régime enrichi en fructose soit particulièrement désagréable pour les souris.

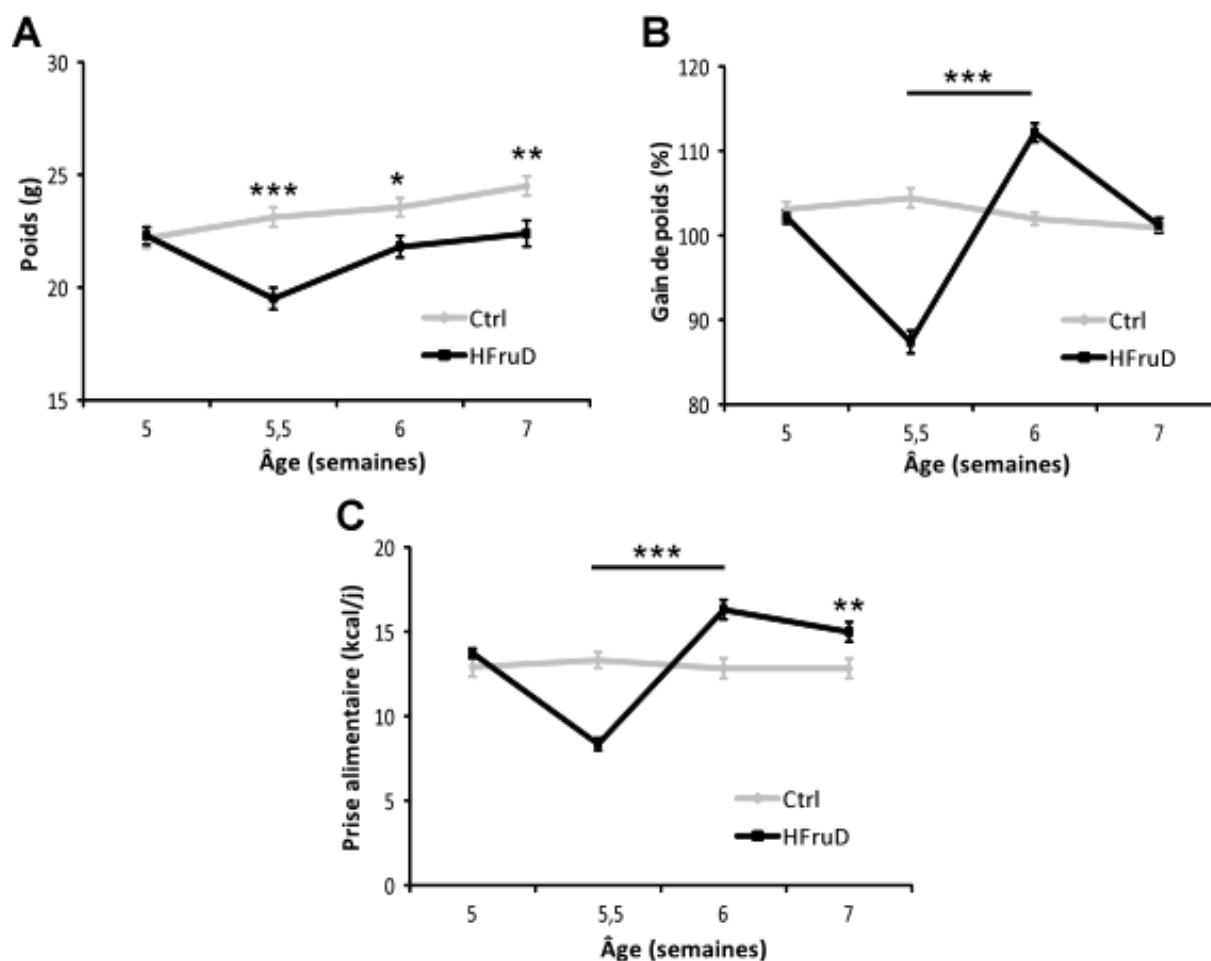


Figure 22 : Evolution du poids et la prise alimentaire après mise sous régime progressive. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les lignes grises représentent les animaux sous régime Ctrl (n=23) et les lignes noires les animaux sous HFruD (n=31). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. A. Evolution du poids. B. Evolution du gain de poids. C. Evolution de l'énergie ingérée.

Palatabilité du HFruD

Afin de tester la palatabilité du HFruD, des souris ont été habituées pendant deux semaines après le sevrage à aller chercher leur nourriture à deux endroits différents de leur cage. Pour cette expérience, les souris ont été placées en cage individuelle. A 5 semaines, les souris ont eu le choix entre leur régime contrôle habituel ou le régime enrichi en fructose. Afin de ne pas introduire de biais, l'endroit de la cage où le régime fructose était placé a été choisi aléatoirement. Pendant 4 jours consécutifs (un temps volontairement plus long que les deux jours maximum de néophobie constatés habituellement), les souris ont un accès *ad libitum* aux deux régimes et à l'eau. A la fin des 4 jours, la quantité totale ainsi que l'énergie totale ingérée sont calculées pour chaque animal. Les animaux n'ayant pas consommé de régime enrichi en fructose durant les 4 jours ont été exclus de l'étude.

Les animaux consomment significativement moins de régime enrichi en fructose que de régime contrôle lorsqu'ils ont le choix entre les deux. En effet la quantité de HFruD ingérée

est près de trois fois inférieure à celle de régime contrôle (Figure 23.A) et l'énergie ingérée plus de deux fois inférieure (Figure 23.B). Il semble donc que la palatabilité du régime enrichi en fructose soit bien inférieure à celle du régime contrôle. Ces résultats sont cohérents avec les études montrant que les régimes contenant 60% de fructose ou plus n'induisent pas d'augmentation de la prise alimentaire à l'inverse de ceux contenant une proportion de fructose moindre (environ 35%) (voir **Table 1**). Il est donc possible que la proportion de fructose au sein d'un régime puisse influencer la palatabilité de ce dernier. Afin de s'en assurer, la même expérience pourrait être réalisée en utilisant des régimes contenant des quantités de fructose variables.

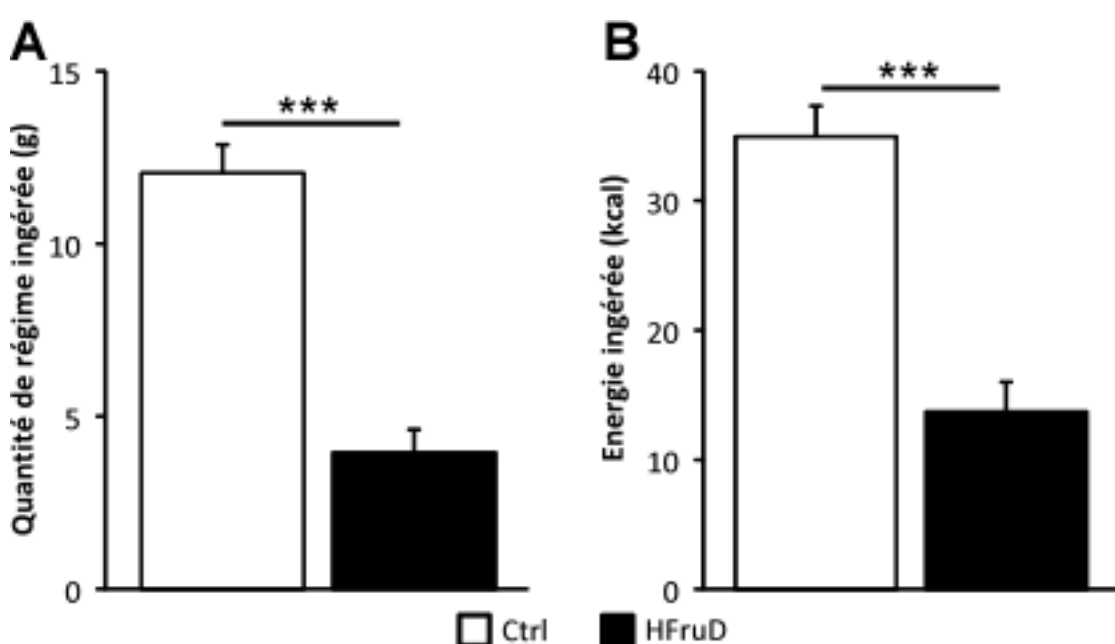


Figure 23 : Mesure de la palatabilité du régime enrichi en fructose. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent la consommation de régime contrôle et les histogrammes noirs celle de HFrud (n=21). *** : $p < 0,001$ après un test t de Student sur données appariées. A. Quantité de nourriture ingérée. B. Energie ingérée.

Prise hydrique

Enfin, le dernier critère mesuré a été la consommation en eau des animaux. La prise hydrique des souris a été évaluée en même temps que leur prise alimentaire. De façon générale, la prise hydrique des souris HFrud est augmentée par rapport à celle des souris contrôle ($F_{(1,54)} = 78,04$; $p < 0,001$) (Figure 24.A). Plus exactement, la prise hydrique des souris HFrud est augmentée à partir de 1 semaine après la mise sous régime et jusqu'à la fin des 8 semaines de régime.

Néanmoins, la prise hydrique des rongeurs étant fortement liée à leur prise alimentaire (75 à 80% de la prise hydrique totale s'effectue pendant les repas) (Fitzsimons and Le Magnen, 1969; Kissileff, 1969), il convient de ramener la prise hydrique sur la prise alimentaire afin de ne pas introduire de biais (d'autant plus que nous avons vu précédemment que la quantité

de nourriture ingérée par les souris est modifiée par le HFruD). De cette manière, il apparaît que, non seulement la prise hydrique des animaux HFruD est augmentée par rapport à celle des animaux contrôle ($F_{(1,54)} = 41,73$; $p < 0,001$), mais que cela est le cas dès le début de la mise sous régime (lors de la première mesure) (Figure 24.B).

L'un des symptômes du DT2 est une soif importante. Néanmoins, l'augmentation de la prise hydrique ayant lieu dès la mise sous régime, il est peu probable que l'on puisse considérer cette dernière comme une caractéristique de la mise en place de la pathologie ici. Il est beaucoup plus logique de penser que les animaux consommant une nourriture leur paraissant plus sucrée, ils augmentent le volume d'eau ingérée. Techniquement l'amidon en lui-même n'a pas de pouvoir sucrant mais il est constitué de glucose, ce dernier ayant un pouvoir sucrant plus de deux fois inférieur à celui du fructose (Krause and Mahan, 1984). Il semble donc que les souris sous HFruD ressentent une soif plus importante que les souris contrôle.

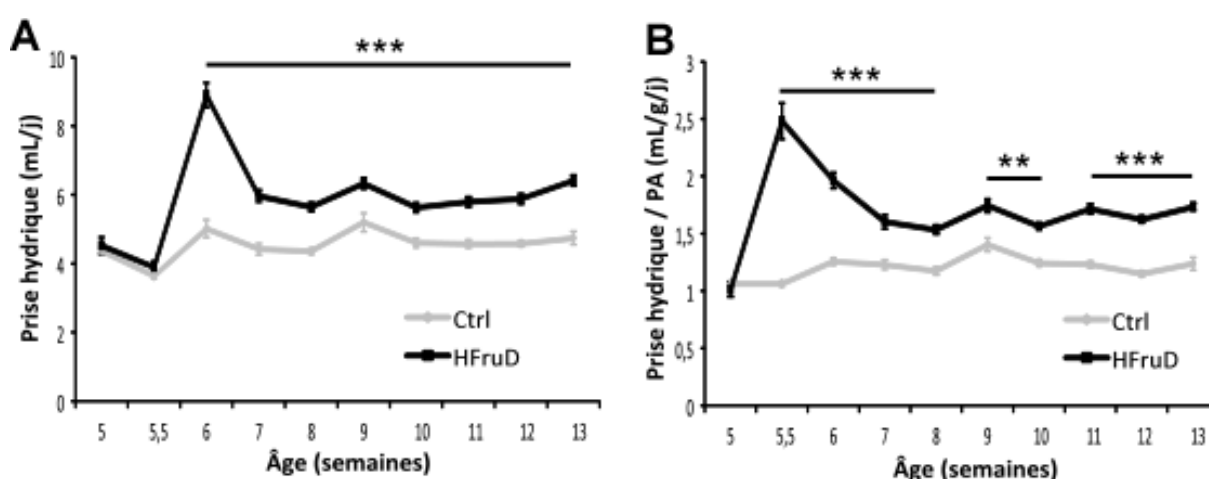


Figure 24 : Evolution de la prise hydrique des animaux sous HFruD. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les lignes grises représentent les animaux sous régime Ctrl (n=24) et les lignes noires les animaux sous HFruD (n=32). ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. A. Evolution de la prise hydrique. B. Evolution de la prise hydrique rapportée à la prise alimentaire.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc décidé de nous placer à 4 et 8 semaines de régime, à la fois pour des raisons pratiques (cela laisse suffisamment de temps de repos aux animaux entre les expériences) et parce que les différences de gain de poids et de prise alimentaire sont déjà stabilisées à cette période, ce qui évite d'avoir à prendre en compte ces paramètres dans la suite de l'étude.

En résumé, les résultats de cette partie sont cohérents avec ceux des études utilisant ce type de régime chez la souris C57Bl/6J. On retrouve notamment l'une des caractéristiques importante de ce régime, à savoir qu'il n'induit pas d'obésité chez le rongeur. Cependant, le mécanisme d'induction du DT2 à l'aide de ce régime va induire d'autres changements métaboliques caractéristiques qui sont présentés dans la partie suivante.

III. Mise en place d'un diabète de type 2 à l'aide du HFruD

Afin d'étudier la mise en place du DT2 chez nos animaux nourris avec un régime enrichi en fructose, différentes mesures ont été effectuées. Pour l'intégralité des expériences décrites ci-après, les animaux ont été placés en cycle normal de 12h jour / 12h nuit. Comme expliqué dans l'introduction, lorsque les rongeurs sont mis à jeun, le cycle de libération de l'insuline est perturbé (inversion du cycle jour / nuit) (La Fleur et al., 1999), ce qui aurait pu perturber les mesures si les expériences avaient été conduites durant la période nocturne des animaux. Pour toutes les expériences décrites dans cette partie, la nourriture des animaux a été retirée 5h avant le début des expériences.

Classiquement, le DT2 chez la souris peut être diagnostiqué à l'aide de tout un ensemble de tests différents (McMurray and Cox, 2011). Parmi ces derniers, nous avons choisi de mesurer la glycémie « à jeun » (classiquement entre 4 et 6h après le retrait de la nourriture), de tester l'intolérance au glucose par un test de tolérance au glucose (ipGTT) et la résistance à l'insuline par un test de tolérance à l'insuline (ITT). Nous avons également mesuré l'insulinémie des animaux et regardé la répartition de la masse grasse (le HFruD étant connu pour changer cette dernière).

Les mêmes animaux ont été utilisés pour toutes les expériences avec un premier lot d'animaux restant sous régime durant 4 semaines et un deuxième lot d'animaux restant sous régime pendant 8 semaines. Tout d'abord, l'ipGTT est réalisée et du sang est prélevé au point 0. Trois jours plus tard, l'ITT est réalisé et 2 jours après celle-ci, l'analyse de la composition corporelle des animaux est effectuée. Le même jour, les animaux sont mis à mort et différents prélèvements réalisés (sang, matière grasse épидидymale, muqueuse olfactive et bulbes olfactifs).

La glycémie des animaux a été évaluée en utilisant un glucomètre Accu-Chek Performa (Roche). Le sang des animaux a été obtenu soit en coupant le bout de la queue des souris et en récupérant quelques gouttes de sang au niveau de la veine caudale à l'aide d'un tube microvette (Sarstedt) durant l'ipGTT ou alors après décapitation de l'animal à la fin des expérimentations. Le sang est ensuite centrifugé à 5000G pendant 5 minutes et le plasma collecté est placé à -80°C avant usage. Les concentrations plasmatiques d'insuline ont été mesurées à l'aide d'un kit AlphaLISA (PerkinElmer).

Les deux prélèvements sanguins réalisés chez chaque animal ont été utilisés pour différentes mesures (et afin d'avoir des échantillons en plus en cas de problème). Cependant, afin que les mesures soient comparables entre elles, les animaux devaient être euthanasiés sans anesthésie. Afin de rendre la procédure moins stressante pour les animaux, ces derniers ont été exposés brièvement à de l'isoflurane afin, non pas de les endormir, mais de les étourdir avant la décapitation. Pour être sûr que cette brève exposition à l'isoflurane n'avait pas d'incidence sur les mesures, la glycémie et l'insulinémie des animaux ont été comparées en

utilisant les deux méthodes. La glycémie des animaux (n=24) mesurée pendant l'ipGTT et celle obtenue après « étourdissement » à l'isoflurane sont hautement corrélées ($r^2 = 0,91$; $p < 0,05$). De même, l'insulinémie des animaux (n=21) mesurée pendant l'ipGTT et celle obtenue en récupérant le sang total sont également fortement corrélées ($r^2 = 0,8$; $p < 0,05$). Les valeurs moyennes obtenues avec ces deux méthodes ne sont pas différentes ni pour la glycémie ni pour l'insulinémie des animaux (respectivement $p = 0,8$ et $p = 0,91$ après un test t de Student sur données appariées). Pour la suite de l'étude, nous avons donc considéré que « l'étourdissement » à l'isoflurane n'induisait pas de changement métabolique chez nos animaux et toutes les expériences nécessitant de prélever du tissu frais ont été réalisées de cette manière.

Glycémie et insulinémie

Après 4 ou 8 semaines de régime, les animaux sous HFruD présentent une glycémie à jeun (respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$) (Figure 25.A) ainsi qu'une insulinémie à jeun (respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$) (Figure 25.B) plus élevées que celles des animaux contrôle. Nos résultats sont donc cohérents avec la grande majorité des études qui retrouvent une hyperglycémie à jeun chez les souris C57Bl/6J nourries avec un HFruD (Mellor et al., 2011, 2012; Lee et al., 2012; Chan et al., 2013; Schultz et al., 2013; Singh et al., 2015; Sodhi et al., 2015; Sun et al., 2015; Wang et al., 2015). De même, l'hyperinsulinémie à jeun retrouvée chez nos animaux HFruD est cohérente avec ces mêmes études (Lee et al., 2012; Schultz et al., 2013; Singh et al., 2015; Sun et al., 2015).

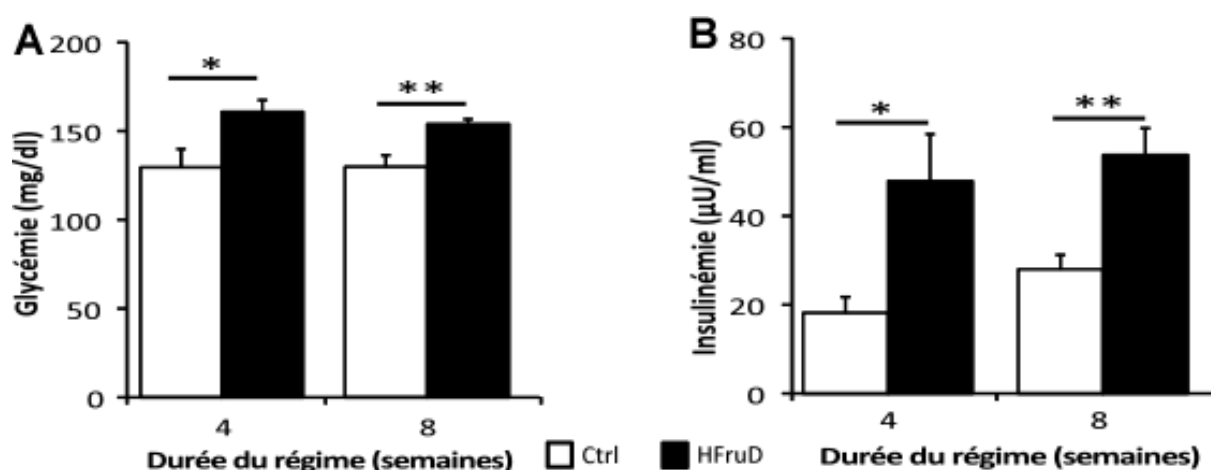
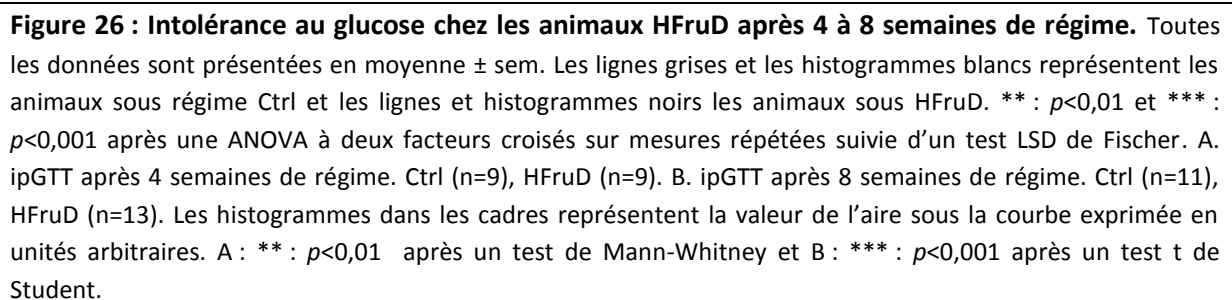


Figure 25 : Les souris HFruD présentent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD. * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney, ** : $p < 0,01$ après un test t de Student. A. Glycémie à jeun. Ctrl à 4 semaines (n=9), HFruD à 4 semaines (n=9), Ctrl à 8 semaines (n=11), HFruD à 8 semaines (n=13). B. Insulinémie à jeun. Ctrl à 4 semaines (n=6), HFruD à 4 semaines (n=6), Ctrl à 8 semaines (n=11), HFruD à 8 semaines (n=12).

L'intolérance au glucose a été mesurée à l'aide d'un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale. Ce test consiste à injecter une solution de glucose (2g de glucose par kg du poids de l'animal) à l'animal vigile et à mesurer la glycémie des animaux avant injection puis après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Comme précisé dans le chapitre 3 de l'introduction, un régime enrichi en fructose modifie la perméabilité intestinale au glucose (Tobin et al., 2008). Pour cette raison, nous avons choisi d'injecter le glucose par voie intrapéritonéale et non par voie orale afin de ne pas introduire de biais entre nos deux groupes expérimentaux.



68

26.A). Les souris HFruD manifestent déjà une intolérance au glucose, la valeur de l'aire sous la courbe des animaux HFruD étant plus élevée que celle des animaux contrôle ($p < 0,01$). De même après 8 semaines de régime, les animaux HFruD ont une élévation de la glycémie plus importante que les animaux contrôle après un bolus de glucose ($F_{(1,22)} = 58,89$; $p < 0,001$) (Figure 26.B). L'aire sous la courbe étant plus élevée chez les souris HFruD que chez les souris contrôle ($p < 0,001$), l'intolérance au glucose des animaux HFruD se maintient après 8 semaines de régime.

Une fois de plus, nos résultats sont cohérents avec la majeure partie des études sur la C57Bl/6J qui retrouvent la mise en place d'une intolérance au glucose après un HFruD (Farah et al., 2006; Mellor et al., 2011; Lee et al., 2012; Chan et al., 2013; Schultz et al., 2013; Sun et al., 2015; Wang et al., 2015). Nos souris HFruD remplissent donc deux critères de l'évaluation du DT2 chez le rongeur : l'intolérance au glucose et l'hyperglycémie à jeun (McMurray and Cox, 2011).

Résistance à l'insuline

L'autre critère important est la mise en place de l'insulino-résistance. Cette dernière a été mesurée en réalisant un test de tolérance à l'insuline (ITT), consistant en la mesure de la glycémie avant et après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes suivant une injection intrapéritonéale d'insuline (0,75U d'insuline par Kg du poids total de l'animal).

Après 4 et 8 semaines de régime, les animaux HFruD manifestent une glycémie plus importante après une injection d'insuline que les animaux contrôle (respectivement : $F_{(1,16)} = 11,28$; $p < 0,01$ et $F_{(1,21)} = 6,51$; $p < 0,05$, après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées) (Figure 27). Cependant, les animaux HFruD ayant déjà une glycémie basale plus élevée que les animaux contrôle, il n'est pas possible de conclure quant à la mise en place de la résistance à l'insuline en employant cette méthode. De même, l'aire sous la courbe ne peut être employée dans l'analyse d'une ITT car cette dernière prend en compte aussi bien la sensibilité à l'insuline que les mécanismes de contre régulation se mettant en place après une injection d'insuline (Marty et al., 2007).

La résistance à l'insuline se traduit par une diminution de la sensibilité à l'insuline. Au cours d'une ITT, cette dernière est représentée par la pente de décroissance suivant l'injection d'insuline (*i.e.* la pente entre les points 0 et 15) (Taveau et al., 2015). Après 4 à 8 semaines de régime, la pente de décroissance suivant l'injection de l'insuline n'est pas significativement différente entre les animaux HFruD et les animaux contrôle (respectivement $p = 0,39$ et $p = 0,58$ après un test t de Student). Il semble donc que 8 semaines de régime enrichi en fructose soit insuffisantes pour induire une résistance à l'insuline généralisée chez nos animaux. A notre connaissance, la seule étude faisant état d'une résistance à l'insuline avec ce type de régime portait sur une durée de régime beaucoup plus longue (18 semaines). De plus, la proportion de fructose n'était « que » de

35% et la souche exacte des souris utilisées n'était pas précisée (C57Bl/6 uniquement) (Schultz et al., 2013).

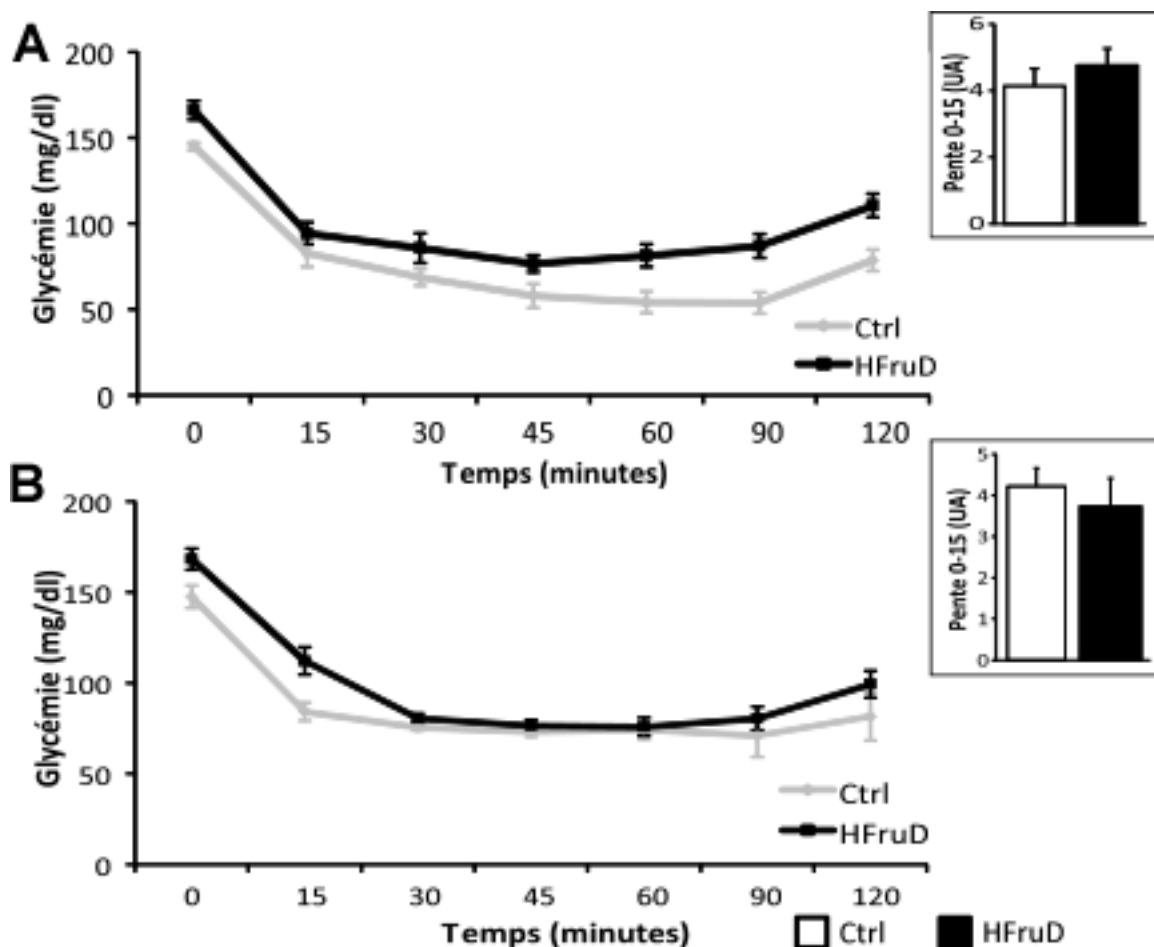


Figure 27 : Les animaux HFruD ne développent pas de résistance à l'insuline après 4 à 8 semaines de régime. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les lignes grises et les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl et les lignes et histogrammes noirs les animaux sous HFruD. A. ITT après 4 semaines de régime. Ctrl (n=9), HFruD (n=9). B. ITT après 8 semaines de régime. Ctrl (n=10), HFruD (n=13). Les histogrammes dans les cadres représentent la valeur de la pente entre les points 0 et 15 exprimée en unités arbitraires.

Répartition de la masse grasse et léptinémie

Enfin, nous avons estimé la répartition de la masse grasse des animaux par EchoMRI (QNMRI system EchoMRI-500T, Echo Medical Systems), une technique permettant de mesurer la masse grasse et la masse maigre totales chez des animaux éveillés, en utilisant la résonance magnétique nucléaire. La masse grasse épидидymale a été mesurée après prélèvement lors de l'euthanasie des animaux.

Après 4 et 8 semaines de régime, les animaux HFruD présentent une diminution de la masse grasse totale par rapport aux animaux contrôle (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$) (Figure 28.A) alors que la masse maigre totale des animaux n'est pas modifiée par le HFruD (Figure 28.B). La perte de poids constatée des animaux sous HFruD (Figure 21.A) serait donc due à une perte globale de masse grasse. Ces résultats sont cohérents avec les études montrant qu'un régime enrichi en fructose diminue la capacité du tissu adipeux à métaboliser le glucose et à synthétiser des acides gras, et donc à pouvoir stocker de l'énergie sous forme de triglycérides (Bender and Thadani, 1970; Vrána et al., 1974; Waterman et al., 1975).

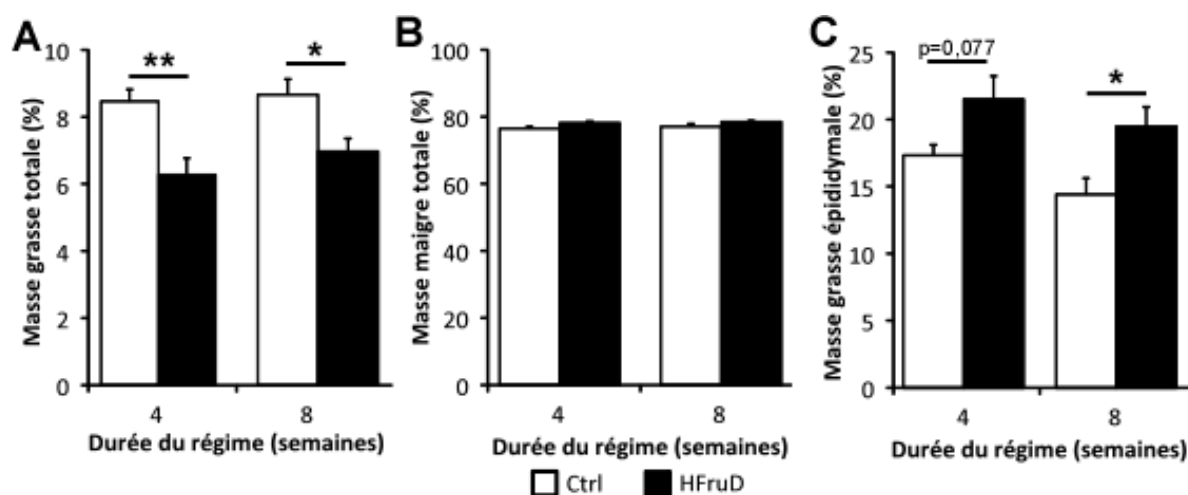


Figure 28 : Mesures de la masse grasse et de la masse maigre des animaux. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl ($n=9$) et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD ($n=9$). * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$ après un test de Mann-Whitney. A. Estimation de la masse grasse totale rapportée à la masse totale des animaux. B. Estimation de la masse maigre totale rapportée à la masse totale des animaux. C. Estimation de la masse grasse épидидymale rapportée à la masse grasse totale.

Cependant, si la masse grasse totale diminue, la répartition de la masse grasse est différente entre les animaux contrôle et HFruD (Figure 28.C). En effet, le rapport entre la masse grasse épидидymale et la masse grasse totale est augmenté chez les animaux nourris pendant 4 et 8 semaines avec le HFruD (respectivement $p = 0,077$ et $p < 0,05$). Cela est cohérent avec le fait que le foie va synthétiser et sécréter plus d'acides gras, qui vont avoir tendance à ségréger autour des organes abdominaux (Winder et al., 1975; Sturton et al., 1978). De plus, une étude récente a aussi prouvé qu'après un régime enrichi en fructose, des souris C57Bl/6J présentaient une hausse de la masse grasse épидидymale (Wang et al., 2015). Ce profil particulier de la répartition de la masse grasse avec un HFruD participe à la mise en place de la résistance hépatique à l'insuline (Tappy et al., 2010).

Etant donnés les changements de répartition de la masse grasse chez nos souris HFruD, nous nous sommes demandés si la concentration plasmatique en leptine allait être modifiée. Pour tester cela, la leptine plasmatique a été dosée à l'aide d'un kit ELISA (Eurobio). Il apparaît que les concentrations plasmatiques de leptine ne sont pas différentes entre les animaux

contrôle et les animaux HFruD après 4 et 8 semaines de régime (respectivement $p = 0,48$ et $p = 0,7$ après un test de Mann-Whitney) (Figure 29). Le changement de répartition de la masse grasse constaté chez nos animaux HFruD n'a donc pas d'incidence sur la concentration plasmatique de leptine, ce qui confirme également que ce régime n'a pas d'effet obésogène.

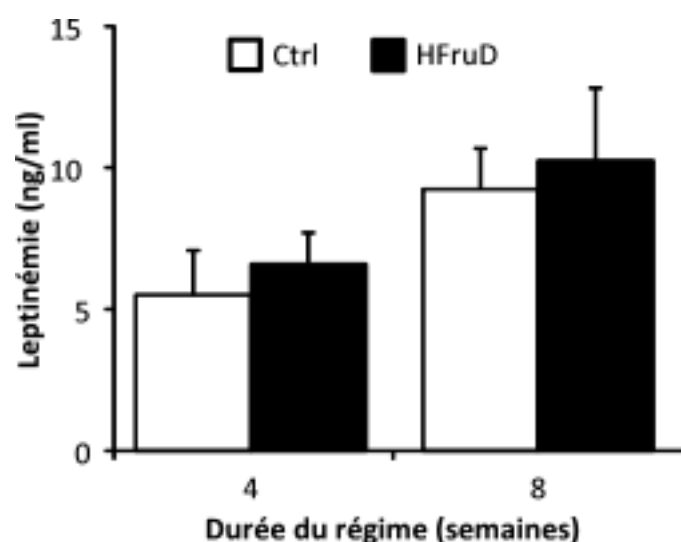


Figure 29 : Le HFruD n'induit pas de changement de la leptinémie après 4 et 8 semaines de régime.

Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD. Ctrl à 4 semaines (n=9), HFruD à 4 semaines (n=9), Ctrl à 8 semaines (n=10), HFruD à 8 semaines (n=7).

IV. Conclusions du chapitre

De façon générale, l'état métabolique de nos animaux est cohérent avec ce qui est attendu en employant un régime enrichi en fructose chez la souris C57Bl/6J. Ici, ce régime a été employé dans le but d'induire un diabète de type 2 chez nos animaux. Chez la souris, il existe de nombreuses méthodes de diagnostic de cette pathologie (McMurray and Cox, 2011). S'il n'est pas nécessaire de tester toutes les modalités possibles afin de prouver la mise en place du DT2, le minimum à atteindre pour considérer que les souris sont diabétiques est d'avoir, à la fois, une intolérance au glucose et une hyperglycémie à jeun.

Souvent, la résistance à l'insuline est aussi un critère de choix afin de déterminer si un rongeur est, ou non, atteint de DT2. Cependant, cette dernière n'est pas immédiate dans la mise en place de la pathologie et intervient après la mise en place de l'intolérance au glucose (Saltiel, 2001; International Diabetes Federation, 2013). Il est important de souligner que, si la résistance à l'insuline généralisée n'est pas encore mise en place, cela ne signifie pas pour autant que certains tissus ne soient pas déjà insulino-résistants.

Encore plus significatif ici, les souris HFruD présentent une hyperinsulinémie à jeun, ce qui veut dire que les cellules β des îlots de Langerhans produisent et libèrent beaucoup d'insuline. Cette période de la pathologie, appelée phase de compensation des cellules β , se situe lors des étapes précoces de la mise en place du DT2 (Cavaghan et al., 2000). Lorsque le DT2 est présent depuis une période de temps plus longue, il est plutôt caractérisé par une diminution de la masse des cellules β (Jackerott et al., 2006), une baisse de leur activité électrique et une baisse de la sécrétion d'insuline (Bell and Polonsky, 2001; Florez et al., 2003), ce qui se traduit par une baisse drastique de l'insulinémie (phase de décompensation).

L'absence de résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie de nos animaux HFruD nous permettent d'affirmer qu'après 8 semaines de régime enrichi en fructose, les animaux se situent encore durant les étapes précoces de la pathologie. Cela est particulièrement intéressant pour nous car, si les animaux sont déjà diabétiques, il est peu probable qu'ils aient déjà développé des complications secondaires dues au DT2, ces dernières se mettant en place durant une période plus tardive de la pathologie (Forbes and Cooper, 2013). Cela nous permet, pour la suite de ces travaux, de considérer que nous étudions l'effet du DT2 en lui-même et non l'effet du DT2 accompagné de complications secondaires, comme c'est le cas dans la plupart des études chez l'être humain (voir chapitre 4 de l'introduction).

En conclusion, nous avons validé notre modèle d'induction du DT2 par l'utilisation d'un HFruD chez nos souris transgéniques. Ces dernières se situant en début de pathologie, nous avons pu étudier l'effet du DT2 en lui-même sur leurs capacités olfactives. A l'instar des études menées sur l'être humain, les souris diabétiques présentent-elles une diminution de leurs capacités olfactives globales ?

Chapitre 2 : Le diabète de type 2 induit une baisse des capacités olfactives chez la souris

Les rongeurs sont des animaux macrosmates, ce qui signifie qu'ils possèdent des structures olfactives ayant une taille très importante par rapport à la taille totale de leur cerveau. Ces animaux possèdent un sens de l'odorat très développé qui leur sert dans de nombreux comportements essentiels à leur survie. Même en laboratoire, les rongeurs conservent un odorat puissant, ce qui permet de leur faire réaliser des tâches plus ou moins complexes basées sur leurs capacités olfactives (Slotnick, 2001).

Ici, nous avons souhaité tester les capacités olfactives des animaux en réalisant des expériences se rapprochant au maximum des tests réalisés chez l'être humain. Comme expliqué dans le chapitre 4 de l'introduction, chez l'humain ces tests sont des tâches olfactives simples, souvent rassemblées sous l'appellation TDI, pour Treshold-Discrimination-Identification.

Le test d'identification, ou de reconnaissance d'une odeur, est difficilement réalisable chez le rongeur. Il présuppose que le sujet puisse indiquer à l'expérimentateur si l'odeur présentée a été préalablement associée à une odeur connue et de nommer précisément cette odeur. Des tests existent chez le rongeur permettant d'évaluer la familiarité d'une odeur, mais pas la reconnaissance à proprement parler. Nous avons préféré nous concentrer sur les deux autres aspects, la détection et la discrimination olfactive, qui sont les deux modalités les plus testées sur le rongeur de laboratoire. La détection permet de mesurer l'aspect quantitatif d'une odeur (l'odorant est-il plus ou moins concentré ?) et la discrimination, l'aspect qualitatif (deux odorants sont-ils différents l'un de l'autre ?).

Avant de décrire plus en détails ces tests, il faut préciser plusieurs points sur le fonctionnement général des tests comportementaux basés sur l'olfaction. Une grande majorité des tests disponibles s'appuie sur l'apprentissage des animaux (passant la plupart du temps par un système de récompenses sous forme alimentaire). Le test d'apprentissage olfactif par renforcement différentiel (Linster and Hasselmo, 1999), basé sur une association entre une odeur et une récompense alimentaire, en est un bon exemple.

Un autre test très utilisé est le test du « go / no go ». Ce dernier peut être adapté pour tester aussi bien la détection que la discrimination olfactive chez le rongeur. Une fois de plus, ce test fait appel à l'association entre une odeur (délivrée par un olfactomètre) et une récompense sous forme, le plus souvent, d'une boisson sucrée. Il a été utilisé aussi bien chez le rat (Lu and Slotnick, 1998; Martin et al., 2004) que chez la souris (Bodyak and Slotnick, 1999; Abraham et al., 2004). Dans certains cas, la récompense alimentaire n'est pas sous forme liquide mais solide (Ravel et al., 2003), ce qui ne change rien au fait qu'un

apprentissage par renforcement alimentaire est nécessaire au bon fonctionnement de ce test dans tous les cas.

Nous avons décidé de ne pas employer ce type de test pour plusieurs raisons. La première est que nous recherchons volontairement des tests simples pour mesurer l'acuité olfactive de nos animaux, *i.e.* des tests ne requérant pas d'apprentissage associatif. En effet, l'apprentissage va faire appel à de nombreuses structures cérébrales et ces tests ne mesurent donc pas uniquement l'aspect olfactif de la réponse. De plus, l'apprentissage peut changer les réponses comportementales normalement attendues chez le rongeur. Il s'agit là d'une différence fondamentale entre les tests comportementaux dits « spontanés » et ceux dits « renforcés ».

Pour prendre un exemple connu, il a été démontré que des rats ne peuvent différencier les énantiomères du limonène au cours d'un test de discrimination olfactive spontanée (en l'occurrence un test d'habituation / déshabituation, qui sera décrit en détails par la suite) (Linster et al., 2001) mais qu'ils en étaient parfaitement capables après apprentissage, en utilisant le même test de façon renforcée à l'aide de récompenses alimentaires (Linster et al., 2002). L'apprentissage peut donc complètement changer les résultats attendus d'un test olfactif et il convient de toujours interpréter les résultats obtenus avec prudence.

La deuxième raison est que nous étudions les liens entre l'olfaction et une pathologie associée au comportement alimentaire. Dans le cadre d'une telle étude, un système de récompenses sous forme alimentaire est bien évidemment à proscrire, la récompense n'ayant pas forcément la même valeur hédonique pour les animaux et pouvant fausser les résultats. Il a d'ailleurs été montré que l'anticipation de la récompense pouvait biaiser les résultats expérimentaux attendus (Mainen, 2006; Quirk et al., 2009).

Il est donc nécessaire, dans notre étude, d'éviter les récompenses alimentaires ou de tester la motivation des animaux à chercher de la nourriture afin de vérifier que celle-ci est identique pour les différents groupes d'animaux. Dans tous les cas, il faut éviter de se retrouver dans le cadre d'un apprentissage par renforcement alimentaire et, si jamais une récompense est nécessaire au bon fonctionnement du test, faire en sorte que celle-ci ne soit donnée qu'à titre ponctuel.

La troisième et dernière raison (et qui s'applique surtout au test du go / no go) est la mise sous restriction hydrique des animaux. Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, les animaux HFruD ressentent une soif plus importante que les animaux contrôle (mesurée par une prise hydrique plus importante). Une mise sous restriction hydrique sera donc plus stressante pour ces animaux-là, qui seront également plus motivés à obtenir la récompense (sous forme de boisson).

En résumé, nous avons donc choisi de réaliser des tests de détection et de discrimination ne faisant appel à aucun apprentissage et ne nécessitant pas de récompense alimentaire ou de

mise sous restriction hydrique des animaux. Afin de pouvoir réaliser un suivi longitudinal des animaux, nous avons décidé de réaliser chaque test 3 fois sur les mêmes animaux : une fois avant la mise sous régime afin d'obtenir une valeur de base pour chaque modalité testée chez chaque animal et une fois après 4 et 8 semaines de régime.

I. Test de détection olfactive

Une fois éliminés les tests classiques de détection faisant appel à un apprentissage par renforcement alimentaire, peu d'options restaient disponibles pour tester le seuil de détection de nos animaux diabétiques. Le test d'aversion olfactive conditionnée (COA pour conditionned olfactory aversion) est un test reposant sur l'association entre une odeur et un stimulus négatif (en l'occurrence un malaise gastrique induit par une injection de chlorure de lithium). Ce test permet donc de tester le seuil de détection olfactive des rongeurs sans faire appel à un apprentissage par renforcement alimentaire et sans utiliser de système de récompense alimentaire (Aimé et al., 2007; Chapuis et al., 2007; Desgranges et al., 2009).

Néanmoins, ce test nécessite de mettre les animaux sous restriction hydrique afin qu'ils soient suffisamment motivés à consommer la boisson contenant l'odorant au cours du test. Il nous était donc impossible d'utiliser ce test dans le cadre de notre étude. Notre choix s'est alors porté sur le seul autre test disponible à notre connaissance, le test de la « planche à trous ».

Principe et protocole

Ce test, décrit par Mandairon et collaborateurs, consiste à mesurer le temps d'exploration des animaux, placés dans un dispositif expérimental constitué d'une planche contenant un trou, sous lequel un bécher contenant des concentrations croissantes d'un odorant est placé (Mandairon et al., 2009). Ce test est basé sur la curiosité naturelle des rongeurs qui vont plus explorer une nouvelle odeur dans leur environnement. Lorsque la concentration en odorant atteint le seuil de détection des animaux, le temps passé à explorer le trou contenant l'odorant augmente significativement (Figure 30).

Dans l'équipe, nous ne disposons pas du système utilisé par Mandairon et collaborateurs, qui mesure le temps passé par l'animal à renifler le trou odorisé grâce à un faisceau infrarouge situé au-dessus du bécher contenant l'odorant et qui permet de déclencher un chronomètre dès que le faisceau est interrompu par le passage de l'animal. Nous avons donc construit notre propre arène de test, dont les dimensions sont similaires à celles de l'arène de l'étude de Mandairon et collaborateurs (40*40*10 cm).

L'odorant a également été placé sur un coton surmonté d'une grille (afin d'éviter que l'animal ne puisse attraper le coton), elle-même surmontée d'un centimètre de litière (afin d'éviter que l'animal ne s'agrippe à la grille). Nous avons utilisé le même odorant, à savoir des concentrations croissantes d'acide propionique et, puisque le seuil de détection mesuré

par Mandaïron et collaborateurs se situait à 10^{-1} Pa, nous avons testé une gamme de concentrations allant de 10^{-3} à 2 Pa (afin d'être en mesure de voir si le seuil de détection était plus élevé ou plus bas que le seuil normal attendu).

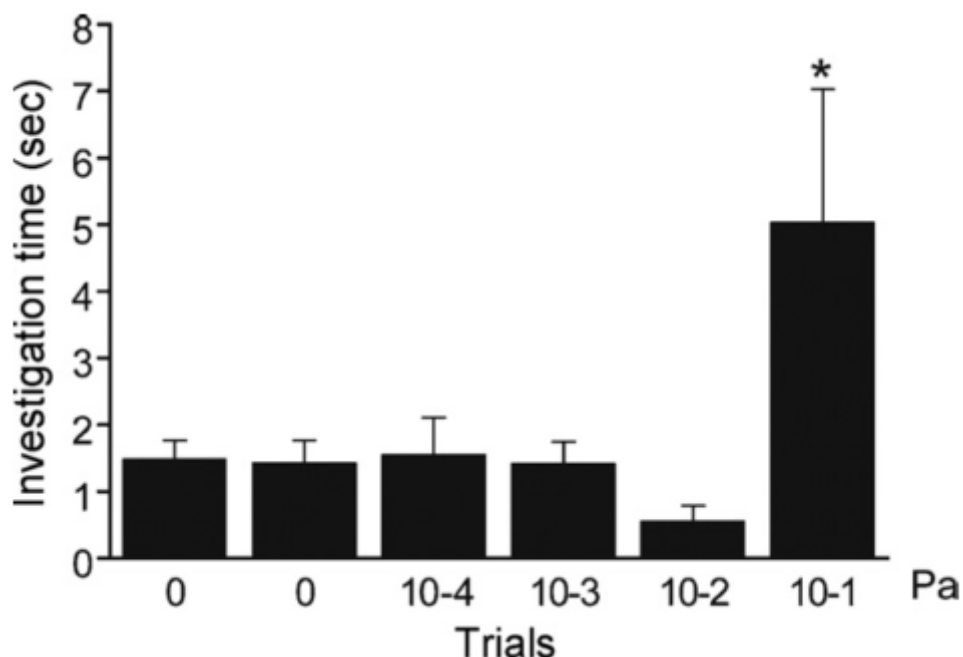


Figure 30 : Résultats attendus pour le test de détection. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem et représentent le temps d'exploration du trou odorisé en fonction de la concentration de l'odorant (acide propionique) dilué dans l'huile minérale. Les essais à 0 sont réalisés avec uniquement de l'huile minérale. Le temps d'exploration augmente significativement à la concentration 10^{-1} Pa. D'après (Mandaïron et al., 2009).

Comme pour tous les tests comportementaux, il est important de commencer par habituer l'animal au dispositif avant le jour du test afin de réduire le temps d'exploration de l'enceinte de test le jour de l'expérience (Macknin et al., 2004). Les trois jours précédant le premier test, les animaux ont été habitués à 3, 5 puis 7 passages successifs dans l'enceinte de test, avec le bécher contenant un coton sur lequel était déposé 60 μ l d'huile minérale (Sigma-Aldrich). Il était alors vérifié que le temps d'exploration du trou par l'animal diminuait au fur et mesure des essais lors de chaque séance. De même que pour les test en eux-mêmes, la nourriture des animaux était retirée une heure avant le début des tests d'habituation.

Afin d'obtenir des valeurs plus objectives que celles pouvant être obtenues en déclenchant un chronomètre manuellement à chaque fois que l'animal se trouvait au-dessus du trou odorisé, les animaux ont été filmés à chaque séance et un logiciel a été créé sous matlab nous permettant d'obtenir avec précision le temps d'exploration des animaux, le nombre de visites effectuées par l'animal, ainsi que la durée moyenne de chaque visite. La détermination du « seuil de visite » ayant été effectuée en parallèle sur les animaux réalisant le test de discrimination, celle-ci sera explicitée lorsque je décrirai le test d'habituation /

déshabituement dans la partie suivante. Une vérification manuelle des données a ensuite été réalisée, notre logiciel comptant parfois des visites lorsque l'arrière de l'animal se retrouvait au-dessus du trou odorisé (Figure 31).

Le jour du test, ce dernier ayant lieu pendant la phase d'activité des animaux et toujours le matin, les animaux étaient placés en cage individuelle dans la salle de test et leur nourriture retirée une heure avant le début des expérimentations. Ces précautions permettent de limiter le stress des animaux (qui ainsi ne sont pas déplacés juste avant l'expérience) et d'éviter les régulations post-prandiales, notamment le pic post-prandial d'insuline (la nourriture étant retirée suffisamment longtemps avant le test pour éviter ces régulations mais pas suffisamment longtemps avant afin d'éviter que les animaux ne ressentent les effets de la faim).

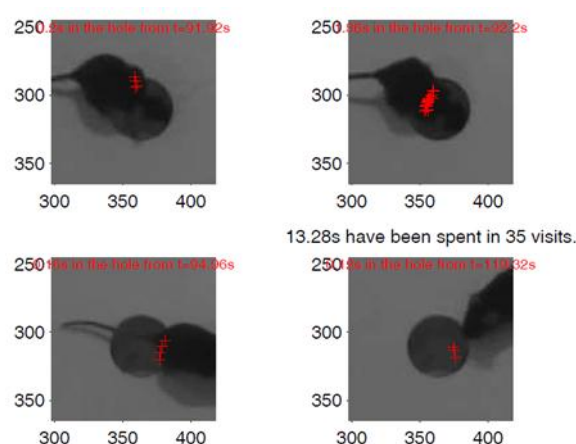


Figure 31 : Exemple d'images obtenues avec le logiciel de suivi des animaux mis en place dans l'équipe.

Le test en lui-même comprenait sept essais successifs de deux minutes entrecoupés de 3 minutes de repos (un deuxième animal réalisant le test dans l'intervalle). Les deux premiers essais ont été réalisés en utilisant uniquement 60 μ l d'huile minérale, puis les 5 suivants 60 μ l de concentrations croissantes d'acide propionique dilué dans l'huile minérale (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1 et 2 Pa) (Sigma-Aldrich). Pour cet essai du test de détection, les animaux ont réalisé deux séances espacées d'une semaine de repos.

Résultats

Au cours de la première séance, aucune différence de temps d'exploration du trou odorisé n'a été retrouvée entre les différents essais ($F_{(6,72)} = 1,66$; $p = 0,14$) (Figure 32.A). La semaine suivante, il semble que la concentration en odorants ait bien un effet sur le temps d'exploration ($F_{(6,72)} = 2,02$; $p = 0,07$) (Figure 32.B) mais, lorsqu'on regarde plus précisément, cet effet ne se retrouve qu'entre l'essai à 1 Pa et celui à 2 Pa et dans le sens contraire de celui attendu (le temps d'exploration diminuant pour la concentration la plus forte).

Deux méthodes peuvent être employées pour déterminer le seuil de détection : un temps d'exploration significativement supérieur entre le temps réalisé avec l'huile minérale et celui réalisé pour la concentration d'intérêt ou un temps d'exploration significativement supérieur pour le temps réalisé entre la concentration d'intérêt et l'essai juste avant celui-ci. Ici, quelle que soit la méthode utilisée, nous ne retrouvons pas les résultats de Mandaïron et collaborateurs.

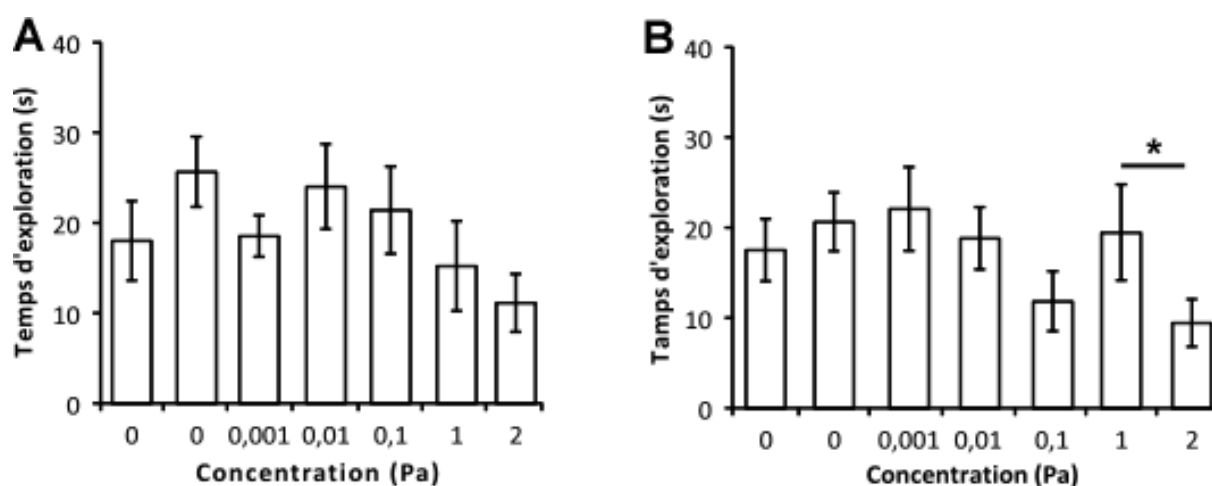


Figure 32 : Résultats obtenus pour le test de détection. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps total d'exploration du trou odorisé par les souris ($n=13$). A. Première séance. B. Deuxième séance. * : $p < 0,05$ après une ANOVA à un facteur sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer.

Le temps d'exploration pour la plus forte concentration d'acide propionique semble même diminué par rapport aux concentrations plus faibles. Il est très possible que de fortes concentrations de cet odorant induisent un effet répulsif chez les souris. Chez l'humain, en tous cas, une concentration similaire d'acide propionique induit une grimace caractéristique de dégoût (résultats non montrés mais testés sur de nombreux membres du laboratoire avec une réussite de 100%).

Comment expliquer que nous ne parvenions pas à trouver un seuil de détection de l'acide propionique chez nos animaux ? Plusieurs explications sont possibles. Tout d'abord, l'âge des souris employées chez Mandaïron et collaborateurs n'est pas précisé. Il est possible que le seuil de détection de l'acide propionique soit différent chez des souris plus jeunes. Cependant, ici, nous ne trouvons pas un seuil de détection différent mais pas de seuil de détection du tout. Il est peu probable que les souris ne sentent pas du tout l'acide propionique étant donné l'odeur particulièrement intense de cet odorant à fortes concentrations.

La deuxième hypothèse tient dans notre méthode de quantification du temps passé par l'animal au-dessus du trou odorisé. Cependant, le protocole étant le même que pour celui de

notre test de discrimination (et validé sans le moindre problème pour ce dernier), il n'y a aucune raison qu'il soit mis en cause dans la non-réussite de ce test.

Une troisième hypothèse serait le plus faible nombre d'animaux utilisés dans notre essai que dans l'étude de Mandairon et collaborateurs (13 souris pour nous contre 20 souris de leur côté). Cependant, là encore, 13 animaux devraient être suffisants pour faire apparaître une tendance, même non significative, alors que nous avons clairement une absence totale d'effet. Il faut aussi signaler que les expériences menées par Mandairon et collaborateurs ont eu lieu durant la phase de repos des animaux, ce qui constitue une différence majeure avec notre étude.

Une dernière possibilité serait un stress plus important de nos animaux qui masquerait complètement l'effet escompté du seuil de détection. Il est possible que le fait de retirer la nourriture des animaux une heure auparavant induise un stress chez nos souris. De même, il est possible que des souris plus jeunes puissent manifester un stress plus important que des animaux plus âgés. Enfin, une étude récente a mis en évidence que les expérimentateurs de sexe masculin induisaient un stress plus important chez des souris que les expérimentateurs de sexe féminin (Sorge et al., 2014). Les expériences menées par Mandairon et collaborateurs ont été effectuées par des femmes, or le test de détection dans notre laboratoire a été testé par trois expérimentateurs différents, tous des hommes.

Il serait donc possible que le stress des animaux soit suffisant pour masquer un effet comportemental. Si des mesures ont été prises pour limiter le stress des animaux (un seul expérimentateur pour toutes les expériences, habituation à la salle d'expérimentation, habituation au dispositif expérimental), il est difficile de savoir si le simple fait que les expériences aient été menées par un homme pourrait influencer à ce point les résultats. Une solution pour tester de nouveau ce problème serait, comme les auteurs de l'étude le proposent, de rester une demi-heure dans la salle d'expérimentations avec les animaux le temps que leur niveau de stress redescende. Cette étude ayant été publiée bien après nos essais du test de détection, cette dernière solution n'a pas été testée.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc décidé de nous concentrer sur la deuxième modalité qui était testée en parallèle du test de détection : le test de discrimination utilisant un protocole d'habituation / déshabituation.

II. Test d'habituation / déshabituation (discrimination olfactive)

Principe

De même que pour le test de détection, la discrimination olfactive des animaux a été mesurée grâce à un test ne faisant appel ni à un apprentissage, ni à un système de récompense alimentaire et ne nécessitant pas de mettre les animaux sous restriction hydrique. Ici, nous avons choisi un test d'habituation / déshabituation, qui est une tâche

spontanée se basant sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer une nouvelle odeur dans leur environnement (Gregg and Thiessen, 1981).

Ce test peut être réalisé directement dans la cage des animaux (Yang and Crawley, 2009), mais nous avons préféré utiliser un système plus contrôlé, adapté une fois encore de Mandairon et collaborateurs (Mandairon et al., 2009). La même enceinte de test que pour le test de détection a été utilisée, sauf que cette fois-ci, au lieu d'utiliser des concentrations croissantes d'un unique odorant, deux odorants différents sont utilisés. Le test se compose de 4 essais successifs avec un premier odorant suivi d'un essai avec un deuxième odorant.

Lors des 4 essais avec le premier odorant, les animaux vont passer de moins en moins de temps à explorer le trou odorisé, l'odorant perdant son caractère de nouveauté. Le temps d'exploration va donc diminuer au fil des essais, c'est la phase d'habituation. Lorsque le deuxième odorant est présenté, deux cas de figures peuvent se présenter. Si l'animal ne fait pas la différence entre les deux odorants (*i.e.* ne discrimine pas les deux odorants), le temps d'exploration va rester bas. Si, au contraire, l'animal fait la différence entre les deux odorants, le temps d'exploration va augmenter ; c'est la phase de déshabituatation (Figure 33).

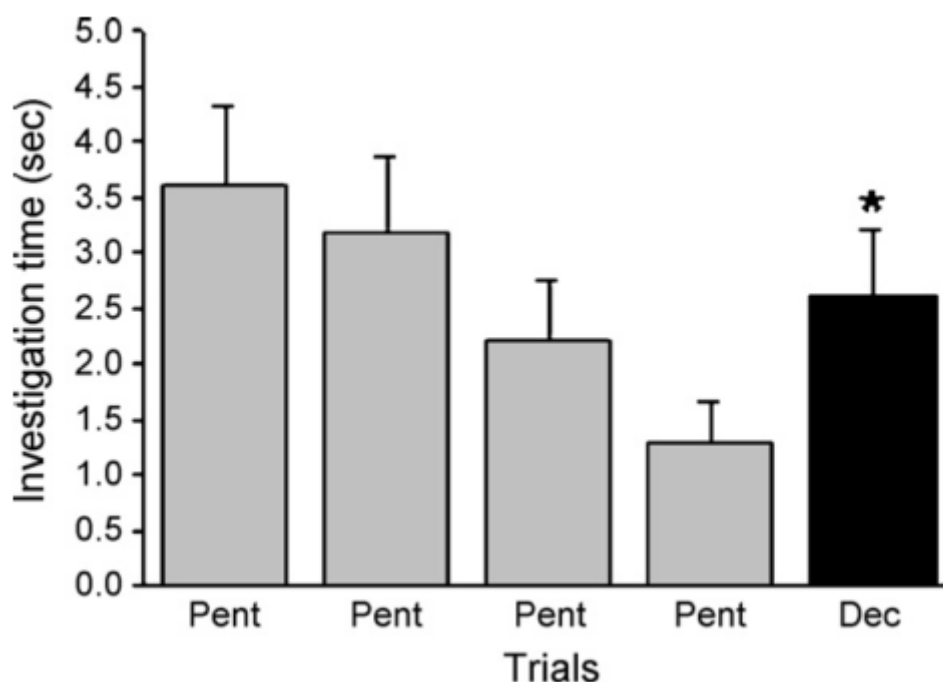


Figure 33 : Résultats attendus pour le test d'habituation / déshabituatation. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem et représentent le temps d'exploration du trou odorisé en fonction des essais avec les deux odorants (pentanol et décanal) dilués dans l'huile minérale afin d'avoir une pression de vapeur identique. Le temps d'exploration augmente significativement entre le dernier essai au pentanol et l'essai avec le décanal. D'après (Mandairon et al., 2009).

Protocole

Afin de réaliser ce test, il est primordial que les intensités des deux odorants soient similaires. Dans le cas contraire, l'animal pourrait explorer plus un odorant avec une intensité plus importante, ce qui masquerait complètement l'effet que nous cherchons à mettre en évidence. C'est pour cela qu'il faut diluer chaque odorant par rapport à sa pression de vapeur afin de les équilibrer. Plus les odorants sont proches structurellement et plus le test sera difficile à réaliser pour les animaux (Linster et al., 2001).

Ici, nous avons volontairement choisi deux odorants très différents structurellement et dont les propriétés olfactives sont également fortement dissemblables : l'octanol et l'acétophénone (Figure 34). Ces deux odorants appartiennent à deux classes chimiques différentes (respectivement alcool et cétone aromatique) et l'acétophénone possède un cycle aromatique, à la différence de l'octanol. Les deux composés sont classifiés comme ayant une odeur caractéristique, bien que celle-ci ne soit pas forcément identifiable.

Nous avons dilué ces odorants dans l'huile minérale de façon à ce que leur pression de vapeur soit identique et d'une valeur de 1 Pa (dilution octanol : 1/13 et dilution acétophénone : 1/43). Cette valeur a été choisie de manière arbitraire mais volontairement haute afin d'être sûr que le seuil de détection de chaque odorant soit atteint par les animaux.

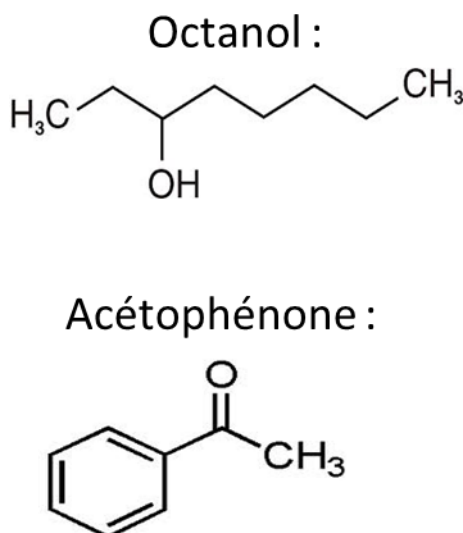


Figure 34 : Structures chimiques des odorants utilisés pour le test d'habituation / déshabituation.

De même que pour le test de détection, les animaux étaient habitués au dispositif comportemental les trois jours précédant le premier test. Respectivement, les animaux devaient faire 3, 5 puis 6 passages avec le bécher contenant 100 μ l d'huile minérale, une heure après le retrait de la nourriture. Une fois encore, le jour du test (le matin durant la

phase d'activité des animaux), les animaux étaient placés en cage individuelle et leur nourriture retirée une heure avant le début des expérimentations.

Le test en lui-même consistait en six essais successifs de 3 minutes avec 4 minutes de repos entre chaque essai (un deuxième animal réalisant le test dans l'intervalle). Afin de ne pas exposer les animaux aux deux odorants (devant garder un caractère de nouveauté), ces derniers étaient préparés dans une autre salle. Le premier essai consistait en 100 µl d'huile minérale, les quatre suivants en 100 µl d'octanol et le dernier essai en 100 µl d'acétophénone.

Les deux caractéristiques essentielles pour considérer le test comme une réussite sont : une habituation normale (soit une diminution du temps d'exploration entre le premier et le dernier essai à l'octanol) et une déshabituatation normale (soit une augmentation du temps d'exploration entre le dernier essai à l'octanol et l'essai à l'acétophénone) (Yang and Crawley, 2009).

Détermination des critères pour l'analyse des données

Comme expliqué précédemment, les animaux étaient filmés durant toute la durée des expérimentations et les films analysés grâce à un logiciel créé sous matlab. Ce logiciel permet de suivre le déplacement des animaux dans l'enceinte de test et de quantifier plusieurs variables d'exploration du trou odorisé. Cependant, il nous est rapidement apparu qu'il arrivait fréquemment que les animaux passent au-dessus du trou odorisé sans forcément s'arrêter pour le flairer. De même, les animaux pouvaient également se retourner en cours de flairage sans forcément quitter la zone d'intérêt. Dans les deux cas, notre logiciel allait compter des visites inexistantes.

Nous avons donc cherché des critères pour déterminer ce qu'était au juste une « visite » de l'animal au-dessus du trou odorisé. Nous avons décidé, de façon empirique, que deux visites étaient considérées comme indépendantes si elles étaient espacées de plus de deux secondes. Le temps nécessaire à une souris pour se tourner sur elle-même est bien inférieur à deux secondes mais il lui faut plusieurs secondes pour quitter la zone centrale (où se situe le trou odorisé) et y revenir par la suite.

Le deuxième critère important a été de déterminer à partir de quelle durée de visite pouvait-on considérer que la souris avait le temps nécessaire pour se pencher et flairer l'odeur dans le trou odorisé. Pour tester ce paramètre, les souris ont réalisé le test classique d'habituation / déshabituatation avant la mise sous régime et les données ont été analysées (sans tenir compte du groupe expérimental auquel chaque animal appartenait) en utilisant plusieurs « seuils de visite ». Nous avons considéré que le temps nécessaire devait se situer entre une demi-seconde et une seconde et avons testé trois seuils possibles : 500, 700 et 900 ms.

Trois critères ont été analysés pour chaque seuil : le temps total de visite, le nombre de visites et la durée moyenne de chaque visite. Il nous est rapidement apparu que le nombre de visites n'était pas un critère informatif, ce dernier n'étant absolument pas modifié entre les différents essais (résultats non montrés). Pour la suite de l'étude, nous avons donc analysés le temps total d'exploration ainsi que la durée moyenne de chaque visite.

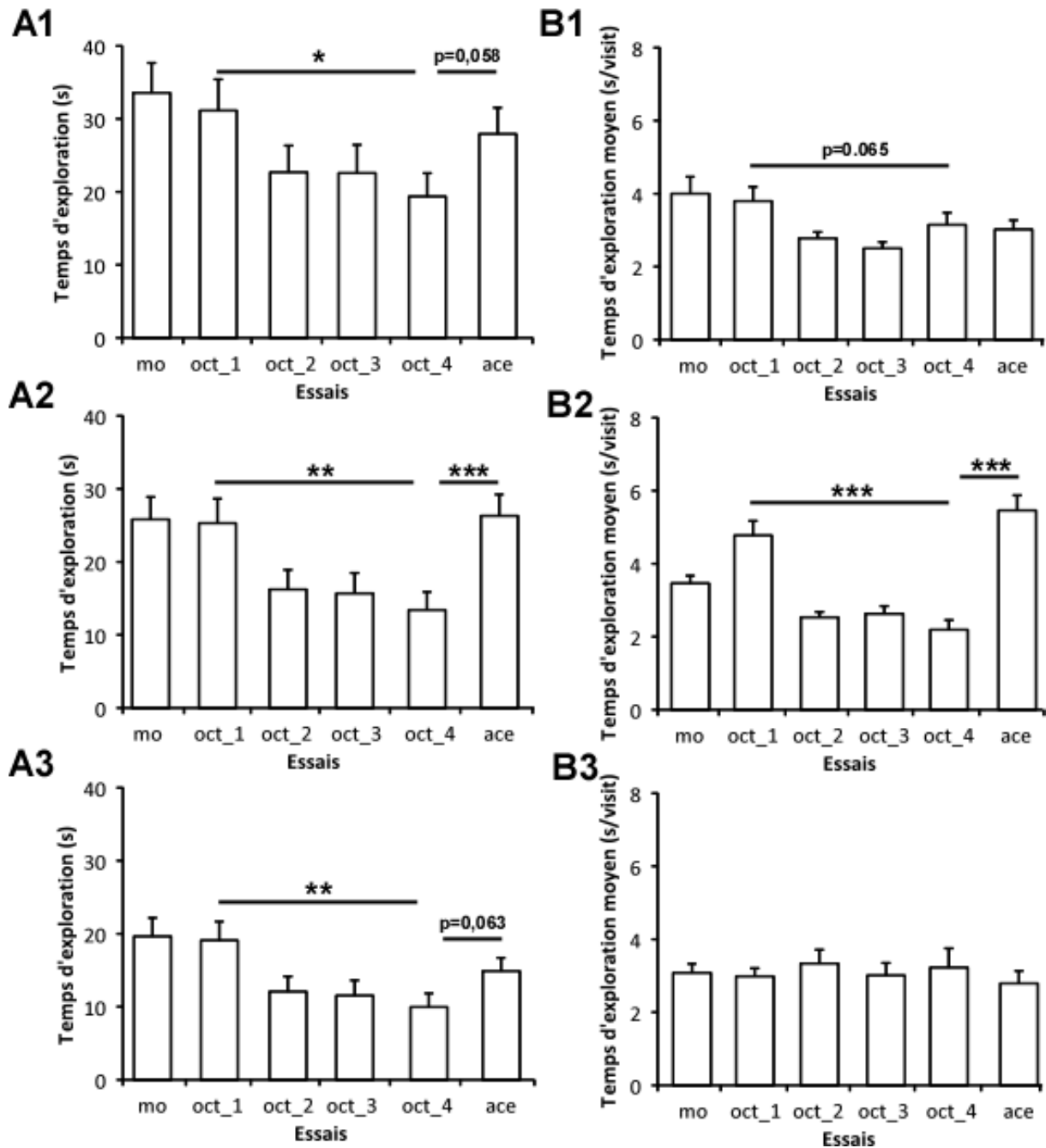


Figure 35 : Détermination du seuil de visite pour le test d'habituation / déshabituaiton. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps d'exploration du trou odorisé par les souris (n=23). A. Temps d'exploration total. B. Durée de visite moyenne. 1. Seuil de 500 ms. 2. Seuil de 700 ms. 3. Seuil de 900 ms. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. mo : huile minérale, oct : octanol et ace : acétophénone.

Quel que soit le seuil utilisé pour le temps total d'exploration, les animaux semblent capables de discriminer les deux odorants. Plus le seuil est élevé et plus le temps d'exploration total diminue, ce qui est parfaitement logique puisque la valeur seuil est plus difficile à atteindre. De façon plus détaillée, lorsque le seuil est fixé à 500 ms, le temps d'exploration total des animaux dépend des essais ($F_{(5,85)} = 2,78$; $p < 0,05$) (Figure 35.A1). Les critères importants sont ici atteints, à savoir une habituation et une déshabituatation normales (respectivement, $p < 0,05$ et $p = 0,058$). Lorsque le seuil est fixé à 700 ms, le temps d'exploration dépend également des essais ($F_{(5,85)} = 5,47$; $p < 0,001$) et les animaux montrent une phase d'habituation et de déshabituatation normales (respectivement, $p < 0,01$ et $p < 0,001$) (Figure 35.A2). Le même phénomène est constaté lorsque le seuil de visite est placé à 900 ms ($F_{(5,85)} = 4,3$; $p < 0,01$ et pour les phases d'habituation / déshabituatation : $p < 0,01$ et $p = 0,063$) (Figure 35.A3).

Lorsqu'on considère la durée moyenne de chaque visite, les résultats varient fortement en fonction du seuil utilisé. Si on place celui-ci à 500 ms, la durée moyenne de visite est toujours dépendante de l'essai ($F_{(5,85)} = 3,24$; $p < 0,01$) (Figure 35.B1). Les animaux ont toujours une phase d'habituation normale ($p = 0,065$) mais ne montrent pas du tout d'augmentation du temps d'exploration lors de la phase de déshabituatation ($p = 0,75$). Lorsque le seuil de visite est placé à 700 ms, la durée moyenne de visite est aussi dépendante des essais ($F_{(5,85)} = 19,91$; $p < 0,001$) et les animaux font preuve d'une habituation et d'une déshabituatation normales ($p < 0,001$ dans les deux cas) (Figure 35.B2). En revanche, si le seuil de visite est placé à 900 ms, la durée moyenne de visite n'est plus du tout dépendante des essais ($F_{(5,85)} = 0,47$; $p = 0,79$) (Figure 35.B3).

En prenant en compte ces deux critères, nous avons donc décidé de placer le seuil de visite à 700 ms et ce paramètre a été utilisé pour toutes les analyses (discrimination et détection). Ces tests nous ont donc permis de valider notre logiciel d'analyse sous matlab, nous permettant d'avoir à notre disposition des valeurs objectives ne dépendant pas de l'expérimentateur. Tous les résultats qui seront présentés par la suite ont été analysés en utilisant aussi bien le temps total d'exploration que le temps moyen de chaque visite, mais, pour plus de clarté, je ne présenterai que les résultats obtenus pour le temps d'exploration total.

La deuxième information d'importance que l'on peut tirer de ce test est la validation du choix des odorants. En effet, nos animaux manifestant des phases d'habituation et de déshabituatation normales, ils sont parfaitement capables de faire la différence entre l'octanol et l'acétophénone. Etant données les différences de structures et de propriétés olfactives des deux odorants, cela ne constitue en rien une surprise. Nous avons donc séparé les animaux en deux groupes distincts et mis une partie d'entre eux sous HFruD. Le test d'habituation / déshabituatation a de nouveau été effectué après 4 et après 8 semaines de régime.

Résultats

La première chose que nous avons faite a été de vérifier que les deux groupes d'animaux étaient capables de discriminer les deux odorants avant la mise sous régime (étant donnés les résultats précédents, le contraire eût été surprenant). C'est donc sans surprise que l'on ne retrouve aucun effet du groupe expérimental sur la capacité des animaux à discriminer les deux odorants ($F_{(1,43)} = 0,03$; $p = 0,86$) (Figure 36.A). Les animaux contrôle comme les animaux HFruD s'habituent bien à l'octanol ($p < 0,001$ pour les deux groupes) et montrent une phase de déshabitude normale ($p < 0,001$ pour les deux groupes).

Après 4 semaines de régime, en revanche, le régime a un effet sur le temps d'exploration total des animaux en fonction des essais ($F_{(1,42)} = 12,35$; $p < 0,05$) (Figure 36.B). Si les deux groupes continuent d'avoir une phase d'habitude normale ($p < 0,001$ pour les deux groupes), seuls les animaux contrôle montrent une augmentation du temps d'exploration pour l'essai avec l'acétophénone ($p < 0,001$ vs $p = 0,93$ pour les animaux HFruD). Ces résultats se maintiennent après 8 semaines de régime où l'on retrouve l'effet général du régime sur le temps d'exploration des animaux ($F_{(1,27)} = 8,01$; $p < 0,01$) (Figure 36.C). Une fois de plus, si les deux groupes s'habituent à l'octanol ($p < 0,001$ pour les deux groupes), le temps d'exploration pour l'acétophénone n'augmente que chez les animaux contrôle ($p < 0,001$ vs $p = 0,6$ pour les animaux HFruD).

Comme précisé auparavant, les facteurs les plus importants à prendre en compte sont des phases d'habitude et de déshabitude normales. Afin d'être capable d'évaluer ces paramètres de façon longitudinale (et pas uniquement au cours d'une seule session expérimentale), un ratio d'habitude (dernier essai à l'octanol sur premier essai à l'octanol) et un ratio de déshabitude (essai à l'acétophénone sur dernier essai à l'octanol) ont été calculés pour chaque animal. Cette représentation nous permet de voir l'effet du régime entre les points avant la mise sous régime et 4 et 8 semaines plus tard.

Le ratio d'habitude n'est pas modifié par la mise sous régime ($F_{(1,21)} = 1,3$; $p = 0,27$) (Figure 36.D). En revanche le ratio de déshabitude est clairement dépendant du régime alimentaire ($F_{(1,20)} = 6,09$, $p < 0,05$) (Figure 36.E). De façon plus détaillée, on se rend compte que le ratio de déshabitude est plus faible pour les animaux HFruD que pour les animaux contrôle après 4 et 8 semaines de régime (respectivement, $p < 0,01$ et $p < 0,001$). Si on compare chaque animal avec lui-même lors de la session avant la mise sous régime, on se rend compte que le ratio de déshabitude (et donc la capacité de discrimination des animaux) ne change pas pour les animaux contrôle après 4 et 8 semaine de régime (respectivement, $p = 0,44$ et $p = 0,19$) alors qu'il est clairement diminué pour les animaux HFruD après 4 et 8 semaines de régime ($p = 0,07$ et $p < 0,05$). Le ratio reste le même chez les animaux HFruD entre 4 et 8 semaines de régime ($p = 0,81$).

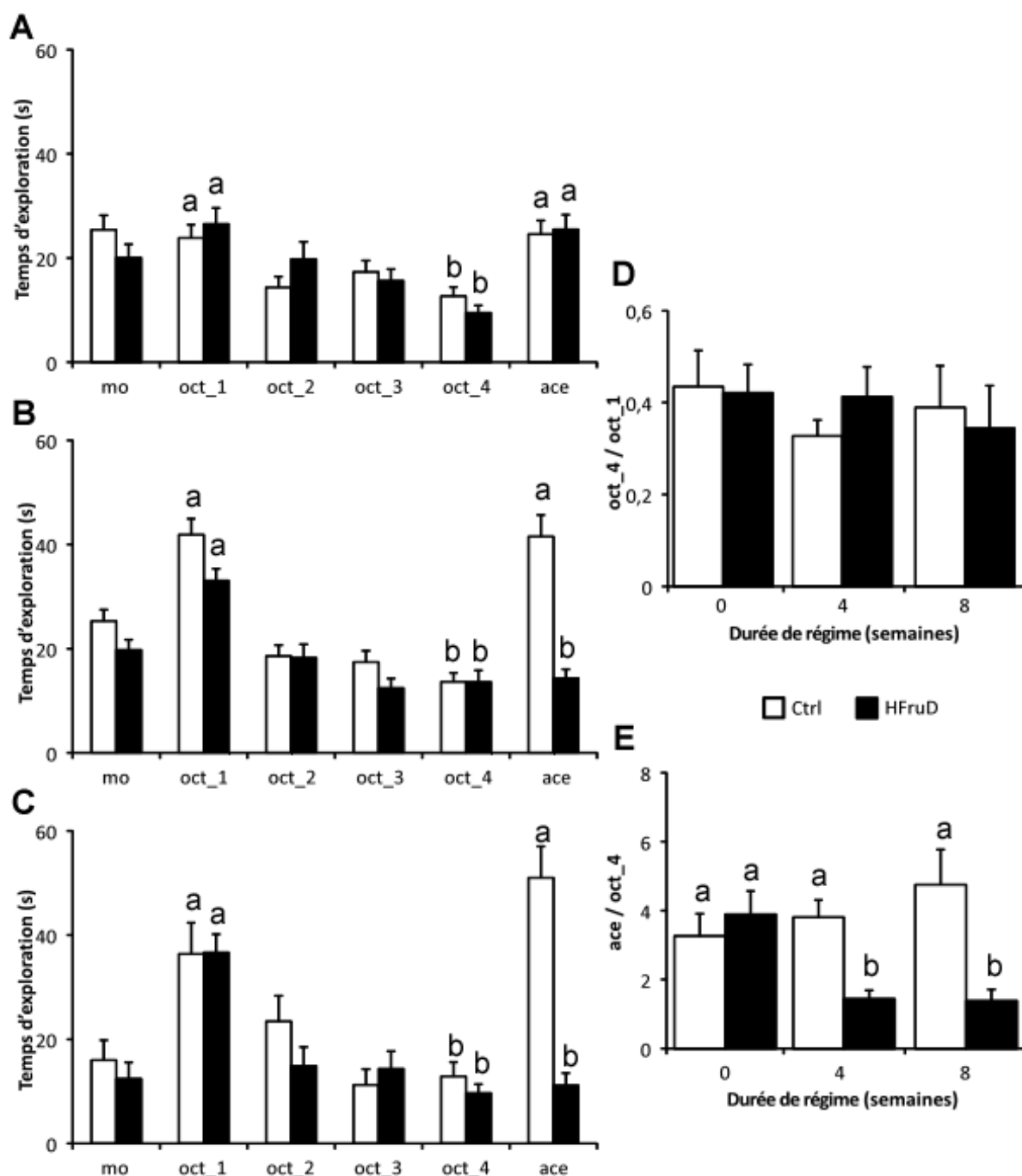


Figure 36 : Résultats du test d'habituation / déshabitude après un régime enrichi en fructose.

Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps total d'exploration du trou odorisé par les souris contrôle en blanc (n=28) et HFruD en noir (n=28). A. Test avant mise sous régime. B. Test après 4 semaines de régime. C. Test après 8 semaines de régime. D. Ratio d'habituation. E. Ratio de déshabitude. Les valeurs avec différents exposants diffèrent significativement après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. mo : huile minérale, oct : octanol et ace : acétophénone.

En conclusion de cette expérience, les capacités de discrimination des animaux pour ce couple d'odorant sont clairement réduites après 4 à 8 semaines sous régime enrichi en fructose. Il ne semble pas non plus y avoir d'aggravation du phénomène entre 4 et 8

semaines de régime. Un autre point qui semble intéressant est que le temps d'exploration des animaux pour le premier essai à l'octanol (et pour l'essai à l'acétophénone pour le groupe contrôle) semble augmenté entre la session avant la mise sous régime et les sessions suivantes. Il est possible que, les animaux ayant déjà été en contact avec cet odorant une première fois, celui-ci ne soit plus totalement nouveau et aurait acquis une certaine familiarité (ce qui pourrait expliquer une exploration plus importante de l'odorant).

Le temps d'exploration de l'acétophénone pourrait augmenter pour les mêmes raisons. Dans tous les cas, ce dernier est toujours similaire au temps d'exploration pour le premier essai à l'octanol chez les animaux contrôle. L'habituation n'étant pas modifiée entre les différentes sessions, cela ne remet pas en cause les résultats du test d'habituation / déshabituation.

Contre balancement

Une autre possibilité qui pourrait, elle, remettre ces résultats en question serait, non pas une baisse des capacités de discrimination olfactive, mais une baisse de la détection de l'acétophénone par les animaux HFruD. Afin d'être certains que nos résultats n'étaient pas dus à cette possibilité, une expérience dite de « contre balancement » a été effectuée. Cette expérience consiste à réaliser le même test (avec un lot différent d'animaux) en inversant l'ordre de présentation des odorants. Cette fois-ci l'acétophénone a été utilisé comme odorant d'habituation et l'octanol comme odorant de déshabituation.

Une fois encore, il n'y a pas de différence du temps d'exploration du trou odorisé entre les deux groupes d'animaux avant la mise sous régime ($F_{(1,35)} = 1,76$; $p = 0,19$) (Figure 37.A). Les animaux sont parfaitement capables de discriminer les deux odorants lorsqu'ils sont présentés dans le sens contraire, comme le prouvent une habituation ($p < 0,001$ pour les deux groupes) et une déshabituation normales ($p < 0,001$ pour les deux groupes).

Par la suite, on retrouve le même profil que lors de l'expérience précédente. Après 4 semaines, le régime a un effet sur le temps d'exploration total des animaux en fonction des essais ($F_{(1,27)} = 7,08$; $p < 0,05$) (Figure 37.B). Si les deux groupes continuent d'avoir une phase d'habituation normale ($p < 0,001$ pour les deux groupes), seuls les animaux contrôle montrent une augmentation du temps d'exploration pour l'essai avec l'octanol ($p < 0,001$ vs $p = 0,3$ pour les animaux HFruD). Ces résultats se maintiennent après 8 semaines de régime où l'on retrouve l'effet général du régime sur le temps d'exploration des animaux ($F_{(1,30)} = 10,23$; $p < 0,01$) (Figure 37.C). Une fois de plus, si les deux groupes s'habituent à l'acétophénone ($p < 0,001$ pour les deux groupes), le temps d'exploration pour l'octanol n'augmente que chez les animaux contrôle ($p < 0,001$ vs $p = 0,31$ pour les animaux HFruD).

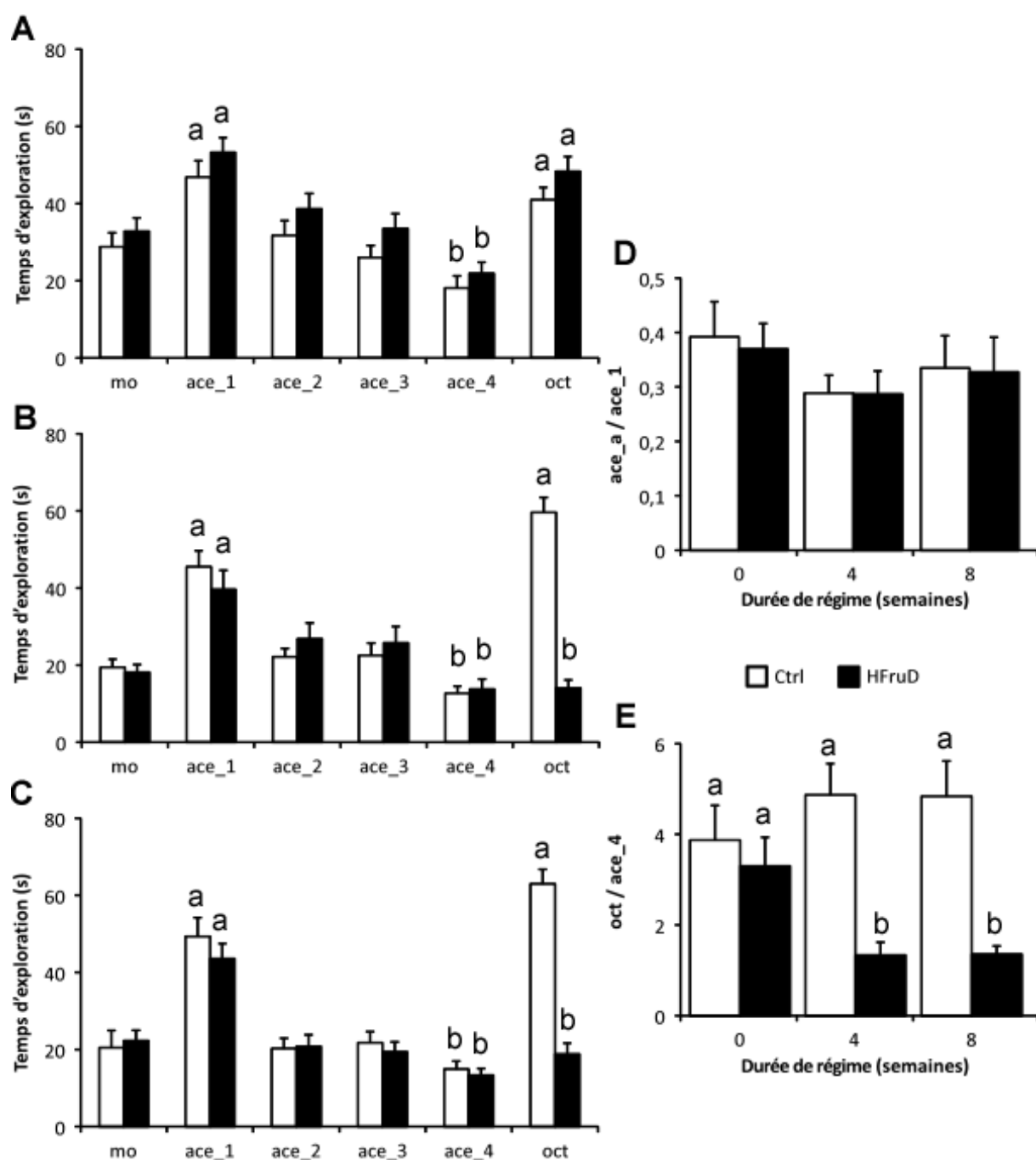


Figure 37 : Résultats du test de « contre balancement ». Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps total d'exploration du trou odorisé par les souris contrôle en blanc (n=20) et HFruD en noir (n=23). A. Test avant mise sous régime. B. Test après 4 semaines de régime. C. Test après 8 semaines de régime. D. Ratio d'habituation. E. Ratio de déshabitude. Les valeurs avec différents exposants diffèrent significativement après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer. mo : huile minérale, oct : octanol et ace : acétophénone.

Le ratio d'habituation n'est pas non plus modifié par la mise sous régime ($F_{(1,23)} = 0,34$; $p = 0,56$) (Figure 37.D). En revanche le ratio de déshabitude est clairement dépendant du régime alimentaire ($F_{(1,19)} = 25,86$, $p < 0,001$) (Figure 37.E). De façon plus détaillée, on se rend compte que le ratio de déshabitude est plus faible pour les animaux HFruD que pour les

animaux contrôle après 4 et 8 semaines de régime (respectivement, $p < 0,001$ et $p < 0,01$). Si on compare chaque animal avec lui-même lors de la session avant la mise sous régime, on se rend compte que le ratio de déshabitude (et donc la capacité de discrimination des animaux) ne change pas pour les animaux contrôle après 4 et 8 semaine de régime (respectivement, $p = 0,27$ et $p = 0,45$) alors qu'il est clairement diminué pour les animaux HFruD après 4 et 8 semaines de régime ($p < 0,05$ et $p = 0,063$). Le ratio reste le même chez les animaux HFruD entre 4 et 8 semaines de régime ($p = 0,8$).

En conclusion, lorsque l'on change l'ordre de présentation des odorants, cela n'a pas d'influence sur le profil des résultats obtenus. Cela signifie que les résultats de l'étude précédente ne sont pas dus à une baisse de la détection de l'acétophénone et donc, très probablement, sont plutôt dus à une diminution des capacités discriminatives des souris sous HFruD. Néanmoins, ces dernières n'ont été testées que pour un seul couple d'odorants ici. Afin d'être sûrs de ces résultats, il serait bien de refaire cette expérience en utilisant un autre couple d'odorants.

Une autre possibilité serait que le régime enrichi en fructose modifierait les capacités discriminatives des animaux en général et pas uniquement au niveau olfactif. Afin de tester cette hypothèse, le même test d'habituation / déshabitude pourrait être réalisé en utilisant, non pas un couple d'odorants, mais un couple de stimuli visuels par exemple (deux objets de forme et / ou de couleurs différentes). Ici, le temps nous a manqué pour mettre au point ce test et adapter notre logiciel à cette étude particulière. Nous avons préféré utiliser le temps à notre disposition afin de réaliser un autre test olfactif chez nos animaux que je vais vous présenter dans la partie suivante.

III. Test de la nourriture enfouie ou buried food test

Principe

Classiquement les tests comportementaux chez l'animal de laboratoire sont classés en deux grands types de tests : les tests psychophysiques et les tests éthologiques. Les premiers sont des tests où l'environnement des animaux est hautement contrôlé par l'expérimentateur et permettent d'obtenir des résultats très précis pour une modalité particulière en contrôlant au maximum les sources de variations. Le test d'habituation / déshabitude rentre dans cette catégorie car on s'intéresse à une modalité précise (la tâche de discrimination olfactive) en contrôlant bien le maximum de paramètres (la concentration en odorants notamment).

Les tests éthologiques s'intéressent plus à tester les comportements « naturels » des animaux, au détriment de la maîtrise des facteurs environnementaux. Ici, nous avons décidé d'utiliser le test du buried food, qui s'appuie sur la tendance naturelle des animaux à enfouir leurs aliments et à creuser pour chercher leur nourriture en général (Edwards et al., 1972; Albrecht et al., 2009). Ce test consiste donc à cacher de la nourriture sous la litière des

animaux et à mesurer le temps nécessaire aux animaux pour retrouver la nourriture en question. Ici, on s'intéresse donc à un comportement naturel des souris au détriment de pouvoir contrôler la quantité en odorants (impossible à quantifier quand on utilise un objet alimentaire en guise de stimulus).

Nous avons donc décidé d'adapter un protocole classique de buried food (Yang and Crawley, 2009) en changeant plusieurs paramètres. Ce test est une expérience classique qui permet de tester les capacités olfactives des animaux de façon générale et a été très utilisée pour voir si un animal est ou non anosmique. Cependant, il peut aussi être utilisé pour obtenir une mesure globale de l'acuité olfactive des animaux et est d'autant plus intéressant dans le contexte de notre étude puisque nous avons vu précédemment que les réponses des animaux en fonction de leur état nutritionnel peuvent être différentes pour des odeurs neutres ou des odeurs alimentaires. Ce test peut être réalisé de différentes façons (avec ou sans répétition, dans la cage des animaux ou dans une enceinte spéciale, etc...) et nous avons opté pour les caractéristiques décrites ci-après.

Protocole

Premièrement, la nature de l'objet alimentaire a été choisie avec précaution. Ce test est habituellement réalisé, soit avec une céréale chocolatée, avec du chocolat en lui-même ou encore avec une croquette habituelle des animaux. Ici, nous ne voulions pas utiliser le régime normal des animaux car celui-ci n'est pas le même entre nos deux groupes et l'objet à retrouver aurait donc été différent pour les souris du groupe contrôle et celles du groupe HFruD. De même, nous ne voulions pas utiliser un produit sucré comme ce qui est utilisé habituellement car nos animaux sous HFruD sont habitués à manger des croquettes très sucrées et cela aurait pu influencer leur capacité à localiser rapidement ce type de nourriture. Nous avons donc opté pour un fromage à pâte pressée, en l'occurrence des tranches de leerdammer^{MD} qui sont assez fines et peuvent se découper facilement et, surtout, il s'agit d'un type de fromage sentant relativement peu fort et ne coulant pas (cela peut paraître trivial mais il s'agit d'un point critique pour le déroulement correct de l'expérience). La seule étude que nous avons trouvée se rapprochant (et encore de loin) d'un tel stimulus utilisait un biscuit au fromage et au beurre de cacahuète (mais qui contenait donc aussi plus de sucre) (Getchell et al., 2006).

Afin d'habituer nos souris à ce type d'aliment, un morceau de fromage était déposé dans leur cage la veille de la première expérience et, si ce dernier avait été consommé durant la nuit, les souris pouvaient passer le test. Ici, nous nous intéressons à un comportement naturel des rongeurs ce qui fait que l'habituation au dispositif expérimental n'est pas forcément nécessaire. Nous avons cependant décidé de ne pas réaliser le test dans la cage des souris directement (car ces dernières sont alors en présence des odeurs de leurs compagnons de cage) mais dans une cage standard pour chaque animal (33*19*13 cm). La veille de l'expérience, les souris ont passé 30 minutes dans cette cage, ce qui leur a permis

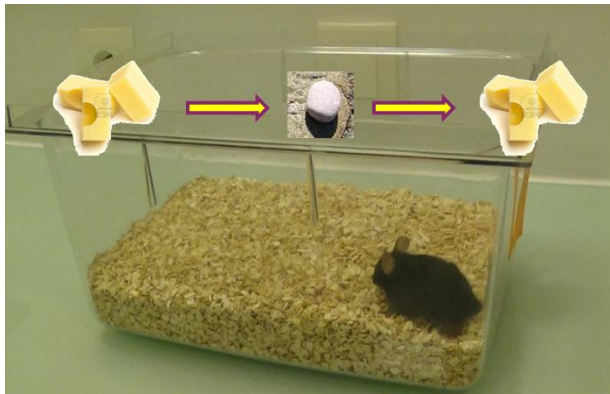
de déposer leur odeur, afin de limiter leur stress le jour des expériences (la même cage a ensuite été utilisée pour tester chaque souris avant la mise sous régime et après 4 et 8 semaines de régime).

Un autre point très important est que ce test est traditionnellement réalisé en mettant les animaux à jeun afin qu'ils soient motivés à chercher la nourriture. La durée de mise à jeun varie entre les études mais est, en général, supérieure ou égale à 12h. Ici, nous ne souhaitons pas soumettre nos animaux à une mise à jeun afin d'éviter d'avoir un effet confondant. Nous avons fait une première série d'expériences en retirant la nourriture des souris une heure avant le test (comme pour le reste des expériences) mais les essais n'étant pas concluants (résultats non montrés), nous avons décidé d'enlever la nourriture des animaux 5h avant le test, soit une durée suffisante pour que ces derniers soient motivés à chercher la nourriture mais une durée bien inférieure à celle utilisée habituellement.

Afin de ne pas associer la nourriture avec une récompense, le test était systématiquement arrêté avant que les animaux n'aient le temps de consommer le fromage et celui-ci ne leur était donné qu'au minimum une heure après la fin des expériences et pas de façon systématique, afin de ne pas générer d'association.

Les animaux étaient également mis au calme dans la salle de comportement une heure avant le début du test, afin de limiter leur stress. Toutes les expériences ont été réalisées pendant la phase d'activité des animaux, durant l'après-midi. Enfin, nous avons décidé d'utiliser, non seulement un objet alimentaire mais également un objet contrôle ne présentant aucune caractéristique olfactive (ou tout du moins alimentaire) pour les animaux. Nous avons choisi d'utiliser un petit caillou, de taille similaire au morceau de fromage, en s'inspirant de Das et collaborateurs qui avaient utilisé un morceau de mosaïque (Das et al., 2005). Les objets alimentaires et contrôle étaient enterrés sous 3 cm de litière (6 cm d'épaisseur de litière totale dans la cage test) et le test se décomposait entre un premier essai avec le fromage, un essai avec le caillou puis un deuxième essai avec le fromage (les souris étant autorisées à se reposer 3 minutes entre chaque essai). Les objets étaient placés aléatoirement dans la cage test dans l'une des 8 zones prédéfinies, l'animal étant placé au centre de la cage au début de l'expérience (Figure 38).

Les critères pour arrêter le test étaient les suivants : dès que la souris tenait l'objet entre ses pattes avant ou entre ses dents. Dans le cas contraire, le test s'arrêtait au bout de 10 minutes. Ici, l'unique critère mesuré est le temps de latence pour retrouver l'objet. Ce dernier n'étant pas aussi précis que le temps d'exploration d'un odorant, il a été mesuré manuellement à l'aide d'un chronomètre.



3	5	8
2		7
1	4	6

Figure 38 : Illustration du dispositif expérimental du buried food test. A gauche : photo d'une souris dans une cage de test. Le test se compose d'un premier essai avec du fromage, suivi d'un essai contrôle et enfin un dernier essai avec du fromage. A droite : schéma des zones possibles où cacher les objets à retrouver, ces derniers étant enterrés de façon aléatoire par tirage au sort.

Critères retenus pour l'analyse des données

Le placement aléatoire de l'objet est crucial pour ne pas biaiser les résultats car les souris vont spontanément aller creuser à l'endroit où elles auront déjà trouvé de la nourriture. Afin d'être sûrs que l'endroit choisi n'allait pas induire de biais sur le temps nécessaire pour retrouver l'objet, nous avons testé ce paramètre pour l'objet alimentaire et pour l'objet contrôle en séparant les zones en deux catégories : les zones situées dans un coin de la cage et celles situées sur les bords (choix basé sur l'observation que les souris semblent passer plus de temps à creuser vers les coins de la cage). La double présentation du fromage a été utilisée car le premier essai peut être biaisé par le stress de l'animal. De plus, une fois le fromage retrouvé, l'animal va spontanément creuser plus car il sait qu'il y a quelque chose à trouver dans la cage. Nous avons donc testé ces paramètres avant de réaliser le test afin de bien choisir les critères mesurés.

Le temps de latence nécessaire pour retrouver le fromage est près de deux fois inférieur lors du deuxième essai que lors du premier essai ($p < 0,001$) (Figure 39.A). Cela peut être expliqué par un stress plus important des animaux durant le premier essai ou alors par le fait que les souris sachant qu'il y a quelque chose à trouver dans la cage après le premier essai, elles vont explorer plus rapidement la cage de test afin de trouver la nourriture. Pour la suite des expériences, nous avons donc décidé de ne prendre en compte que les résultats du deuxième essai, étant moins variables que ceux du premier essai et probablement moins impactés par le stress ressenti par l'animal.

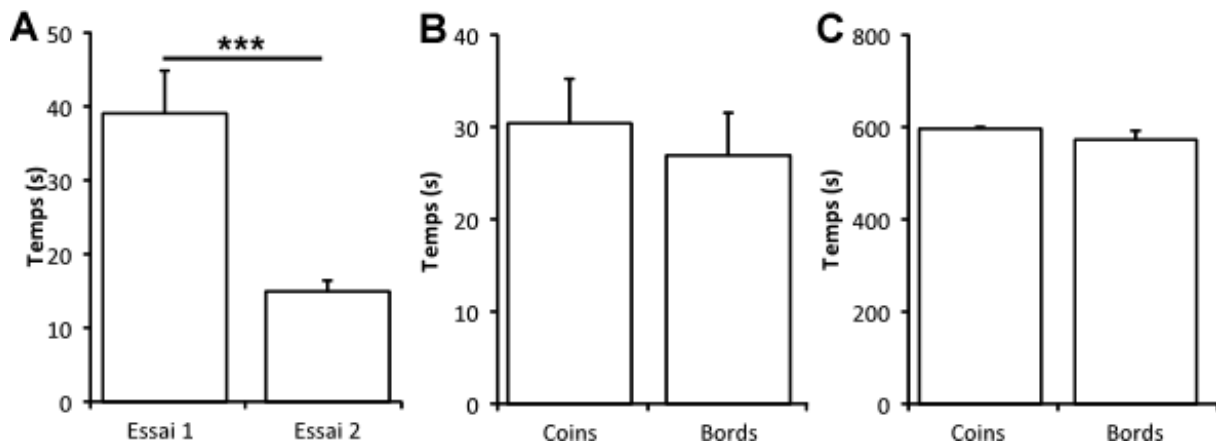


Figure 39 : Essais pour le test du buried food. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps de latence pour retrouver l'objet. A. Test entre le premier essai et le deuxième essai avec du fromage, toutes zones confondues (n=35). B. Test avec le fromage enterré dans les coins (n=36) ou vers les bords (n=34). C. Test avec le caillou enterré dans les coins (n=16) ou vers les bords (n=19). *** : $p < 0,001$ après un test t de Student sur données appariées.

Concernant un possible effet de la zone choisie pour enterrer l'objet celle-ci n'a pas d'effet ni pour l'objet alimentaire ($p = 0,62$) (Figure 39.B) ni pour l'objet contrôle ($p = 0,51$) (Figure 39.C). Ce critère n'a donc pas été pris en compte dans les analyses suivantes. La première chose qu'on peut remarquer avec ce test, est que l'essai avec le caillou est toujours proche du temps maximal autorisé (600 s). L'objet contrôle n'ayant pas de valeur alimentaire pour l'animal (et probablement pas de valeur olfactive), l'animal ne peut le trouver que grâce à la chance. La chance de retrouver un caillou mesurant environ 5*5*2 mm dans environ 3,5 litres de litière totale étant somme toute assez faible, cela est assez peu surprenant et constitue donc un bon contrôle pour cette expérience.

Résultats

Par la suite, les animaux ont été répartis en deux groupes et testés après 4 et 8 semaines de régime. Un effet du régime est retrouvé sur le temps nécessaire aux animaux pour retrouver un objet alimentaire ($F_{(1,28)} = 24,28$, $p < 0,001$) (Figure 40.A). Si le temps nécessaire pour retrouver l'objet alimentaire n'est pas différent entre les deux groupes avant la mise sous régime ($p = 0,79$), il est deux fois plus long pour les animaux HFruD après 4 semaines de régime ($p < 0,05$) et 4 fois plus long après 8 semaines de régime ($p < 0,001$). Si on compare chaque animal par rapport à sa valeur de base, on voit que le temps nécessaire pour retrouver le fromage ne varie pas pour les animaux contrôle après 4 et 8 semaines de régime (respectivement, $p = 0,81$ et $p = 0,91$) alors qu'il est augmenté pour les animaux HFruD après 4 et 8 semaines de régime (respectivement, $p < 0,01$ et $p < 0,001$). De façon intéressante, le temps de latence est également augmenté pour les animaux HFruD entre 4 et 8 semaines de régime ($p < 0,001$). De plus, le temps nécessaire pour retrouver un objet contrôle n'est pas dépendant du régime alimentaire ($F_{(1,26)} = 0,05$; $p = 0,82$) (Figure 40.B).

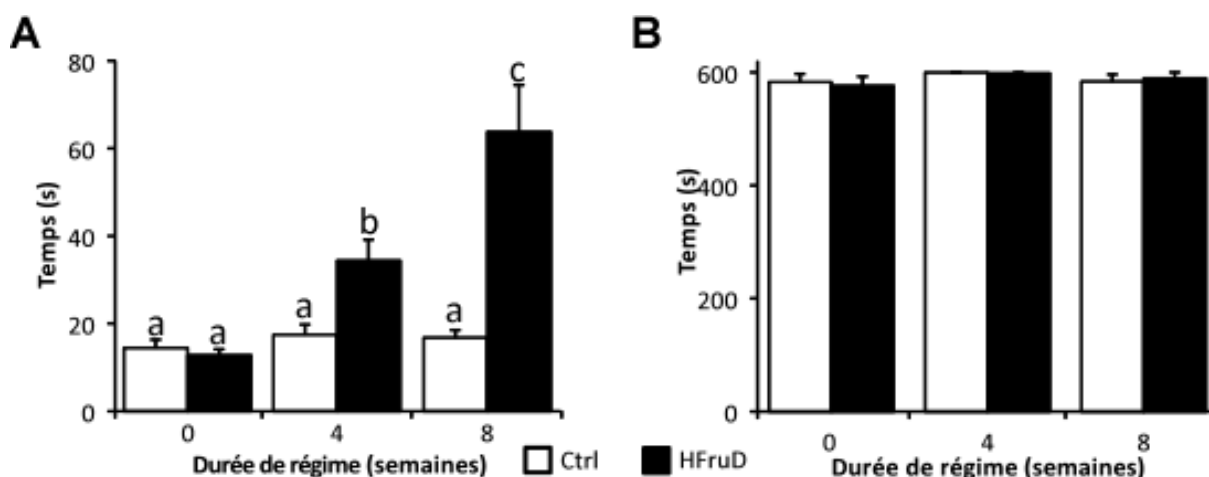


Figure 40 : Résultats du test du buried food. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps de latence pour retrouver les objets par les souris contrôle en blanc (n=17) et HFruD en noir (n=17). A. Temps de latence pour retrouver l'objet alimentaire B. Temps de latence pour retrouver l'objet contrôle. Les valeurs avec différents exposants diffèrent significativement après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer.

On peut donc conclure de cette expérience que les animaux sous HFruD présentent une diminution globale de leurs capacités olfactives pour une odeur alimentaire. Il est aussi intéressant de noter que cette altération de leurs capacités olfactives s'aggrave entre 4 et 8 semaines de régime.

Néanmoins, il est parfaitement possible que cette augmentation du temps de latence des animaux à retrouver de la nourriture soit due à une diminution de leur motivation à rechercher la nourriture. En effet, comme indiqué en préambule de ce chapitre, lorsqu'une récompense alimentaire est nécessaire au bon fonctionnement d'un test, il convient de mesurer la motivation des animaux à chercher de la nourriture. Ici, les animaux ne reçoivent pas à proprement parler de récompense alimentaire mais il est possible que les 5h passées sans nourriture avant le test n'aient pas le même effet sur la motivation des animaux à chercher l'objet alimentaire pendant le test.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé le même type de test en utilisant, une fois de plus, le fromage comme stimulus olfactif mais également comme stimulus visuel. Pour ce faire, les souris ont été placées (5h après le retrait de la nourriture) dans une enceinte de test plus grande (42*26*19 cm) et le fromage a été placé de façon aléatoire au-dessus de la litière. De cette façon, les souris sont en mesure de localiser le fromage grâce à des indices olfactifs et visuels (ce qui ne présente aucune difficulté) et le temps de latence avant qu'elles ne s'emparent du fromage est alors plus dépendant de leur motivation à chercher de la nourriture que de leurs capacités olfactives. Le test a été effectué de la même façon que le test du buried food (2 essais fromage) mais uniquement après 8 semaines de régime. Le critère d'arrêt était cette fois-ci la consommation du fromage.

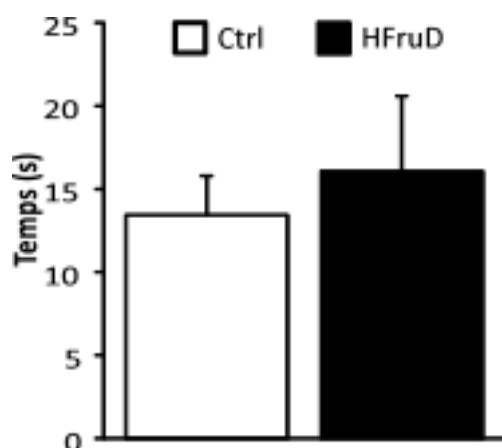


Figure 41 : Résultat du test de motivation à chercher de la nourriture. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent le temps de latence pour retrouver un morceau de fromage visible par les souris contrôle en blanc (n=9) et HFruD en noir (n=12).

Il apparaît clairement que le temps nécessaire aux souris pour retrouver un morceau de fromage visible n'est pas différent pour les animaux contrôle et pour les animaux HFruD ($p = 0,91$ après un test de Mann-Whitney) (Figure 41). Il nous paraît donc raisonnable de conclure que le régime enrichi en fructose ne semble pas avoir d'influence sur la motivation des animaux à chercher de la nourriture, ce qui est également cohérent avec le fait que la prise alimentaire des souris n'est pas modifiée par le HFruD.

Avant de conclure sur cette partie comportementale, il faut signaler que d'autres éléments peuvent avoir une influence non négligeable sur l'interprétation des résultats. Ces tests sont bien sûr dépendants du niveau de stress des animaux et, si toutes les mesures possibles ont été prises pour limiter le stress des animaux, il est impossible d'exclure de façon certaine un effet confondant du stress sur les résultats. Il serait possible de réaliser un dosage sanguin des niveaux de corticostérone afin de voir si ces derniers sont plus élevés chez les animaux HFruD que chez les animaux contrôle dans des situations de stress semblables à celles de nos expériences.

Une autre possibilité serait un effet du régime enrichi en fructose sur les capacités locomotrices des animaux (tous les tests que nous avons effectués étant dépendants des capacités locomotrices des animaux) ou sur leur niveau d'anxiété (ce qui se rapproche du stress mais qui peut être mesuré de façon comportementale beaucoup plus simplement). C'est donc ce que nous avons décidé de faire en utilisant un test dit de « champ ouvert » ou open field.

IV. Test de l'open field

Ce test est classiquement utilisé pour mesurer les capacités locomotrices des rongeurs ainsi que leur niveau général d'anxiété (Pruet and Belzung, 2003). Il consiste à placer les rongeurs dans une enceinte de test vide et à mesurer différents paramètres. Il existe de très

nombreuses variantes de ce test utilisant divers paradigmes expérimentaux. La taille ainsi que la forme de l'arène peuvent ainsi varier d'une étude à une autre. La durée du test est aussi très variable (de 5 minutes à plusieurs heures) ainsi que la présence ou non de répétitions.

Ici nous avons décidé d'utiliser la même enceinte de test que pour les tests de détection et de discrimination, notre enceinte pouvant être modulée de façon à avoir 0, 1 ou 2 trous. Dans la configuration sans trou, les animaux ont été placés dans le dispositif expérimental pour deux essais de 5 minutes espacés d'une période de repos de 6 minutes (un deuxième animal réalisant le test dans l'intervalle comme d'habitude). Une fois encore, les animaux ont été placés dans la salle d'expérimentations et leur nourriture retirée une heure avant le début du test, ce dernier étant effectué durant la phase d'activité des animaux dans l'après-midi. Pour chaque critère mesuré, la moyenne des deux essais était utilisée. Les valeurs pour les différents critères ont, une fois de plus, été obtenues en filmant les animaux et en analysant les vidéos avec un logiciel créé sous matlab. Les données ont été analysées en utilisant une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer.

Les capacités locomotrices des animaux ont été étudiées en mesurant la distance totale parcourue par les souris ainsi que leur vitesse moyenne. Le régime enrichi en fructose n'induit aucun changement de la distance totale parcourue ($F_{(1,28)} = 0,42$, $p = 0,52$) (Figure 42.A) ni de la vitesse moyenne des souris ($F_{(1,28)} = 0,53$, $p = 0,47$) (Figure 42.B). Les souris sous HFruD semblent donc avoir une capacité locomotrice similaire à celle des souris contrôle.

L'anxiété des animaux a été étudiée en mesurant le niveau de thigmotaxie des animaux. La thigmotaxie est un comportement naturel des souris qui, lorsqu'elles sont placées dans un environnement comprenant des murs, vont spontanément rester proches de ces derniers et éviter la zone centrale, plus anxiogène. Ici, nous avons mesuré la thigmotaxie en pourcentage du temps total passé près des bords du dispositif expérimental. La zone centrale et la zone des bords représentaient chacune 50% de la surface totale de l'enceinte de test. Le régime enrichi en fructose n'induit pas de différence sur le niveau de thigmotaxie des animaux ($F_{(1,28)} = 0,39$, $p = 0,54$) (Figure 42.C).

L'activité locomotrice des animaux étant similaire pour les souris contrôle et les souris HFruD, on peut exclure que les résultats des tests précédents soient dus à un problème locomoteur de nos animaux diabétiques. Le niveau d'anxiété des animaux, représenté ici par leur valeur de thigmotaxie, ne semble pas non plus interférer avec les résultats des différents tests olfactifs.

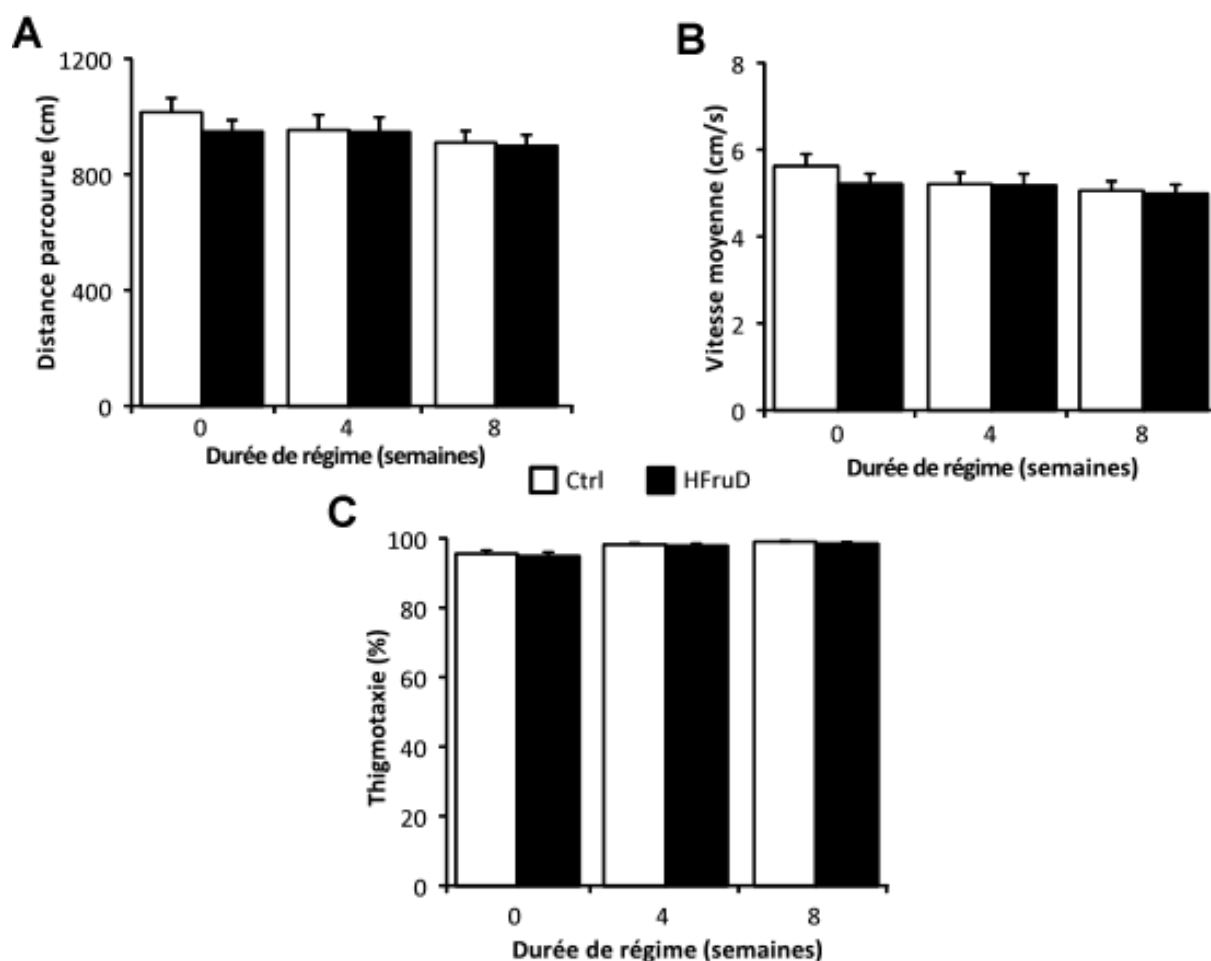


Figure 42 : Résultats du test de l'open field. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes représentent les valeurs des critères mesurés pour les souris contrôle en blanc (n=11) et HFruD en noir (n=19). A. Distance totale parcourue. B. Vitesse moyenne des souris. C. Thigmotaxie des souris mesurée par le pourcentage de temps passé près des bords du dispositif expérimental.

Il existe de nombreux autres tests comportementaux permettant de mesurer le niveau d'anxiété des animaux et il est difficile de conclure à partir d'une unique valeur. Cependant, une étude récente a mis en évidence que des souris C57Bl/6J nourries avec exactement le même régime que nos animaux durant 16 semaines, ne présentaient pas de phénotype dépressif (Zemdegis et al., 2015). Le niveau d'anxiété des animaux dans cette étude était mesuré, non seulement *via* la méthode de l'open field, mais également à l'aide d'autres tests comportementaux, indiquant tous une absence d'effet du HFruD.

Il nous paraît donc raisonnable de conclure que les résultats obtenus pour les tests d'habituation / déshabituation et du buried food sont bien dus à des dysfonctionnements olfactifs des animaux et non à un effet du HFruD sur un autre paramètre pouvant biaiser nos résultats comportementaux.

V. Conclusions du chapitre

Il semble donc que des souris rendues diabétiques de type 2 après 4 à 8 semaines de régime enrichi en fructose présentent une diminution globale de leurs capacités olfactives. En effet, même si d'autres expérimentations contrôles seraient nécessaires afin de conclure sur chaque test (test d'habituation / déshabituation avec un stimulus visuel par exemple), les différents tests réalisés ici indiquent tous une diminution des capacités olfactives des souris diabétiques. Ces résultats sont cohérents avec les études menées sur l'animal pathologique présentant des symptômes de syndrome métabolique (Baskin et al., 1985; Figlewicz et al., 1985; Aimé et al., 2014; Thiebaud et al., 2014; Lacroix et al., 2015). En effet ces études font également état d'une baisse générale de l'olfaction des animaux, pour des odeurs neutres et / ou alimentaire lors de tests spontanés ou renforcés.

De plus, ces résultats sont cohérents avec les études menées sur des patients atteints de diabète de type 2 (Naka et al., 2010; Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014; Sanke et al., 2014; Mehdizadeh Seraj et al., 2015). Ici, nous avons utilisé des tests olfactifs simples afin de se rapprocher au maximum des tests réalisés chez l'humain. De façon intéressante, nos animaux diabétiques, à l'instar des patients, présentent une baisse des capacités de discrimination olfactive (Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014). Il semble donc que les souris nourries avec un régime enrichi en fructose présentent des dysfonctionnements olfactifs similaires à ceux des patients atteints de DT2.

Un point important de notre étude est que nos souris se situent en début de pathologie. La durée de la pathologie n'est pas toujours indiquée dans les études chez l'humain (souvent car on ne connaît que la date à laquelle la maladie a été diagnostiquée et non celle à laquelle elle s'est déclarée). De fait, la majorité des patients dans ces études sont des diabétiques de longue durée et beaucoup d'entre eux ont déjà développé des pathologies secondaires. Plusieurs études pointent d'ailleurs du doigt que les déficits olfactifs de ces patients sont dus ou, tout du moins, aggravés par ces pathologies (Naka et al., 2010; Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014).

Contrairement à ces études, nous mettons en évidence ici que la baisse des capacités olfactives chez des animaux diabétiques a lieu dès la mise en place de la pathologie. Bien entendu, il est probable que les mécanismes derrière ces effets comportementaux soient différents chez l'être humain ou alors qu'ils ne soient pas les mêmes en début de pathologie et lorsque le DT2 est installé depuis longtemps.

Quels peuvent être ces mécanismes ? Il nous paraît évident que de tels effets comportementaux ont probablement des causes diverses. Dans notre étude, les capacités de discrimination olfactive des animaux sont diminuées mais également leur acuité olfactive en général. Ces modalités olfactives sont sous le contrôle de différents organes impliqués dans l'olfaction. Comme expliqué dans l'introduction, le système olfactif périphérique est

impliqué dans la chémoréception à proprement parler alors que le bulbe olfactif est responsable de la transmission et de la modulation du message olfactif. Les structures supérieures jouent également un rôle important dans le décodage de ce message et sa modulation.

De plus, les états alimentaires et métaboliques peuvent agir à tous les niveaux du système olfactif et il paraît probable que tel soit le cas lorsqu'on induit une pathologie comme le DT2 qui va avoir des effets délétères sur la plupart des organes. Les effets comportementaux que nous mettons en évidence ici sont donc très probablement dus à des dysfonctionnements présents à tous les niveaux du système olfactif.

Cela étant dit, nous avons décidé de nous intéresser exclusivement au système olfactif périphérique pour la suite de l'étude, ce dernier étant notre modèle d'étude privilégié dans l'équipe. Le régime enrichi en fructose induit-il des changements anatomiques et / ou fonctionnels au niveau de la muqueuse olfactive ?

Chapitre 3 : Le diabète de type 2 induit des changements anatomiques et fonctionnels au sein de la muqueuse olfactive

Afin d'étudier l'effet du régime enrichi en fructose sur la muqueuse olfactive, nous avons mis en place la stratégie décrite ci-après. Tout d'abord, nous nous sommes demandé si, de façon générale, nos animaux diabétiques présentaient une modulation de l'activité électrique de la muqueuse olfactive, ce qui serait cohérent avec les résultats de la partie comportementale. Nous avons donc réalisé des expériences d'électroolfactogramme (EOG) afin d'étudier cette question.

De telles perturbations fonctionnelles de la muqueuse olfactive sont souvent dues à des problèmes anatomiques et / ou fonctionnels, et ce sont les deux points que nous avons étudiés par la suite grâce à différentes méthodes histologiques (immuno-histochimie, préparation d'épithélium olfactif « à plat ») et fonctionnelles (patch clamp sur épithélium olfactif intact).

Enfin, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un possible mécanisme pouvant expliquer les résultats de ce chapitre et avons étudié l'implication de l'insuline dans ces processus par des méthodes de biologie moléculaire (RTqPCR) et de biochimie (Western blot).

I. Etude fonctionnelle de la muqueuse olfactive

Principe et protocole

L'étude fonctionnelle de la muqueuse olfactive a été réalisée par électroolfactogramme (EOG) en phase aérienne, une méthode d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires en potentiel de champ, permettant de mesurer l'activité électrique de la muqueuse olfactive en réponse à une stimulation odorante. Le signal EOG correspond à la somme des potentiels récepteurs des neurones sensoriels olfactifs d'une partie de la MO. Nous avons adapté un protocole décrit par Negroni et collaborateurs dont les différentes étapes sont résumées ci-après (Negroni et al., 2012).

L'EOG a été réalisé pendant la période d'activité des animaux, en ayant pris soin de retirer la nourriture des souris une heure avant le début des expériences. Les souris étaient étourdiées à l'aide d'isoflurane comme décrit dans le chapitre 1 puis rapidement décapitées. Les têtes étaient ensuite coupées en deux suivant un plan sagittal et une demi-tête était placée sur la glace en-dessous d'un microscope Olympus SZ51 (Olympus) équipé de deux micromanipulateurs MX-160 (Siskiyou, Inc.) servant à mouvoir les deux électrodes

d'enregistrement. Les stimulations odorantes étaient réalisées grâce à un appareil adapté des travaux de Scott et Brierley (Scott and Brierley, 1999).

La demi-tête était maintenue sous un flot constant d'air humidifié (~ 1000 ml / min) délivré grâce à un tube de verre situé à environ 2 cm de la surface de l'épithélium. Les stimulations odorantes étaient réalisées en soufflant de l'air odorisé vers l'épithélium olfactif (200 ms, 200 ml / min) au travers d'une pipette pasteur échangeable (chaque pipette n'étant utilisée que pour une concentration spécifique d'un unique odorant), dans laquelle un papier filtre odorisé à l'aide de 20 μ l d'odorant dilué dans l'huile minérale était placé. Nous avons utilisé les mêmes odorants que ceux nous ayant servis pour le test d'habituation / déshabitude : l'octanol et l'acétophénone (facteur de dilution : 1/10000 à 1/10).

Le signal électrique a été enregistré à l'aide d'un amplificateur XtraCell (DIPSI) en mode « current-clamp » ($I=0$), c'est-à-dire, que le courant était fixe et que c'est la différence de potentiel qui était mesurée (autrement dit le voltage). Le signal analogique était ensuite converti en signal numérique à un taux de 5 kHz avec un convertisseur Digidata 1322a A/D (Axon Instruments, Molecular Devices) et le signal traité avec le logiciel Pclamp (Axon Instruments). Une électrode de référence Ag/AgCl était placée au niveau de l'os frontal au-dessus du bulbe olfactif. Les électrodes d'enregistrement étaient constituées de micropipettes de verre présentant une résistance de 4-5 M Ω remplies avec une solution saline. Les enregistrements ont été effectués sur les cornets IIb et III (Figure 43).

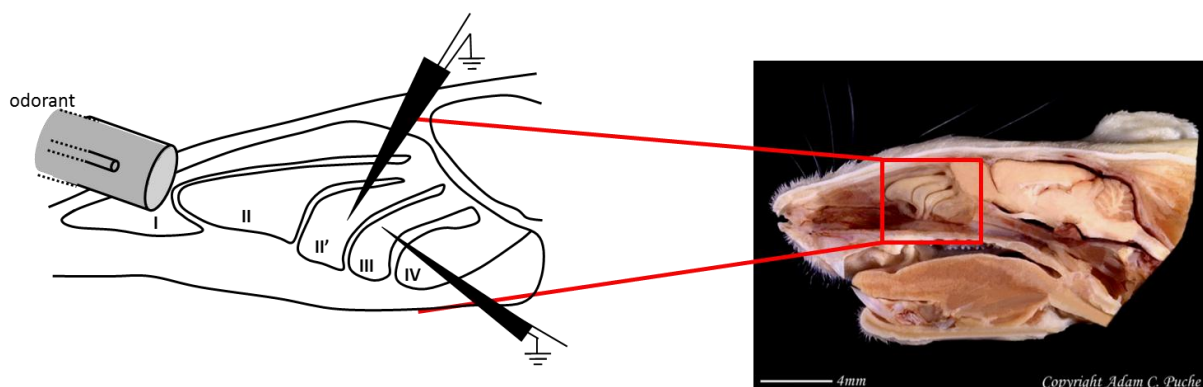


Figure 43 : Illustration du protocole d'EOG. A gauche : schéma du protocole d'EOG montrant la stimulation odorante et les électrodes d'enregistrement placées sur les cornets IIb et III. Modifié d'après (Negroni et al., 2012). A droite : Photo d'une demi-tête de rat, montrant l'emplacement des cornets olfactifs. Barre d'échelle : 4mm.

Les signaux enregistrés sur ces cornets donnent des enregistrements fiables, de longue durée et d'amplitude comprise entre 10 et 18 mV avec une stimulation à l'acétophénone 10^{-3} . Il a été vérifié que des stimulations contrôles réalisées avec de l'huile minérale uniquement ne déclenchaient jamais de signal supérieur à 1 mV d'amplitude. Les stimulations étaient réalisées dans l'ordre suivant : carvone 10^{-2} , octanol 10^{-4} , octanol 10^{-3} , octanol 10^{-2} , acétophénone 10^{-4} , acétophénone 10^{-3} , acétophénone 10^{-2} , octanol 10^{-1} , acétophénone 10^{-1} .

et enfin carvone 10^{-2} . Les stimulations à la carvone servent de contrôle afin de vérifier l'état de la préparation (les signaux enregistrés au début et à la fin du protocole devant être similaires). Les stimulations avec les concentrations les plus élevées des deux odorants étaient réalisées en dernier car le tissu nécessitait un temps plus long de récupération entre deux stimulations pour ces concentrations. A chaque fois deux stimulations étaient réalisées pour chaque concentration d'odorant et seule celle déclenchant un signal d'amplitude maximum était conservée pour l'analyse.

Critères d'analyse

Au final, les signaux enregistrés par les deux électrodes d'enregistrement ont été conservés et le n total pour ces expériences représente donc le nombre d'enregistrements pour une concentration en odorant donnée. Ces données ont été analysées à l'aide du logiciel Clampfit (Axon Instruments) et les critères suivants ont été retenus : amplitude de la réponse, aire sous la courbe, temps d'attaque ou rise time (temps pour passer de 10 à 90% de la réponse maximale), temps de repolarisation rapide ou fast decay time (de 100 à 80% de la réponse maximale) et temps de repolarisation lent ou slow decay time (de 40 à 20% de la réponse maximale) (Figure 44). Etant donné que les cinétiques de réponse en EOG sont dépendantes de l'amplitude de la réponse, le temps d'attaque et les temps de repolarisation rapide et lent ont été normalisés à l'aide de l'amplitude correspondante à chaque stimulation. Pour les résultats, les amplitudes de réponse en fonction de chaque concentration seront présentés mais pour les autres critères, seules les réponses obtenues après une stimulation à une concentration en odorant de 10^{-3} , une valeur moyenne dans la gamme de concentrations en odorant utilisée, seront présentées.

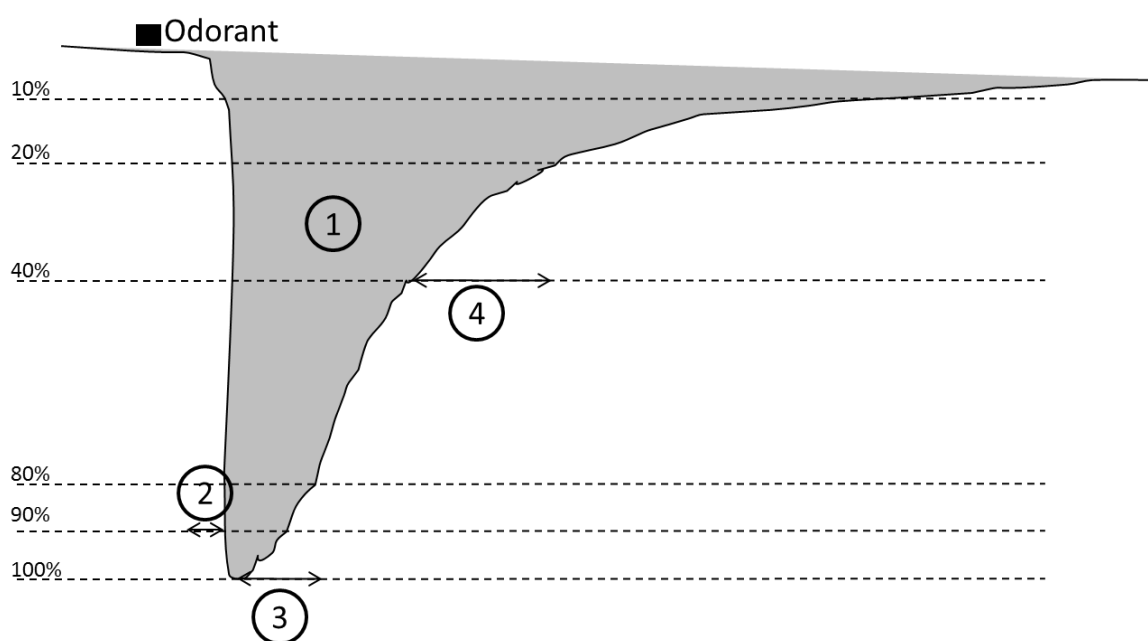


Figure 44 : Schéma illustrant les critères étudiés pour l'EOG. Schéma d'une trace d'EOG. 1 : aire sous la courbe (en gris), 2 : temps d'attaque, 3 : temps de repolarisation rapide, 4 : temps de repolarisation lent.

Résultats

Les profils de réponses EOG après 4 semaines de régime semblent ne pas être les mêmes en fonction de l'odorant utilisé (Figure 45.A1 et B1). Après analyse, l'amplitude de la réponse à l'octanol ne change pas chez les animaux HFruD comparés aux animaux contrôle ($F_{(1,25)} = 3,76$, $p = 0,064$) (Figure 45.A2), à l'exception de la concentration la plus forte en octanol. Les résultats sont plus marqués pour l'acétophénone puisque l'amplitude de réponse des animaux HFruD est diminuée de 13,65% par rapport à celle des animaux contrôle ($F_{(1,28)} = 9,48$, $p < 0,01$) (Figure 45.B2). Seule la réponse obtenue avec la concentration la plus faible d'acétophénone ne diffère pas entre les souris contrôle et les souris HFruD.

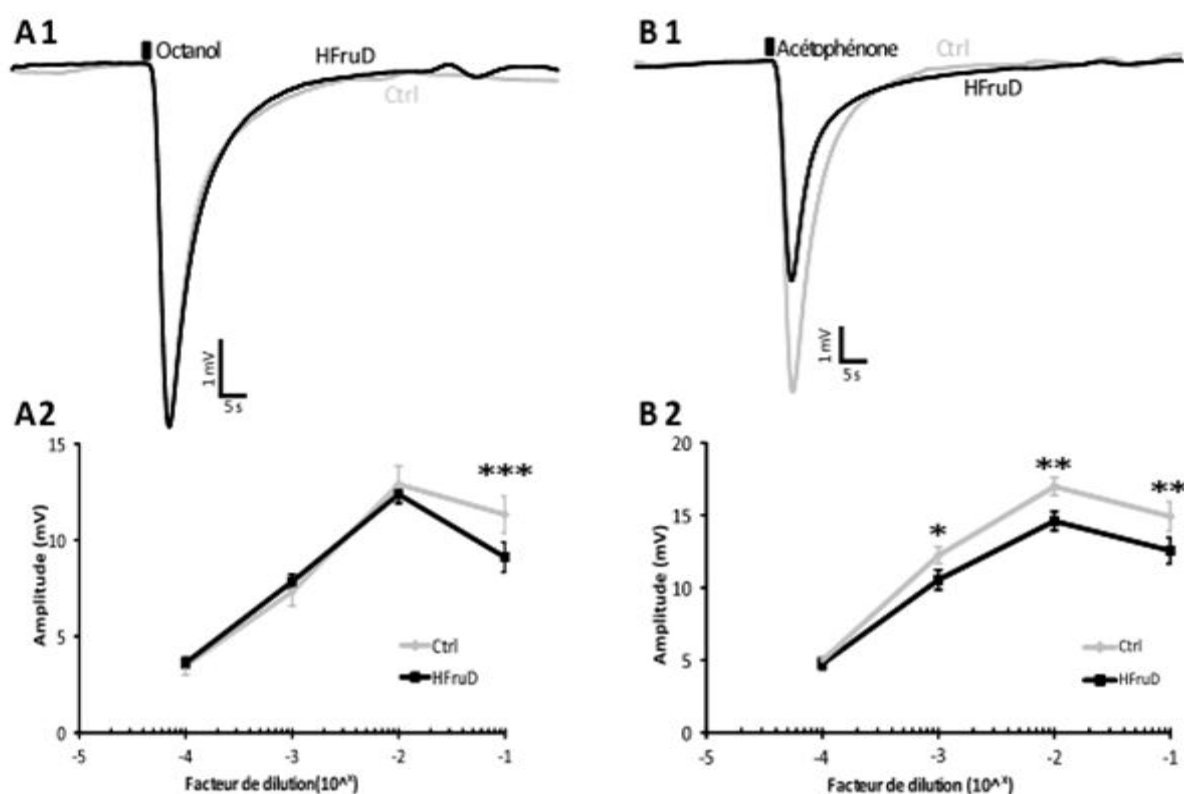


Figure 45 : Réponses EOG après 4 semaines de régime. Les lignes grises représentent les animaux sous régime Ctrl et les lignes noires les animaux sous HFruD. A. Réponses avec une stimulation à l'octanol. B. Réponses avec une stimulation à l'acétophénone. 1. Exemples de traces d'EOG obtenues après une stimulation avec une concentration en odorants de 10^{-3} . 2. Analyse des amplitudes de réponses en fonction de la concentration en odorants. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem pour les enregistrements faits sur les animaux Ctrl (n=16) et HFruD (n=16). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d'un test LSD de Fischer.

Lorsque l'on regarde les cinétiques de réponses, on s'aperçoit que ces dernières sont identiques pour les animaux contrôle et HFruD après une stimulation à l'octanol (Figure 46.A). En effet, aucune différence en fonction du régime n'est retrouvée pour les valeurs de l'aire sous la courbe, du temps d'attaque et des temps de repolarisation rapide et lent (respectivement, $p = 0,95$, $p = 0,6$, $p = 0,9$ et $p = 0,38$).

En revanche, après stimulation à l'acétophénone, les cinétiques de réponses semblent clairement augmentées chez les animaux HFruD par rapport aux animaux contrôle (Figure 46.B). Même si on ne retrouve pas de différence pour la valeur de l'aire sous la courbe ($p = 0,91$), le temps d'attaque est augmenté d'un facteur 1,27 ($p < 0,01$) et les temps de repolarisation rapide et lent de, respectivement, un facteur 1,37 et 1,57 ($p < 0,001$ et $p < 0,01$). Cela signifie donc que les réponses des animaux HFruD sont plus lentes que celles des animaux contrôle.

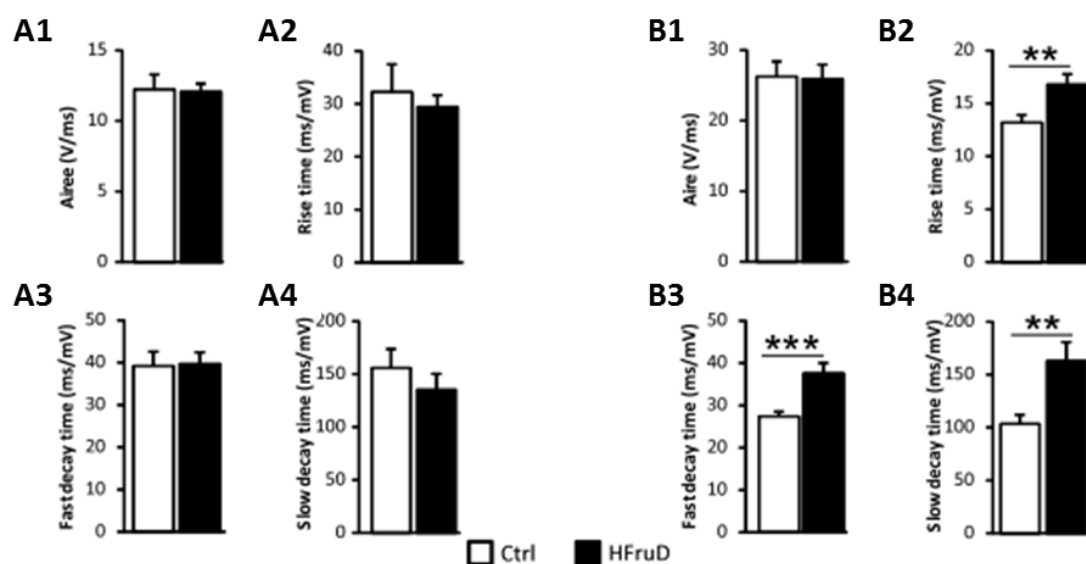


Figure 46 : Cinétiques des réponses EOG après 4 semaines de régime. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl (n=16) et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD (n=16). A. Réponses avec une stimulation à l'octanol. B. Réponses avec une stimulation à l'acétophénone. 1. Aire sous la courbe. 2. Temps d'attaque ou rise time. 3. Temps de repolarisation rapide ou fast decay time. 4. Temps de repolarisation lent ou slow decay time. ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après un test t de Student.

Après 8 semaines de régime, en revanche, les profils de réponse EOG semblent clairement différents entre les animaux contrôle et les animaux HFruD après stimulation à l'octanol et à l'acétophénone (Figure 47.A1 et B1). Après analyse, les amplitudes de réponses après stimulation à l'octanol sont diminuées de 16,89% chez les souris HFruD comparées aux souris contrôle ($F_{(1,46)} = 18,62$, $p < 0,001$) (Figure 47.A2). En effet, les amplitudes de réponses EOG sont plus faibles chez les animaux HFruD que chez les animaux contrôle quelle que soit la concentration en octanol utilisée.

De même, les amplitudes de réponses après stimulation à l'acétophénone sont diminuées de 15,17% chez les souris HFruD comparées aux souris contrôle ($F_{(1,45)} = 14,03$, $p < 0,001$) (Figure 47.B2). Là encore, les amplitudes de réponses EOG sont plus faibles chez les animaux HFruD que chez les animaux contrôle quelle que soit la concentration en acétophénone utilisée.

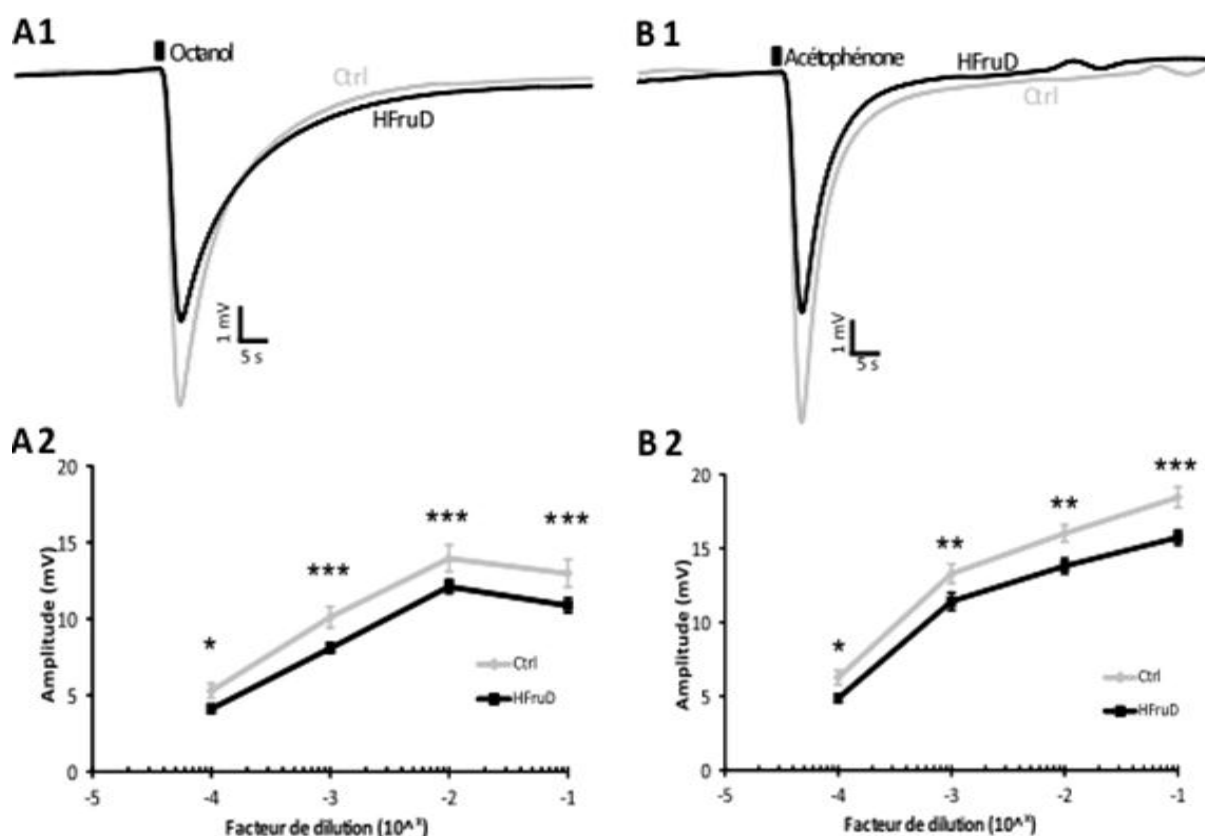


Figure 47 : Réponses EOG après 8 semaines de régime. Les lignes grises représentent les animaux sous régime Ctrl et les lignes noires les animaux sous HFruD. A. Réponses avec une stimulation à l’octanol. B. Réponses avec une stimulation à l’acétophénone. 1. Exemples de traces d’EOG obtenues après une stimulation avec une concentration en odorants de 10^{-3} . 2. Analyse des amplitudes de réponses en fonction de la concentration en odorants. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem pour les enregistrements faits sur les animaux Ctrl (n=22) et HFruD (n=32). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après une ANOVA à deux facteurs croisés sur mesures répétées suivie d’un test LSD de Fischer.

Les cinétiques de réponses des animaux HFruD après stimulation à l’octanol et à l’acétophénone sont modifiées par rapport à celles des animaux contrôle (Figure 48). La valeur de l’aire sous la courbe est diminuée à la fois pour une stimulation à l’octanol et à l’acétophénone (respectivement de 15% et de 23%, $p < 0,05$ dans les deux cas) (Figure 48.A1 et B1). De plus le temps d’attaque et les temps de repolarisation rapide et lent sont augmentés après stimulation à l’octanol (respectivement d’un facteur : 1,58, $p < 0,001$; 1,28, $p < 0,05$ et 1,78, $p < 0,05$) (Figure 48.A2-A4). Pour l’acétophénone, les temps d’attaque et le temps de repolarisation rapide sont tous deux augmentés pour les animaux HFruD (respectivement d’un facteur : 1,49, $p < 0,01$ et 1,25, $p < 0,05$) (Figure 48.B2-B3). En résumé, après 8 semaines de HFruD, les réponses EOG sont plus faibles et les cinétiques plus lentes.

Il apparaît donc que les souris diabétiques présentent des perturbations fonctionnelles au niveau de leur système olfactif périphérique, l’intensité de la réponse aux odeurs étant diminuée et les cinétiques de réponses étant plus lentes. Ces troubles apparaissent dès 4 semaines de régime enrichi en fructose et sont amplifiés après 8 semaines de HFruD.

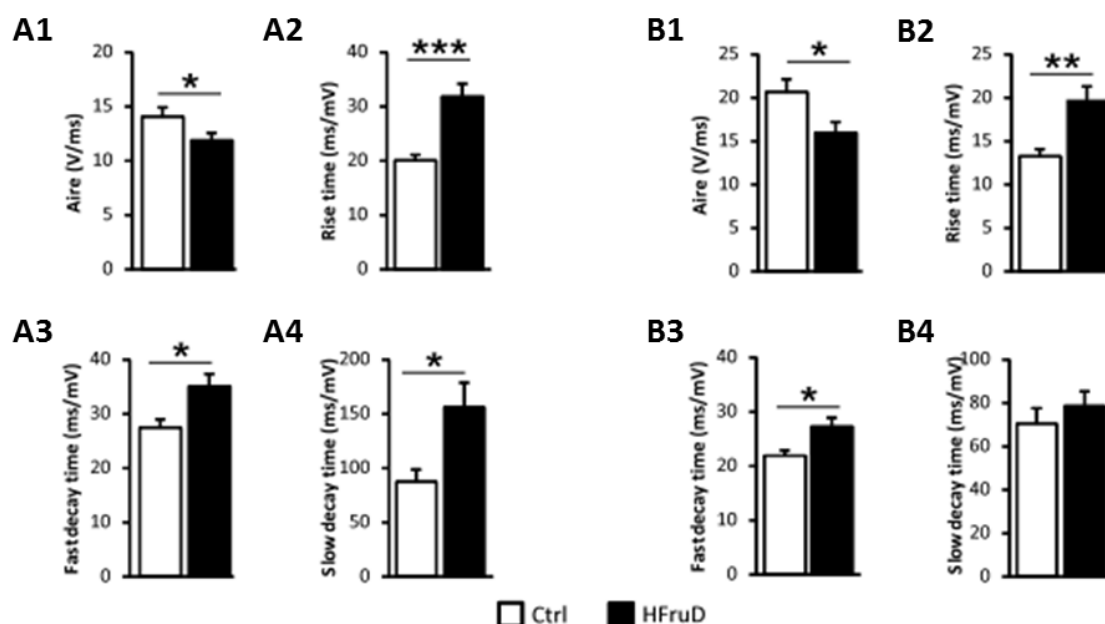


Figure 48 : Cinétiques des réponses EOG après 8 semaines de régime. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl (n=22) et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD (n=32). A. Réponses avec une stimulation à l'octanol. B. Réponses avec une stimulation à l'acétophénone. 1. Aire sous la courbe. 2. Temps d'attaque ou rise time. 3. Temps de repolarisation rapide ou fast decay time. 4. Temps de repolarisation lent ou slow decay time. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ après un test t de Student.

De façon surprenante, les réponses à l'octanol ne sont pas modifiées après 4 semaines de HFruD mais seulement après 8 semaines alors que les réponses à l'acétophénone sont modifiées dès 4 semaines de régime. Comment expliquer cette différence en fonction de l'odorant ? Il serait possible que les effets du régime enrichi en fructose ne soient pas identiques au sein de la muqueuse olfactive et touchent différemment deux populations de neurones distinctes, bien que cette hypothèse soit peu probable.

Il se peut aussi que l'octanol soit un odorant moins facile à utiliser pour faire de l'EOG et que cette limitation ne permette pas de détecter des différences lorsque la taille des effets est petite. L'octanol étant trois fois moins volatile que l'acétophénone, on peut imaginer que cet odorant soit moins efficace pour induire une réponse lorsqu'il est utilisé en phase aérienne, comme nous l'avons fait ici.

Quoi qu'il en soit, les réponses EOG diminuées chez nos animaux diabétiques sont cohérentes avec une autre étude montrant des réponses EOG plus faibles chez des souris nourries avec un régime enrichi en graisse (Thiebaud et al., 2014). En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que les amplitudes de réponses EOG à l'acétophénone étaient diminuées chez des souris rendues obèses et diabétiques (intolérance au glucose et hyperglycémie à jeun).

Comment expliquer cette diminution des signaux EOG chez nos animaux HFruD ? Comme expliqué plus tôt, les signaux EOG représentent l'activité électrique des neurones sensoriels olfactifs. Une baisse globale de réponse en EOG peut donc être due à une baisse du nombre d'OSNs et / ou à une baisse de l'activité électrique de chaque neurone pris individuellement. Nous avons donc testé les deux hypothèses, en commençant par l'hypothèse anatomique. Retrouve-t-on une baisse du nombre de neurones sensoriels olfactifs chez les souris diabétiques et, de façon plus générale, le régime enrichi en fructose induit-il une perturbation de la dynamique cellulaire (équilibre prolifération cellulaire / apoptose) au sein de la muqueuse olfactive ?

II. Etude anatomique de la muqueuse olfactive

Comme expliqué dans le premier chapitre de l'introduction, la muqueuse olfactive est un tissu particulier au sein duquel les processus de prolifération et de mort cellulaire sont hautement contrôlés. Les OSNs étant les seuls neurones en contact avec l'environnement extérieur et leur durée de vie ne dépassant pas 2 mois, on constate que la population en OSNs de la MO se renouvelle régulièrement. Nous avons donc choisi d'estimer le nombre de neurones au sein de la MO mais également de mesurer les taux d'apoptose et de prolifération cellulaire dans le tissu.

Protocole

Pour ce faire, nous avons employé un protocole d'immunohistochimie. Après 4 ou 8 semaines de régime, les animaux (durant leur phase d'activité) étaient profondément anesthésiés à l'aide de pentobarbital (60 mg/kg du poids total de l'animal) puis une perfusion intracardiaque avec 10 mL de NaCl hépariné suivie de 20 mL de paraformaldéhyde à 4% était réalisée. Les animaux étaient ensuite décapités et les têtes placées dans une solution d'EDTA 5% pendant deux semaines (étape de décalcification). Par la suite les têtes étaient immergées dans une solution de sucrose à 30% pendant 48h (étape de cryoprotection). Enfin les têtes étaient placées dans une solution cryoprotectrice (mélange glycérol et éthylène glycol) à -80°C avant usage.

Après décongélation, les têtes étaient disséquées de manière à ne conserver que les deux narines puis les tissus étaient lavés dans une solution de PBS pendant 2*5 minutes puis placés dans une solution d'OCT 50% (Sakura, Tissue Tek) puis d'OCT 100% pendant 30 minutes. Les tissus étaient alors congelés dans les vapeurs d'azote liquide puis des coupes longitudinales de tissus de 14 µm d'épaisseur étaient réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica microsystems) et directement récupérées sur des lames de verre. Une fois de plus, les coupes étaient ensuite placées à -80°C avant usage.

Le protocole d'immunohistochimie était ensuite le même pour toutes les protéines observées exceptée PCNA où les lames étaient d'abord placées dans un tampon citrate (pH = 6) à 95°C pendant 30 minutes. Par la suite les coupes étaient placées dans une solution de

blocage et de perméabilisation : sérum d'âne à 10% (Abcam), BSA à 2% et Triton X-100 à 0,3% pendant 2h. Les coupes étaient ensuite incubées avec l'anticorps primaire durant 16h à 4°C puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante (**Table 4**). Les noyaux des cellules étaient marqués grâce au Hoechst au 5000^{ème} (Molecular Probes). Enfin les coupes étaient montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage adéquat (ProLong Gold antifade reagent, Molecular Probes). Les coupes étaient ensuite observées à l'aide d'un microscope Imager M2 (Zeiss) au grossissement 20X ou 40X.

	Anticorps primaire	Dilution	Fournisseur	Anticorps secondaire	Dilution	Fournisseur
Apoptose	Lapin anti-caspase 3 clivée	1/400	Ozyme	Chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488	1/1000	Molecular Probes
Prolifération cellulaire	Souris anti-PCNA	1/100	GeneTex	Chèvre anti-souris Alexa Fluor 488	1/1000	Molecular Probes
OSNs matures	Chèvre anti-OMP	1/500	Wako	Ane anti-chèvre Alexa Fluor 555	1/1000	Molecular Probes

Table 4 : Anticorps utilisés pour le protocole d'immunohistochimie

a. Etude du taux d'apoptose

L'apoptose a, tout d'abord, été étudiée en utilisant un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée, un marqueur d'apoptose bien connu (Cohen, 1997). Ici, nous avons quantifié le marquage caspase 3 clivée en balayant l'intégralité de chaque coupe et en prenant une photo à chaque fois que le marquage était présent. Les 12 photos par animal où le marquage était le plus fort ont été conservées pour l'analyse. Cette dernière a été effectuée en utilisant le logiciel ImageJ (NIH) qui permet d'obtenir une valeur de marquage fluorescent exprimé en pourcentage de surface totale d'épithélium olfactif.

Après 4 semaines de régime, le taux d'apoptose dans la muqueuse olfactive est similaire pour les animaux contrôle et les animaux HFruD ($p = 0,52$) (Figure 49.A-B et E). Après 8 semaines de régime, en revanche, les animaux HFruD présentent une diminution de l'expression de caspase 3 clivée de 48,1% comparés aux animaux contrôle ($p < 0,01$) (Figure 49.C-D et E). Il semble donc qu'une baisse de l'apoptose dans la MO ait lieu chez nos animaux diabétiques.

De façon surprenante, le taux d'apoptose semble augmenter chez les animaux contrôle entre 4 et 8 semaines de régime. Néanmoins, étant donné que les animaux à 4 et à 8 semaines de régime appartiennent à deux lots d'animaux distincts, il faut considérer ce résultat avec prudence. Les études sur la dynamique cellulaire de l'EO ont surtout été menées sur des animaux juvéniles, durant la période post-natale (Cowan and Roskams,

2002) ou au contraire sur des animaux âgés (Doty and Kamath, 2014). Cependant une étude a comparé les niveaux de prolifération et d'apoptose chez la souris femelle ICR et le taux d'apoptose (mesuré par la méthode TUNEL) chez ces souris est divisé par trois entre 1 et 3 mois (Kondo et al., 2010). Ici, nos souris sont âgées de 9 et 13 semaines au moment des expériences. Cela semble en contradiction avec nos résultats. Il est donc possible que les deux lots différents de souris aient un taux d'apoptose variable, les animaux des deux groupes à 4 (Ctrl et HFruD) et à 8 semaines (Ctrl et HFruD) de régime n'ayant pas du tout été utilisés à la même période de l'année. Il est donc hasardeux de comparer les animaux entre 4 et 8 semaines de régime ici. Quoiqu'il en soit, il semble bien que, après 8 semaines de régime, les souris HFruD présentent un taux d'apoptose diminué par rapport aux souris contrôle.

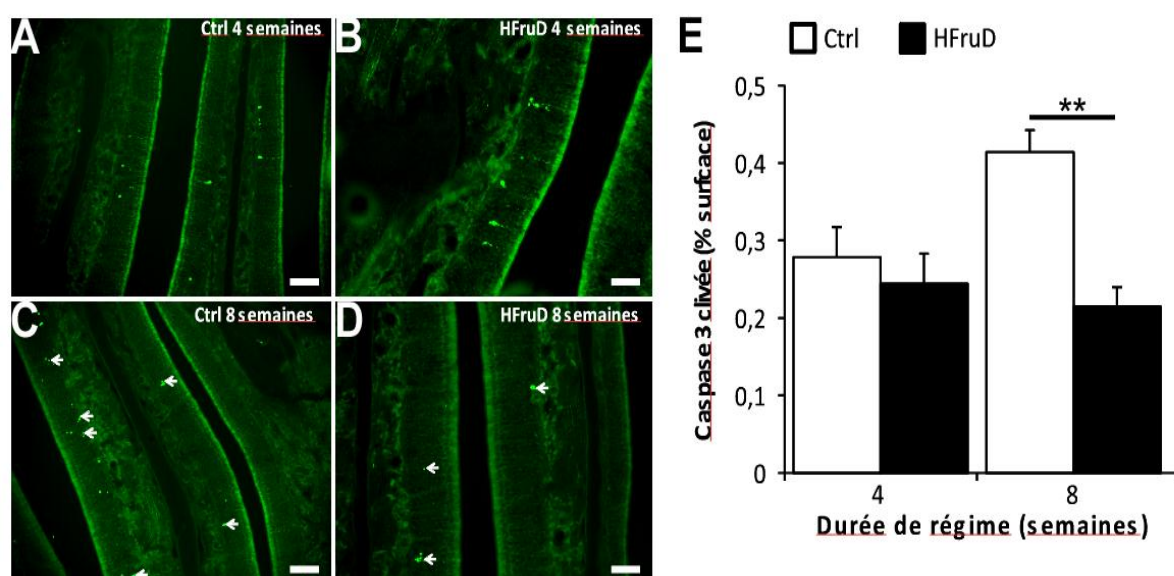


Figure 49 : Expression de la caspase 3 clivée au sein de la muqueuse olfactive. A-D. Photos représentatives du marquage caspase 3 clivée (en vert). Les flèches blanches représentent une différence d'expression de la caspase 3 clivée entre les animaux Ctrl et HFruD. Barre d'échelle : 50 μ m. E. Quantification du marquage caspase 3 clivée exprimé en pourcentage de surface de l'épithélium olfactif. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl à 4 (n=4) et 8 (n=7) semaines et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD à 4 (n=6) et 8 (n=8) semaines. ** : $p < 0,01$ après un test de Mann-Whitney.

Afin de confirmer ces résultats, le taux d'apoptose dans le tissu a aussi été mesuré en utilisant la méthode TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), une autre méthode couramment utilisée pour évaluer le niveau d'apoptose d'un tissu (Gavrieli et al., 1992). Cette méthode consiste en l'ajout de nucléotides fluorescents aux extrémités libres de l'ADN, ce qui permet donc de repérer les cellules apoptotiques. Cette fois-ci, seuls des animaux à 8 semaines de régime ont été utilisés. Les coupes utilisées ont toutes été choisies parmi les animaux utilisés pour le marquage de la caspase 3 clivée et le marquage TUNEL a été effectué comme décrit dans le mode d'emploi du fabricant (DeadEndTM Fluorometric TUNEL system, Promega). Une fois de plus, chaque coupe a été

balayée et une photo prise à chaque fois que du marquage était présent et les photos où le marquage étaient le plus fort ont été gardées pour l'analyse. Cette dernière était exactement la même que pour le marquage caspase 3 clivée.

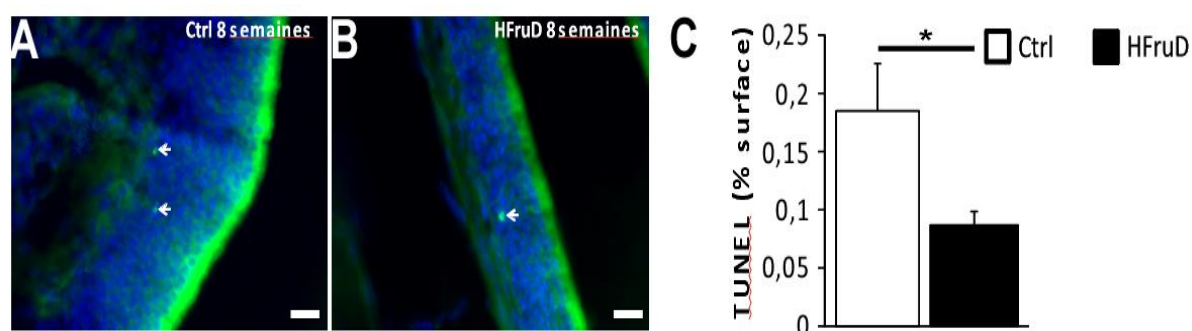


Figure 50 : Niveau d'apoptose mesuré dans la muqueuse olfactive par la méthode TUNEL. A-B. Photos représentatives du marquage TUNEL (vert, flèches blanches) ; les noyaux des cellules étant marqués en bleu (hoechst). Barre d'échelle : 25 µm. C. Quantification du marquage TUNEL exprimé en pourcentage de surface de l'épithélium olfactif. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl (n=6) et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD (n=6). * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney.

Après 8 semaines de régime, les animaux HFruD présentent un taux d'apoptose diminué de 53% par rapport aux animaux contrôle ($p < 0,05$) (Figure 50). Ces résultats sont cohérents et corrélés ($r^2 = 0,75$, $p < 0,05$) avec ceux de l'analyse précédente. On peut donc affirmer que nos animaux diabétiques ont bien un taux d'apoptose réduit par rapport aux animaux contrôle. Qu'en est-il du taux de prolifération cellulaire ?

b. Etude du taux de prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été étudiée en utilisant un anticorps dirigé contre PCNA, un marqueur de prolifération cellulaire bien connu (Iatropoulos and Williams, 1996). La prolifération cellulaire ayant lieu dans le tiers basal de l'épithélium olfactif (au niveau des cellules basales), nous avons décidé de prendre des photos dans 4 zones de l'épithélium : de chaque côté du septum, une photo dans la zone caudale (au fond des cornets) et dans une zone plus rostrale (environ à la moitié de la longueur de l'épithélium) dans les cornets les plus proches du septum. N'ayant pas repéré de différences de marquage en fonction des zones entre les groupes contrôle et HFruD, les résultats ont été moyennés pour chaque animal afin d'obtenir une valeur unique.

Que ce soit après 4 ou 8 semaines de régime, le niveau de marquage PCNA reste le même entre les animaux contrôle et HFruD (respectivement $p = 0,27$ et $p = 0,91$ après un test de Mann-Whitney) (Figure 51). Il semble donc ne pas y avoir de changement du taux de prolifération cellulaire chez nos animaux diabétiques. De façon intéressante le taux de prolifération cellulaire semble diminué entre 4 et 8 semaines de régime pour les animaux contrôle, tout comme le taux d'apoptose semblait augmenté avec le marquage caspase 3

clivée, même si ce phénomène semble moins prononcé ici. Il est donc fort probable que nous ayons bien un effet du lot d'animaux sur la mesure de ces paramètres. Néanmoins, cela n'a pas d'incidence sur la comparaison des groupes contrôle et HFruD à un temps donné.

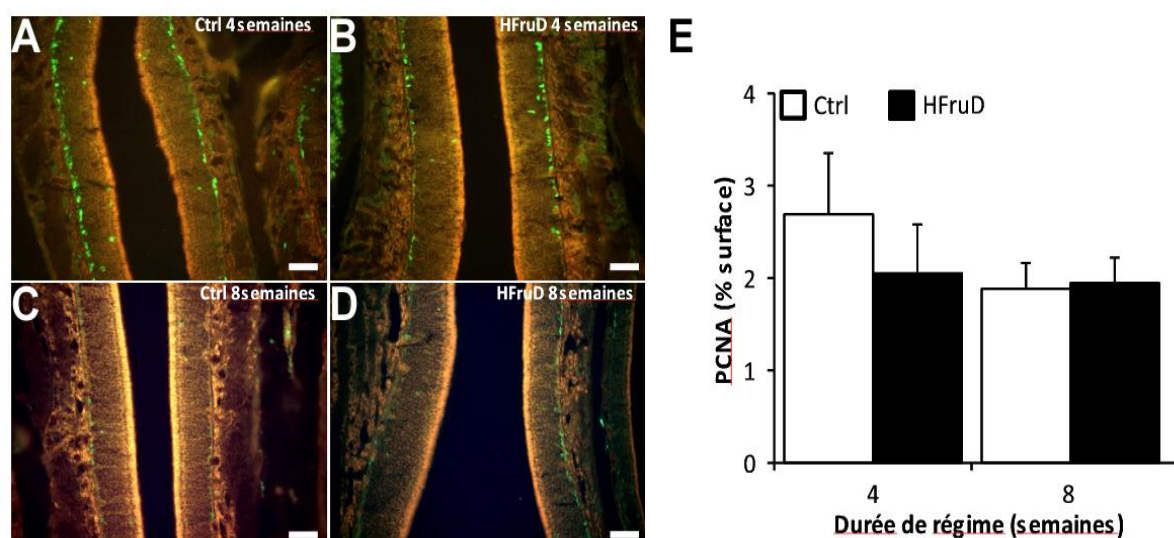


Figure 51 : Expression de PCNA au sein de la muqueuse olfactive. A-D. Photos représentatives du marquage PCNA (en vert). Barre d'échelle : 50 μ m. E. Quantification du marquage PCNA exprimé en pourcentage de surface de l'épithélium olfactif. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl à 4 (n=5) et 8 (n=7) semaines et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD à 4 (n=6) et 8 (n=8) semaines.

Après 8 semaines de HFruD, on assiste donc à une baisse de l'apoptose alors que le niveau de prolifération cellulaire semble inchangé. Il serait alors logique d'avoir une augmentation du nombre de neurones dans la muqueuse olfactive. Cependant, il reste possible que les cellules en apoptose ne soit pas exclusivement des cellules neuronales. Nous avons donc décidé de mesurer l'importance de la population neuronale dans la MO afin de vérifier cette hypothèse.

c. Etude de la population neuronale

Marquage OMP

Afin d'estimer la taille de la population en neurones sensoriels olfactifs matures, un marquage avec un anticorps dirigé contre la protéine OMP a été réalisée, cette protéine étant spécifique des OSNs matures (Farbman and Margolis, 1980). Nous avons décidé de faire une analyse similaire à celle du marquage PCNA, *i.e.* prendre des photos dans les mêmes 4 zones distinctes de la muqueuse olfactive. N'ayant pas repéré de différences de marquage en fonction des zones entre les groupes contrôle et HFruD, les résultats ont été moyennés pour chaque animal afin d'obtenir une valeur unique.

Les OSNs représentent 75 à 80% des cellules de l'EO. Il nous semblait donc fastidieux de réaliser un comptage manuel de chaque neurone individuel. Nous avons donc décidé d'estimer la surface du marquage OMP. Afin d'être sûrs que cette valeur était bien représentative du nombre de neurones OMP+, un comptage manuel du nombre de neurones a été réalisé sur des surfaces plus petites sur des photos issues de chaque zone de la MO et des 4 groupes expérimentaux. Il en résulte que les valeurs de surface de marquage OMP et du nombre de neurones OMP+ sont hautement corrélées ($r^2 = 0,91$, $p < 0,05$, résultats non montrés). Nous avons donc utilisé comme critère de mesure la surface moyenne de marquage OMP pour chaque animal.

Après 4 semaines de régime, la surface de marquage OMP est similaire pour les animaux contrôle et les animaux HFruD ($p = 0,71$) (Figure 52.A-B et E). En revanche, après 8 semaines de régime, les animaux HFruD présentent une augmentation de 19,3% de la surface OMP ($p < 0,05$) (Figure 52.C-D et E). Il semblerait donc qu'une augmentation du nombre d'OSNs matures ait lieu après 8 semaines de HFruD. Ces résultats, bien que surprenants, sont donc cohérents avec l'étude du taux d'apoptose et de prolifération cellulaire.

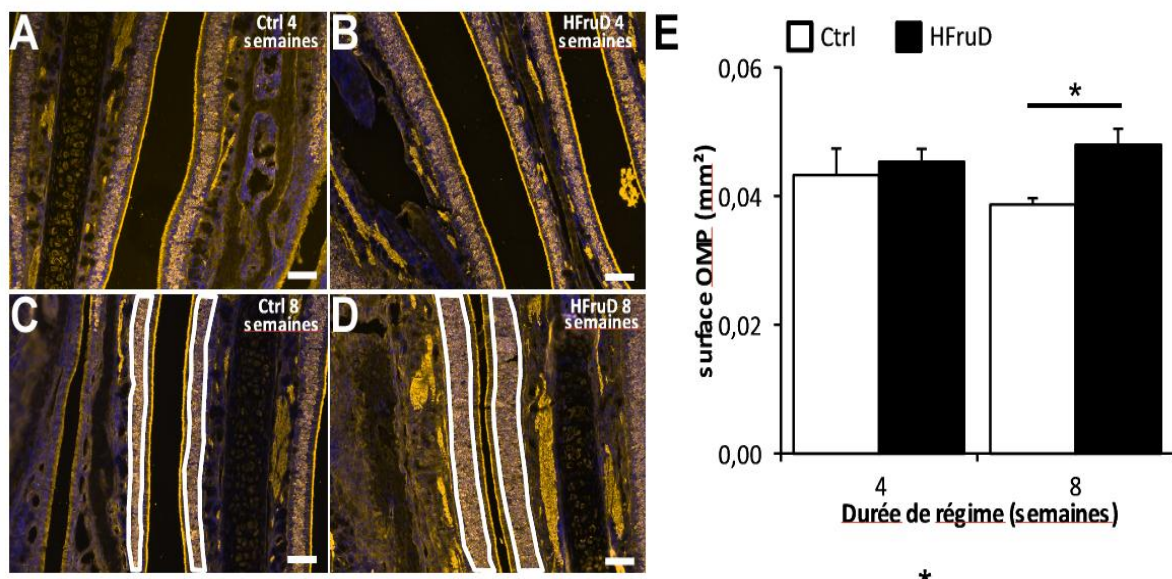
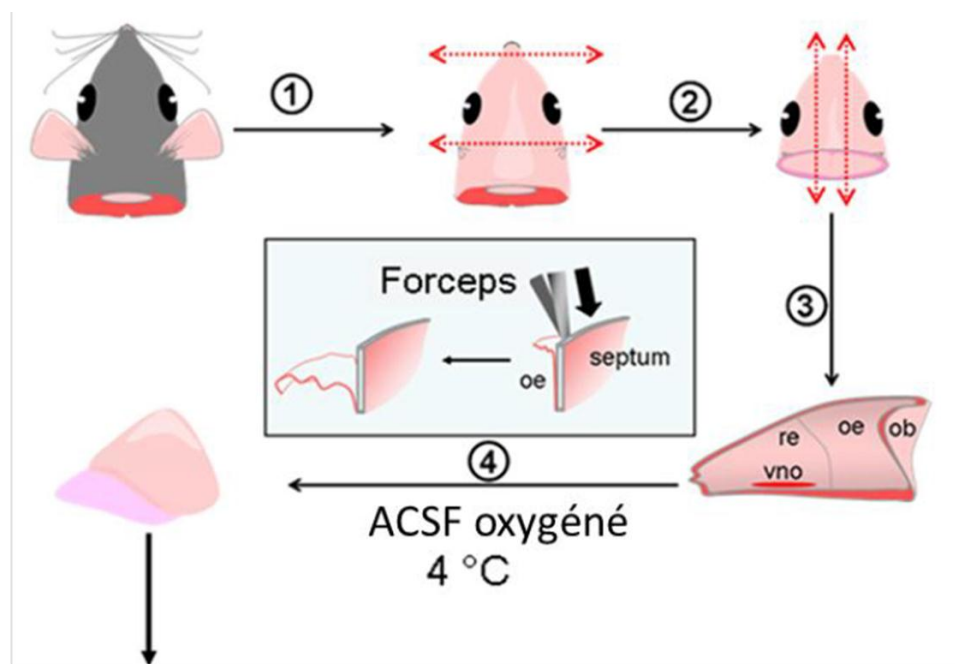


Figure 52 : Expression de l'OMP au sein de la muqueuse olfactive. A-D. Photos représentatives du marquage OMP (en jaune) ; les noyaux des cellules étant marqués en bleu (hoechst). Les cadres blancs indiquent une différence de surface du marquage OMP entre les animaux Ctrl et HFruD. Barre d'échelle : 50 μ m. E. Quantification de la surface du marquage OMP exprimé en mm². Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl à 4 (n=5) et 8 (n=5) semaines et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD à 4 (n=6) et 8 (n=6) semaines. * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney.

Comptage des neurones MOR23

Afin de confirmer ces résultats, nous avons décidé de réaliser un comptage manuel d'une population spécifique d'OSNs, une méthode permettant d'estimer la densité neuronale d'une population neuronale donnée et ayant déjà permis de mettre en évidence une modulation d'une population de neurones sous l'influence de facteurs environnementaux (Cadiou et al., 2014). Nos souris transgéniques possédant une fluorescence GFP intrinsèque pour les neurones exprimant le récepteur olfactif MOR23, nous avons disséqué l'épithélium olfactif de souris après 8 semaines de régime, de manière à ne garder que la partie septale de l'EO. Un demi-épithélium (côté gauche ou droit) était utilisé pour les expériences de patch clamp et la deuxième moitié pour réaliser le comptage de neurones.

Les souris étaient anesthésiées à l'aide d'un mélange kétamine + xylazine (respectivement 150 mg/kg et 10 mg/kg du poids total de l'animal) puis décapitées. La tête était placée dans une solution de Ringer (ACSF) contenant (en mM) : NaCl 124, KCl 3, MgSO₄ 1,3, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1,25, glucose 15; pH 7,6 et 305 mOsm. Le pH était maintenu stable à 7,4 en oxygénant la solution avec 95% d'O₂ et 5% de CO₂.



Tissu utilisé pour : patch clamp, comptage de neurones, biologie moléculaire et biochimie

Figure 53 : Schéma de la dissection de l'épithélium olfactif septal. VNO : organe voméro-nasal, re : épithélium respiratoire, oe : épithélium olfactif : ob : bulbe olfactif. D'après (Aoudé, 2012).

L'épithélium olfactif était ensuite disséqué de façon à ne garder que le septum et l'EO s'y rattachant, puis ce dernier était délicatement décollé du septum et récupéré afin de réaliser diverses expériences (Figure 53). Pour le comptage de neurones MOR23, l'EO était ensuite mis à plat et fixé à l'aide d'un mélange PFA 4% + glutaraldéhyde 0,2% pendant 1h à température ambiante. Après rinçage, le tissu était monté entre lame et lamelle dans un

milieu de montage approprié (DAKO). L'intégralité de la surface de l'EO était ensuite photographiée à l'aide d'un microscope BX51WI (Olympus) au grossissement 10X couplé à une caméra Olympus DP72 et à une lampe fluorescente. Une image unique était ensuite reconstituée grâce au plugin MosaicJ sur le logiciel ImageJ. Un comptage manuel du nombre de neurones MOR23 était ensuite réalisé et la densité neuronale exprimée par le ratio entre le nombre de neurones GFP+ et la surface minimale de l'EO incluant des neurones MOR23 visibles.

Après 8 semaines de régime, les animaux HFruD présentent une densité neuronale augmentée de 17,59% par rapport aux animaux contrôle ($p < 0,05$) (Figure 54). Ces résultats sont cohérents avec la hausse du marquage OMP constatée après 8 semaines de HFruD. Il semble donc bien qu'une hausse du nombre de neurones ait lieu au sein de la MO chez nos animaux diabétiques, ce qui est cohérent avec une baisse de l'apoptose sans changement de prolifération cellulaire.

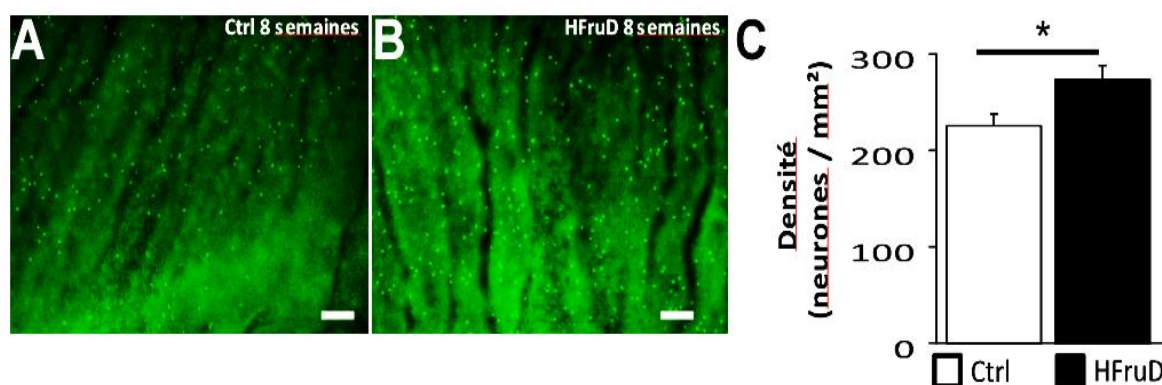


Figure 54 : Mesure de la densité de neurones exprimant MOR23. A-B. Photos représentatives de la densité des neurones MOR23 GFP+. Barre d'échelle : 50 μ m. C. Quantification de la densité neuronale. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl (n=12) et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD (n=9). * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney.

La seule autre étude publiée s'intéressant à la dynamique cellulaire de la muqueuse olfactive après changement du régime alimentaire (Thiebaud et al., 2014), en l'occurrence un régime enrichi en graisse (HF) et un régime enrichi modérément en graisse (MHF), a trouvé des résultats bien différents. Dans cette étude, une diminution du nombre de neurones M72 était retrouvée que les animaux soient sous régime HF ou MHF. Pour la population neuronale totale, mesurée à l'aide d'une lignée transgénique exprimant la GFP au sein de tous les OSNs matures, seuls les animaux sous MHF présentaient une diminution du nombre de neurones, et seulement dans le cornet IIb. L'étude de l'apoptose a été réalisée avec un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée et avec la méthode TUNEL, les deux méthodes indiquant une hausse du taux d'apoptose chez les animaux MHF uniquement. Enfin la prolifération cellulaire a été étudiée avec un anticorps dirigé contre Ki67 (équivalent à PCNA) et une hausse de la prolifération est retrouvée chez les animaux MHF uniquement.

Nous pouvons donc voir que l'effet du HFruD est complètement différent (et même à l'opposé) des effets obtenus avec un régime enrichi en graisse. Cependant, seuls les animaux HF présentent une intolérance au glucose et une hyperglycémie à jeun et non les animaux MHF. Il est donc plus que probable que les mécanismes mis en évidence par Thiebaud et collaborateurs, soient reliés au phénotype obèse des animaux et non au DT2.

Comment expliquer la baisse de l'activité électrique de la muqueuse olfactive alors qu'une augmentation du nombre de neurones est retrouvée chez nos animaux diabétiques ? Une explication possible est que des neurones en « fin de vie » et devant entrer dans le processus apoptotique soient maintenus en place dans la MO, alors que de nouveaux neurones continuent de se différencier. Dans ce cas, la population neuronale totale de la muqueuse olfactive serait constituée d'un mélange de neurones fonctionnels et de neurones « vieillissants » non fonctionnels (ou moins fonctionnels). Nous avons donc mesuré les réponses électriques de neurones individuels dans la MO par patch clamp afin d'étudier de possibles dérèglements fonctionnels au niveau des OSNs.

III. Etude fonctionnelle au niveau du neurone individuel (patch clamp)

Protocole

L'étude fonctionnelle de l'activité des OSNs a été réalisée par patch clamp sur une préparation intacte d'épithélium olfactif (Grosmaître et al., 2006; Jarriault and Grosmaître, 2015), une méthode permettant d'enregistrer l'activité électrique des OSNs au sein de la MO. Cette méthode permet l'enregistrement des courants de transduction au niveau du bouton dendritique des OSNs, *i.e.* le tout premier événement de la détection des odorants. L'épithélium olfactif des animaux après 8 semaines de régime a été récupéré comme décrit dans l'expérience précédente (Figure 53). Par la suite, l'EO a été mis à plat dans une chambre d'enregistrement de façon à ce que le côté apical soit orienté vers le haut (afin de pouvoir visualiser les boutons dendritiques fluorescents) (Figure 55.A). Tout au long de l'expérience, la solution de Ringer à température ambiante était perfusée dans la chambre. Les boutons dendritiques fluorescents étaient visualisés à l'aide d'un microscope BX51WI (Olympus) au grossissement X40 équipé d'une caméra Olympus DP72 et d'une lampe fluorescente. Un grossissement supplémentaire (X4) était réalisé grâce à une lentille grossissante.

Les enregistrements électrophysiologiques étaient contrôlés par un amplificateur EPC-10 USB relié au logiciel Patchmaster (HEKA Electronic). La méthode de patch clamp perforée permet un accès électrique à la cellule grâce à l'ajout de 260 μ M de nystatine dans la pipette d'enregistrement, elle-même remplie avec la solution suivante (en mM) : KCl 70, KOH 53, acide méthanesulfonique 30, EGTA 5, HEPES 10, sucrose 70; pH 7.2 (KOH) et 310 mOsm. En effet, la surface du bouton dendritique est trop petite pour pouvoir rompre la membrane plasmique par aspiration afin d'obtenir une configuration « whole cell » classique. La

nystatine permet donc de perméabiliser la membrane de la cellule afin d'avoir un accès électrique à cette dernière. Pour les réponses obtenues (courants de transduction) après stimulation odorante, les signaux étaient échantillonnés à 20 kHz. En mode « voltage-clamp » (le voltage étant imposé, on mesure donc un courant), les signaux étaient filtrés à 10 kHz puis à 2,9 kHz.

Une pipette de stimulation à 7 canaux était utilisée pour les stimulations odorantes, les odorants étant envoyés vers la préparation par éjection pressurisée *via* un picospritzer (Pressure System Ile, Toohey Company). L'électrode de stimulation était placée à $\sim 20 \mu\text{m}$ du site d'enregistrement. Toutes les stimulations étaient appliquées avec une pression de 138 kPa et sur une durée de 500 ms. Ces caractéristiques de distance et de pression permettent de minimiser autant que possible les réponses dues à une stimulation mécanique et non olfactive (Grosmaître et al., 2007).

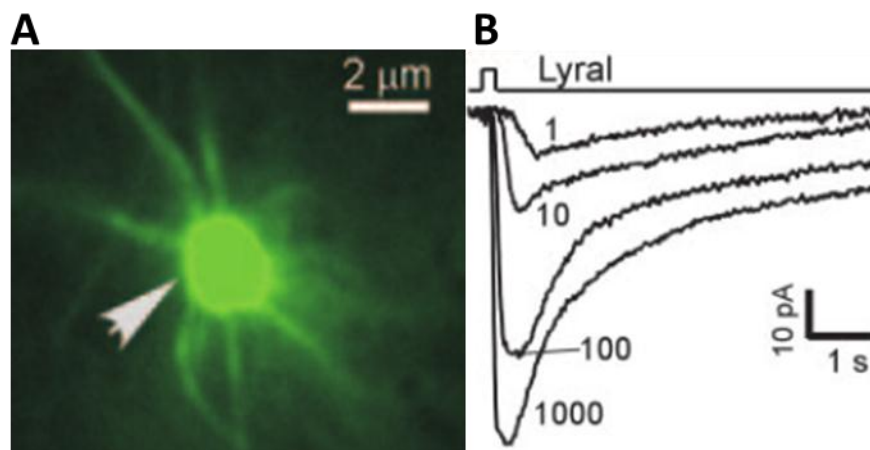


Figure 55 : Les neurones MOR23 répondent au lyral de manière dose-dépendante. A. Photo d'un bouton dendritique fluorescent exprimant le récepteur olfactif MOR23. B. Exemple de réponses obtenues après des stimulations avec des concentrations croissantes de lyral (en μM). D'après (Grosmaître et al., 2006).

Les neurones MOR23 répondent de façon spécifique au lyral de manière dose-dépendante (Grosmaître et al., 2006) (Figure 55.B). La solution-mère de lyral à 0,5 M était préparée dans le DMSO et gardée à -20°C . Les concentrations finales de lyral étaient préparées avant chaque expérience en diluant cette solution dans le Ringer. La capacité de fonctionnement de la voie de transduction a été étudiée en enregistrant les réponses des neurones après stimulation avec une solution contenant 200 μM d'IBMX et 20 μM de forskoline dilués dans la solution de Ringer. Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich à l'exception du lyral, un don généreux de International Flavors and Fragrances.

Les données ont été analysées avec les logiciels Fitmaster (HEKA) et IgorPro (Wavemetrics). Les critères analysés pour l'étude des courants de transduction sont les suivants : l'amplitude de la réponse, le temps d'attaque ou rise time (temps entre 0 et 90% de l'amplitude maximale) correspondant à la vitesse de dépolarisation de la membrane, le

courant total élicité par la réponse (aire sous la courbe) et le temps à 50% (durée de la largeur de la réponse à 50% de l'amplitude maximale) correspondant à la durée pendant laquelle la transduction est active (Figure 56). Les courbes dose-réponses ont été obtenues grâce au logiciel Origin (OriginLabs), en utilisant l'équation de Hill : $I = I_{max} / (1 + (K_{1/2}/C)^n)$, où I représente l'amplitude, I_{max} la réponse maximale en concentration saturante, $K_{1/2}$ la concentration à laquelle 50% de la réponse maximale est atteinte, C la concentration de l'odorant et n le coefficient de Hill (Figure 57.B). En mode « current-clamp », la fréquence de décharge des neurones a été analysée grâce à l'add-on SpAcAn pour Igor Pro (Dugué et al., 2005).

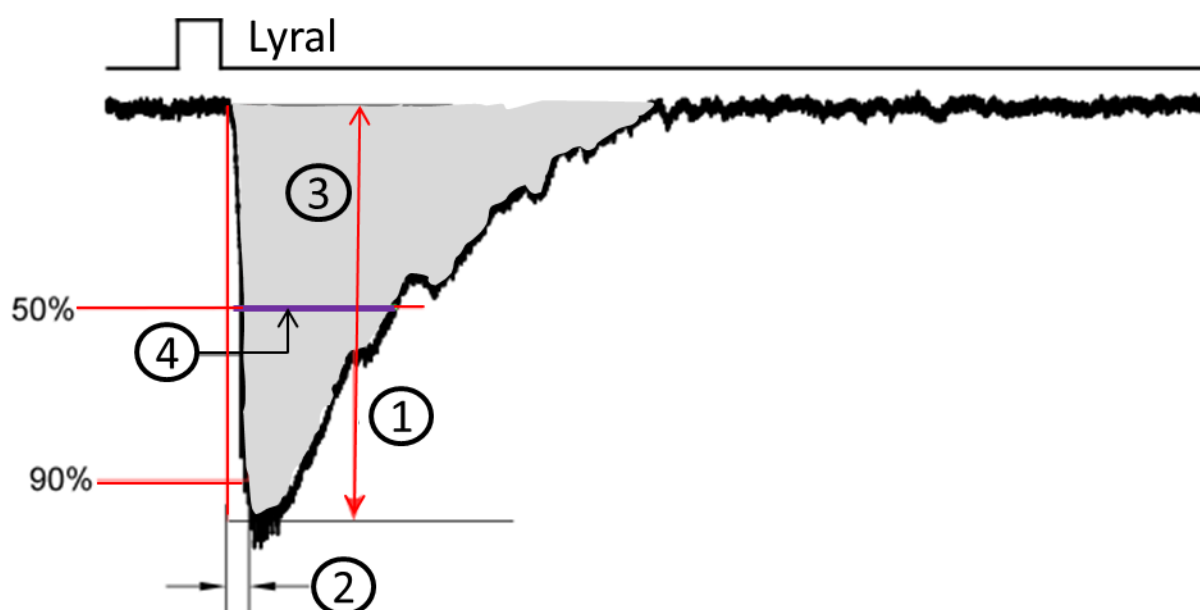


Figure 56 : Schéma illustrant les critères étudiés pour le patch clamp en mode voltage-clamp. Schéma d'une trace de patch-clamp en mode « voltage-clamp ». 1 : amplitude de réponse maximale, 2 : temps d'attaque, 3 : courant total (en gris), 4 : temps à 50%.

Résultats : réponses à une stimulation odorante

En mode « voltage-clamp », les neurones MOR23 répondent à des concentrations croissantes de lyril de façon dose-dépendante pour les animaux contrôle et HFruD (Figure 57.A). Cependant, on peut voir que la courbe dose-réponse moyenne des animaux HFruD semble déviée vers la droite par rapport à celle des animaux contrôle, suggérant une sensibilité au lyril réduite (Figure 57.B). Après analyse, il apparaît que les réponses des animaux HFruD sont plus faibles que celles des animaux contrôle puisque l'amplitude maximale de la réponse des neurones MOR23 après stimulations avec des concentrations saturantes de lyril est diminuée de 35% chez les animaux HFruD comparés aux contrôle ($p < 0,05$) (Figure 57.C1). La valeur du $K_{1/2}$ des animaux HFruD est nettement supérieure à celle des animaux contrôle (15,6 μM vs 3 μM , $p < 0,05$), ce qui signifie donc que les neurones HFruD ont besoin d'une concentration en odorant plus forte pour atteindre 50% de l'amplitude maximale de réponse, *i.e.* une baisse de la sensibilité au lyril (Figure 57.C2). En

revanche, on ne retrouve pas de différence pour la valeur du coefficient de Hill entre les deux groupes d'animaux ($p = 0,72$), ce qui veut dire que le spectre dynamique de réponse reste inchangé ou, autrement dit, que les phénomènes de saturation sont similaires pour les deux groupes d'animaux (Figure 57.C3). De façon générale, on peut donc dire que les réponses des neurones MOR23 au lyral sont diminuées chez les souris après 8 semaines de HFruD.

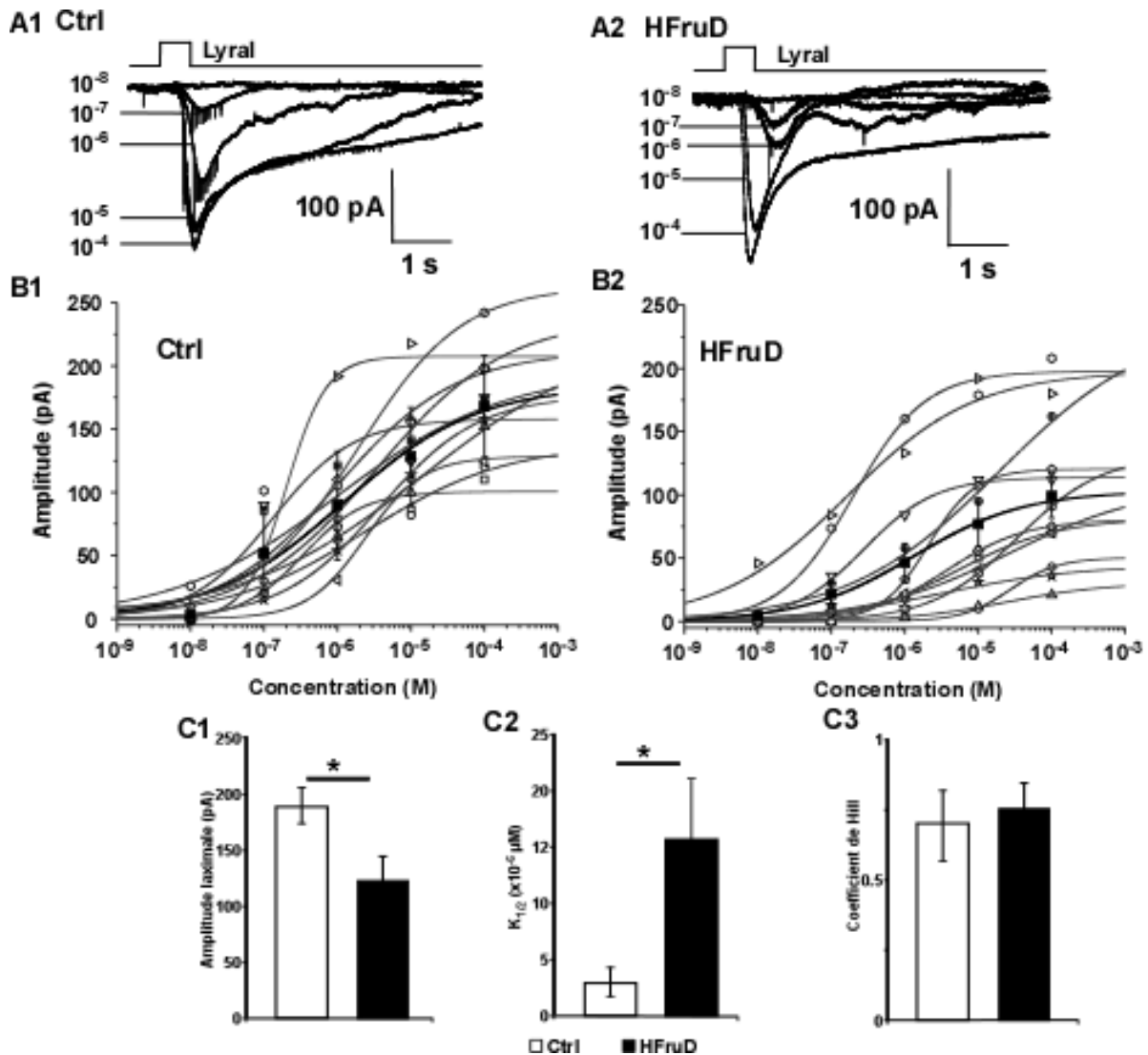


Figure 57 : La sensibilité de la réponse aux odorants des neurones MOR23 est réduite après 8 semaines de HFruD. A. Exemples de traces obtenues après stimulations avec des concentrations croissantes de lyral (en M) pour une cellule Ctrl (A1) et HFruD (A2). B. Courbes dose-réponse représentant l'amplitude maximale du courant obtenu en fonction de la concentration en lyral pour les neurones Ctrl (B1, n=11) et HFruD (B2, n=12). Les symboles noirs et la ligne noire épaisse représentent la valeur moyenne $\pm$ sem de la réponse des neurones Ctrl et HFruD. C. Quantification des caractéristiques des courbes dose-réponse. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD. * : $p < 0,05$ après un test t de Student. C1. Amplitude maximale. C2. $K_{1/2}$, concentration à laquelle 50% de l'amplitude maximale est atteinte. C3. Coefficient de Hill.

Pour l'étude des cinétiques de réponse des neurones MOR23, nous nous sommes placés à une concentration en lyral de 10^{-5} , proche de la valeur du $K_{1/2}$. Tous les neurones MOR23 enregistrés répondent à cette concentration de lyral. L'amplitude maximale de réponse est diminuée de 35% chez les animaux HFruD comparés aux contrôle ($p < 0,05$) (Figure 58.A). Les réponses sont également plus courtes puisque le temps à 50% est réduit de 45% entre les animaux Ctrl et HFruD ($p < 0,05$) (Figure 58.D). Le courant total élicité par la stimulation de lyral est également réduit de 57% chez les animaux HFruD comparés aux contrôle ($p < 0,05$) (Figure 58.C). En revanche, le temps d'attaque n'est pas modifié par le régime enrichi en fructose ($p = 0,35$) (Figure 58.B). Il semble donc que les réponses des neurones MOR23 après stimulation au lyral soient plus faibles et plus courtes après 8 semaines de HFruD.

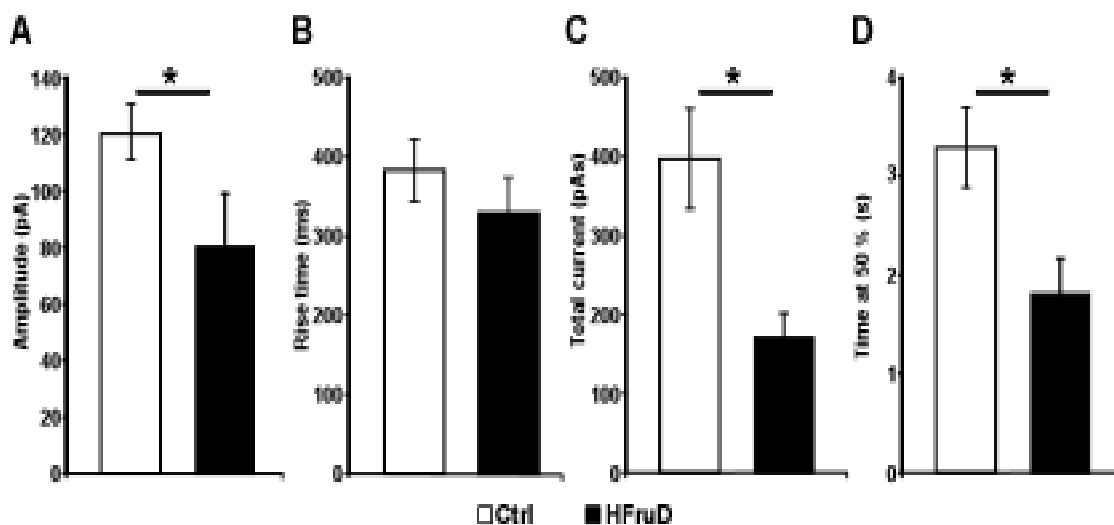


Figure 58 : Les cinétiques de réponses des neurones MOR23 au lyral sont modifiées après 8 semaines de HFruD. Toutes les données représentent les valeurs de chaque caractéristique de réponse pour une concentration de lyral de 10^{-5} exprimées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les valeurs des neurones Ctrl et les histogrammes noirs celles des neurones HFruD. A. Amplitude de réponse pour les neurones Ctrl (n=10) et HFruD (n=12). B. Temps d'attaque pour les neurones Ctrl (n=17) et HFruD (n=10). C. Courant total élicité pour les neurones Ctrl (n=16) et HFruD (n=10). D. Largeur à 50% pour les neurones Ctrl (n=10) et HFruD (n=17). * : $p < 0,05$ après un test t de Student.

Résultats : capacités de transduction

Afin de savoir si la capacité de fonctionnement de la voie de transduction était modifiée par le HFruD, les réponses des neurones MOR23 ont été enregistrées après stimulation avec une solution contenant 200 μ M d'IBMX et 20 μ M de forskoline. L'IBMX est un puissant inhibiteur de la phosphodiesterase (Firestein et al., 1991; Lowe and Gold, 1993), et la forskoline est un activateur bien connu de l'adenylyl cyclase (Sklar et al., 1986; Sato et al., 1994). Cette solution permet donc d'activer la voie de transduction AMPc-dépendante et de quantifier la capacité totale de la cascade de transduction. Il apparaît que l'amplitude du courant maximal élicité par cette solution est diminuée de 46% chez les animaux HFruD par rapport aux animaux contrôle ($p < 0,05$ après un test t de Student, résultats non montrés). Il semble

donc que la machinerie cellulaire responsable de la transduction olfactive soit modifiée par le HFruD.

Résultats : activité spontanée

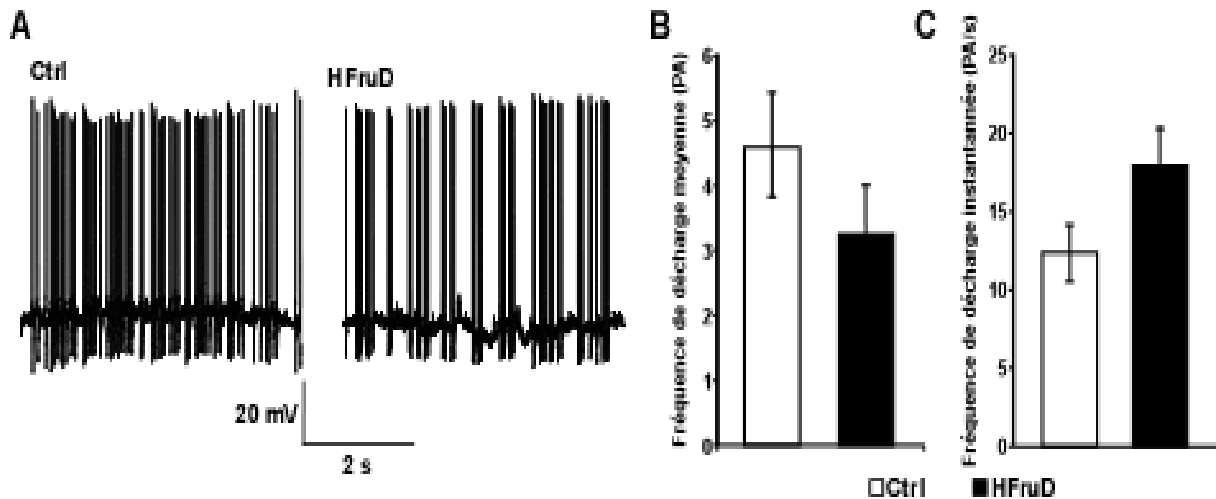


Figure 59 : Activité spontanée des neurones MOR23 après 8 semaines de HFruD. A. Exemple de traces obtenues en enregistrant l'activité spontanée des neurones. B-C. Quantification des fréquences de décharge moyenne et instantanée. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les fréquences de décharge des neurones Ctrl (n=16) et les histogrammes noirs les fréquences de décharge des neurones HFruD (n=10). B. Fréquence de décharge moyenne. C. Fréquence de décharge instantanée.

Par la suite, en mode « current-clamp » cette fois, nous avons mesuré l'activité spontanée des neurones MOR23 ainsi que leur excitabilité. L'activité spontanée a été mesurée en enregistrant des neurones MOR23 sans aucune stimulation pendant 30 à 40 secondes. La fréquence de décharge moyenne n'est pas modifiée par le HFruD ($p = 0,24$) (Figure 59.B). La fréquence de décharge instantanée, représentative du profil de décharge des neurones (de manière continue ou en rafale) ne semble pas non plus être affectée par le HFruD ($p = 0,1$), bien qu'une tendance à l'augmentation soit visible (Figure 59.C). De façon générale, l'activité spontanée des neurones MOR23 n'est donc pas modifiée après 8 semaines de régime enrichi en fructose.

Résultats : excitabilité

L'excitabilité des neurones MOR23 a été évaluée après stimulation avec un courant dépolarisant de 7 pA pendant 2 secondes. Ce courant induit la formation de potentiels d'action, aussi bien chez les animaux contrôle que chez les animaux HFruD (Figure 60.A-B). Le courant dépolarisant induit la formation de 53% moins de potentiels d'action chez les animaux HFruD que les chez les contrôle ($p < 0,05$) (Figure 60.C). Le temps de latence avant la formation du premier potentiel d'action est augmenté de 42% chez les souris HFruD comparées aux souris contrôle ($p < 0,05$) (Figure 60.D). En revanche l'intervalle inter-potentiels d'action, qui représente le profil de décharge du neurone, n'est pas modifié par le

HFruD ($p = 0,33$) (Figure 60.E). Il semble donc que l'excitabilité des neurones MOR23 soit diminuée après 8 semaines de régime enrichi en fructose.

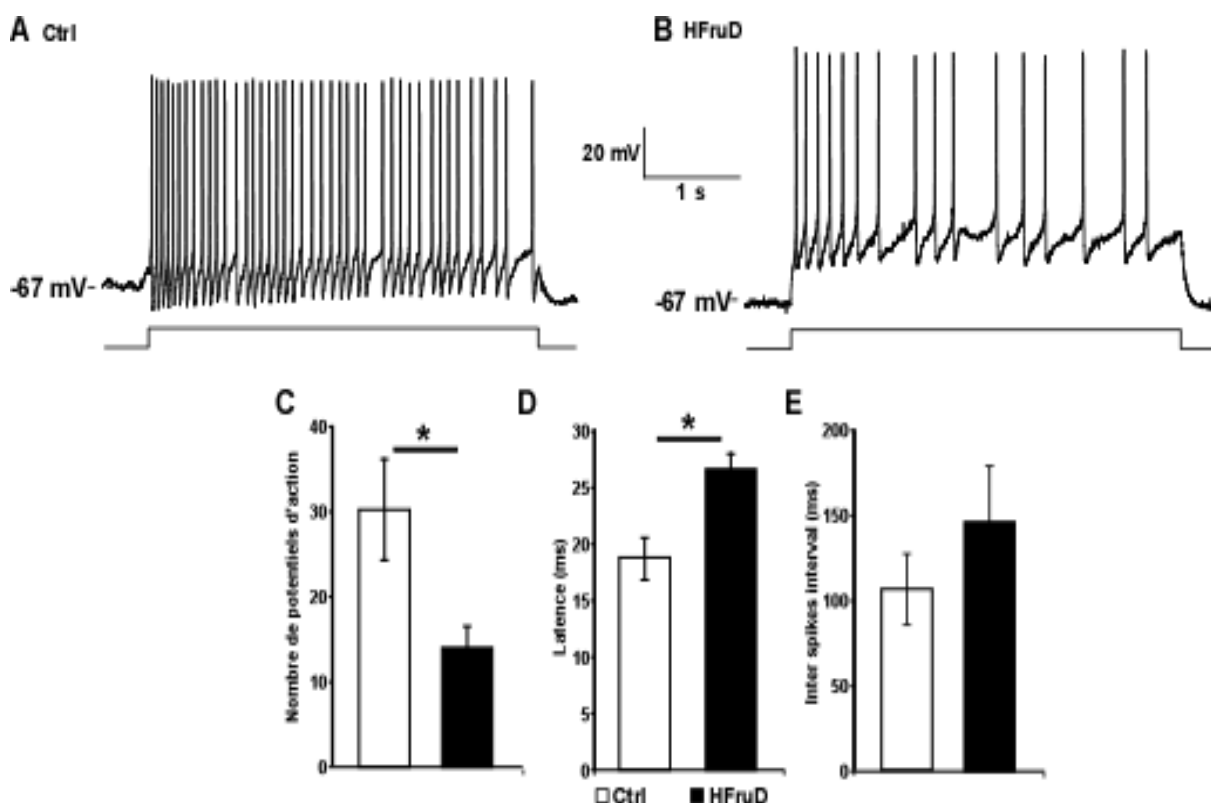


Figure 60 : L'excitabilité des neurones MOR23 est modifiée après 8 semaines de HFruD. A-B. Exemples de traces obtenues après stimulation des neurones MOR23 avec un courant dépolarisant de 7 pA. C-E. Quantification des paramètres de réponses des neurones MOR23. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les valeurs pour les neurones Ctrl (n=13) et les histogrammes noirs les valeurs pour les neurones HFruD (n=18). *: $p < 0,05$ après un test t de Student. C. Nombre de potentiels d'action. D. Latence avant le premier potentiel d'action. E. Intervalle entre potentiels d'action.

Au final, à la fois les réponses aux stimulations odorantes et l'excitabilité des neurones MOR23 sont diminués chez les animaux HFruD comparés aux animaux contrôle après 8 semaines de régime. Ces résultats sont cohérents avec la diminution des signaux EOG constatée après 8 semaines de HFruD. Il semblerait donc que les OSNs soient moins fonctionnels chez nos animaux diabétiques.

En revanche, dans l'hypothèse où des neurones vieillissants seraient maintenus en place dans l'EO, les neurones enregistrés pourraient varier d'un profil parfaitement normal à une absence totale de réponse. Ici, tous les neurones répondent au lyral mais nous n'avons pas pu enregistrer suffisamment de neurones pour faire apparaître l'existence de « sous-populations » de neurones possédant un profil de réponse caractéristique. Nous ne pouvons donc ni confirmer, ni infirmer l'hypothèse de neurones vieillissants maintenus dans la MO. Quoi qu'il en soit, il est évident qu'en plus d'une modification anatomique de la MO, les

OSNs en eux-mêmes présentent des dysfonctionnements de leur activité électrique, ce qui est suffisant à expliquer les résultats d'EOG.

Aucune étude n'ayant enregistré l'activité électrique des OSNs dans un modèle de maladie métabolique, il est impossible de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Tout au plus, peut-on affirmer que ces derniers laissent supposer un effet direct de la pathologie (ou tout du moins d'une caractéristique de la pathologie) sur le fonctionnement correct des neurones sensoriels olfactifs. Bien sûr, les effets que nous observons ne représentent qu'une population particulière d'OSNs (à savoir ceux exprimant le récepteur olfactif MOR23) mais il n'y a aucune raison de penser qu'une pathologie telle que le DT2, entraînant des modifications dans des organes très différents, n'affecte qu'une seule population d'OSNs.

Avant d'entamer la question d'un possible mécanisme qui pourrait expliquer les différences anatomiques et fonctionnelles constatées au sein de la MO, nous avons souhaité approfondir un peu l'étude anatomique en s'intéressant cette fois-ci à l'anatomie des cils olfactifs des OSNs et aux connexions épithélio-bulbaires.

IV. Anatomie des cils olfactifs et connexions épithélio-bulbaires

a. Anatomie des cils olfactifs

L'anatomie (et notamment la longueur) des cils olfactifs est essentielle pour obtenir des réponses normales à une stimulation odorante (Kaneko-Goto et al., 2013; Challis et al., 2015). La diminution de l'amplitude de réponse des OSNs à une stimulation odorante constatée chez nos animaux HFruD pourrait être due à une diminution de la taille des cils ou du nombre total de cils par OSN.

L'anatomie des cils olfactifs des neurones MOR23 a donc été étudiée en réalisant une mise à plat de l'épithélium olfactif (même protocole que pour le comptage des neurones MOR23) après 8 semaines de régime. Cette fois-ci, en revanche, l'épithélium n'était pas fixé mais placé dans une chambre d'enregistrement sous perfusion constante avec une solution de Ringer. Les boutons dendritiques munis de leurs cils olfactifs étaient repérés grâce à un microscope Olympus BX51WI à l'objectif 40X, couplé à une lampe fluorescente et à une caméra PCO Imaging SensiCam. Un grossissement supplémentaire (X2) était réalisé grâce à une lentille grossissante.

Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel FIJI et les cils olfactifs reconstruits grâce au plug-in Simple Neurite Tracer pour FIJI (NIH). Le nombre total de cils par OSN ainsi que la longueur moyenne des cils par OSN ont été analysés.

Les animaux HFruD présentent un nombre de cils par OSN similaire aux animaux contrôle ($p = 0,7$ après un test de Mann-Whitney) (Figure 61.B). De plus la longueur moyenne des cils n'est pas modifiée après 8 semaines de HFruD ($p = 0,9$ après un test de Mann-Whitney)

(Figure 61.C). Le régime enrichi en fructose n'a pas d'incidence sur l'anatomie des cils olfactifs. Il est donc probable que les effets fonctionnels mesurés en patch clamp soient dus à un autre mécanisme qu'un changement anatomique des cils olfactifs.

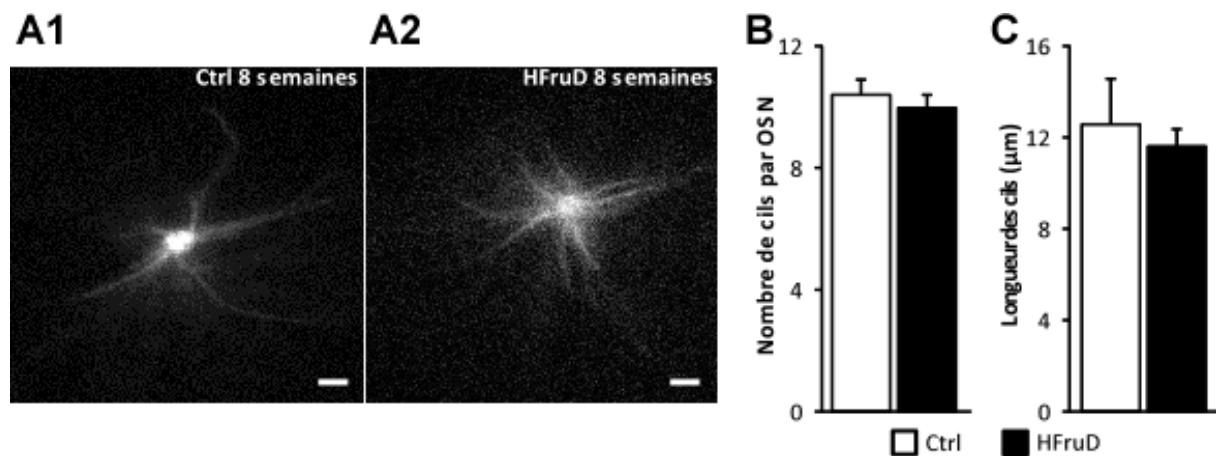


Figure 61 : 8 semaines de HFruD n'induisent pas de changement de l'anatomie des cils olfactifs. A. Photos représentatives des boutons dendritiques de neurones MOR23 munis de leurs cils olfactifs après 8 semaines de régime. Barre d'échelle : 2 μ m. B. Quantification du nombre de cils par OSN. C. Quantification de la longueur moyenne des cils par OSN. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ sem pour les animaux contrôle (n=7) et HFruD (n=7).

b. Connexions épithélio-bulbaires

Protocole

La structure des connexions épithélio-bulbaires a été étudiée en utilisant, une fois de plus, la fluorescence intrinsèque des neurones MOR23-GFP. Notre lignée de souris transgéniques expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *mor23* fusionné avec la protéine tau, une protéine fortement exprimée dans les axones des neurones (Black et al., 1996). De cette façon, la GFP est fortement exprimée dans les axones des neurones MOR23, ce qui permet un très bon marquage des connexions épithélio-bulbaires pour cette population de neurones.

Etant donné que le nombre de neurones MOR23 est augmenté après 8 semaines de HFruD, nous nous sommes demandé si les connexions épithélio-bulbaires allaient également être modifiées par le HFruD. Nous avons donc décidé d'estimer la surface du marquage GFP au niveau de la couche glomérulaire du bulbe olfactif, une mesure représentative du nombre de connexions, afin de voir si les neurones MOR23 se connectaient efficacement et de façon normale dans le bulbe olfactif.

Pour ce faire, le cerveau de souris après 8 semaines de régime a été disséqué de manière à garder les bulbes olfactifs intacts et ceux-ci ont été post-fixés dans une solution de PFA à 4% pendant 2h. Ils ont ensuite été lavés, cryoprotégés (par immersion dans une solution de sucrose 30%) et congelés dans les vapeurs d'azote liquide. Des coupes coronales de 14 μ m

d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica microsystems) et collectées directement sur une lame de verre. Les coupes ont ensuite été placées à -80°C avant usage.

Deux glomérules MOR23 par bulbe olfactif existent et sont localisés pour l'un dans la partie antérieure du BO et pour l'autre dans la partie postérieure du BO (Vassalli et al., 2002). Toutes les coupes contenant du marquage GFP ont été sélectionnées et montées entre lames et lamelles dans du vectashield + DAPI afin de pouvoir visualiser les noyaux des cellules. Une photo par coupe a ensuite été prise à l'aide d'un microscope Imager M2 (Zeiss) au grossissement 20X. Les bulbes droits et gauches ont été utilisés indifféremment et une valeur moyenne (BO droit + gauche) correspondant à l'aire maximale ou totale de chaque glomérule a été calculée à l'aide du logiciel ImageJ.

Résultats

Premièrement, chaque bulbe olfactif contient 2 glomérules MOR23 chez les animaux contrôle et HFruD et la localisation de ces derniers ne semble pas affectée par le HFruD. Chaque glomérule est présent sur plusieurs coupes de tissus et une première analyse prenant en compte uniquement la coupe sur laquelle la surface du glomérule était maximale a montré une diminution de la surface des glomérules MOR23 pour les animaux HFruD comparés aux animaux contrôle (Figure 62.A-D). Plus précisément la surface maximale des glomérules MOR23 antérieurs est diminuée de 27% ($p < 0,05$) et celles des glomérules MOR23 postérieurs de 23% ($p < 0,05$) chez les animaux HFruD comparés aux contrôle (Figure 62.E).

Ce résultat est particulièrement surprenant car le nombre de neurones MOR23 est augmenté dans la MO et qu'une étude récente a mis en évidence que ce dernier est corrélé avec la taille des glomérules correspondants dans le BO (Bressel et al., 2015). Cependant, dans cette étude, c'est l'aire totale de chaque glomérule et non l'aire maximale qui avait été étudiée. En reprenant nos résultats, nous nous sommes rendu compte que le nombre de coupes sur lesquelles les glomérules MOR23 étaient répartis était plus important chez les animaux HFruD que chez les animaux contrôle. Nous avons alors estimé l'aire totale de chaque glomérule en additionnant les aires des glomérules sur chaque coupe pour un animal.

En effectuant l'analyse de cette façon, aucune différence n'a été retrouvée entre les animaux contrôle et HFruD pour l'aire totale des glomérules antérieurs ($p = 0,95$) et postérieurs ($p = 0,94$) (Figure 62.E). Il apparaît donc que la taille des glomérules MOR23 n'est pas modifiée après 8 semaines de HFruD mais que la morphologie de ces derniers n'est pas la même que celle des animaux contrôle. Les glomérules MOR23 sont plus allongés selon l'axe rostro-caudal après 8 semaines de HFruD.

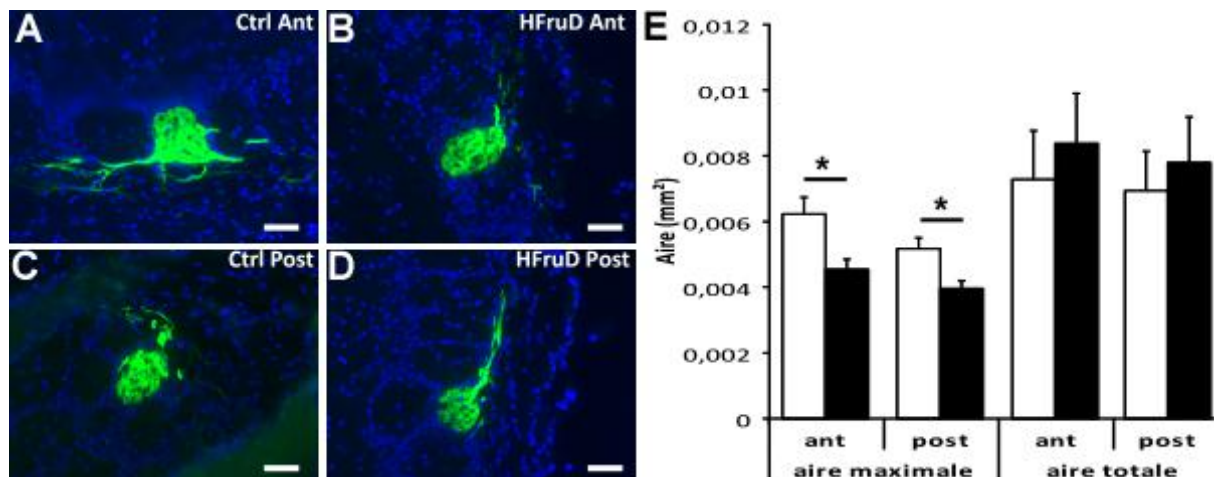


Figure 62 : Surface des glomérules MOR23 après 8 semaines de régime. A-D. Photos représentatives de l'aire maximale des glomérules antérieurs (ant) et postérieurs (post) MOR23 (en vert) ; les noyaux des cellules étant marqués en bleu (hoechst). Barre d'échelle : 50µm. E. Quantification de l'aire maximale ou totale des glomérules MOR23. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les aires des glomérules MOR23 antérieurs (n=5) et postérieurs (n=10) pour les animaux Ctrl et les histogrammes noirs les aires des glomérules MOR23 antérieurs (n=5) et postérieurs pour les animaux HFruD (n=8). * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney.

Comment expliquer que l'augmentation du nombre de neurones MOR23 dans la muqueuse olfactive ne semble pas être suivie d'une augmentation de la taille des glomérules correspondants dans le bulbe olfactif ?

Premièrement, on pourrait penser que les neurones MOR23 surnuméraires ne se connectent pas aux neurones-relais dans le bulbe olfactif. Or, il a été démontré que lorsque de nouveaux OSNs ne parviennent pas à se connecter au niveau des glomérules, une mort des neurones par apoptose survient très rapidement (Carr and Farbman, 1993). Il est donc très peu probable que les neurones MOR23 surnuméraires ne soient reliés à rien.

Une autre possibilité serait la mise en place de connexions anormales pour les nouveaux neurones MOR23 qui n'auraient pas la possibilité de se connecter dans le bon glomérule. Les axones pourraient alors former un nouveau glomérule ou se connecter au sein d'un glomérule pré-existant. Cette hypothèse ne peut être confirmée ni infirmée à l'aide la technique utilisée ici bien qu'aucun glomérule MOR23 surnuméraire n'ait été détecté au sein des coupes de bulbe olfactif. Si ces neurones se connectent de façon erratique dans un glomérule déjà existant, notre technique n'est pas assez sensible pour pouvoir le repérer.

Enfin, il est aussi possible et plus probable que la taille des glomérules ne soit pas différente (par manque de place au sein du BO) mais que la densité des connexions épithélio-bulbaires au sein de chaque glomérule soit augmentée. Si tel est le cas, l'aire totale du glomérule resterait la même mais plus d'axones formeraient des synapses dans chaque glomérule. Une fois encore, la technique utilisée ici n'est pas assez sensible pour confirmer cette hypothèse.

Une estimation de la densité des axones MOR23 dans le glomérule à l'aide de microscopie biphotonique pourrait être réalisée afin d'apporter une réponse à cette question.

En conclusion, l'anatomie des cils olfactifs ainsi que celle des connexions épithélio-bulbaires ne semblent pas être modifiées après 8 semaines de HFruD. Comment expliquer les perturbations anatomiques et fonctionnelles constatées chez nos animaux diabétiques ?

V. Etude d'un possible mécanisme

La muqueuse olfactive ne recevant pas de connexions en provenance du système nerveux central et nos animaux diabétiques ayant un profil métabolique différent de celui des animaux contrôle, nous nous sommes intéressés à une possible régulation endocrine du tissu. L'insulinémie est augmentée après 8 semaines de HFruD. Etant donné les effets connus de l'insuline au niveau de la MO (voir le chapitre 2 de l'introduction), nous avons décidé d'étudier l'expression du récepteur à l'insuline (IR) par des méthodes de biologie moléculaire et de biochimie. Nous avons aussi étudié l'expression d'iba1, un marqueur d'inflammation, puisque le DT2 est souvent associée à des processus inflammatoires (Hameed et al., 2015).

a. Etude des transcrits du récepteur à l'insuline dans la MO

Extraction d'ARN et transcription inverse

L'expression de l'ARNm des différents isoformes du récepteur à l'insuline a été étudiée par RTqPCR. Cette technique permet d'amplifier une région d'intérêt du génome et ainsi de mesurer la quantité initiale d'ARNm dans un tissu. Tout d'abord, l'EO a été disséqué chez des souris après 4 ou 8 semaines de régime. Les animaux, une heure après le retrait de la nourriture, étaient étourdis à l'isoflurane et rapidement décapités. La dissection de l'EO septal a été réalisée comme décrite précédemment (Figure 53) sauf que cette fois-ci, seul l'EO était récupéré et non le reste du tissu. Il était ensuite placé à -80°C avant utilisation.

La première étape de l'expérience est d'obtenir les ARNm contenus dans le tissu. Pour cela, les tissus sont lysés à l'aide d'un tissue lyser (2*2 min à 25Hz) dans un tampon de lyse adéquat (tampon RLT + β -mercaptoéthanol). L'extraction d'ARN sur colonnes de silice est ensuite réalisée à l'aide d'un kit Rneasy mini kit plus (Qiagen). La concentration en ARN ainsi que l'absence de contamination en protéines et en composants organiques (ratio 280/260 et 230/260 > 1,8) ont été mesurés à l'aide d'un Nanodrop 2000 (Thermoscientific). L'intégrité des ARNs a ensuite été vérifiée systématiquement à l'aide de puces Expérien (Biorad ; RQI > 8).

L'ADNc a ensuite été obtenu par transcription inverse à partir de 2 μ g d'ARN en utilisant un kit Superscript III, first strand synthesis system for RTqPCR (Invitrogen) avec ajout de random hexamers et d'oligo dt. L'ADNc était ensuite conservé à -20°C avant utilisation.

Détermination du gène de référence

Plusieurs méthodes sont disponibles afin de quantifier les résultats de PCR mais la plus exacte et la plus largement utilisée est la comparaison à l'aide d'un gène de référence. Ces gènes codent le plus souvent pour des protéines essentielles à la survie de la cellule et sont donc exprimés par l'immense majorité des cellules. Ce qui caractérise un bon gène de référence est sa stabilité dans des conditions expérimentales données. Nous avons donc choisi de tester plusieurs gènes de référence dans nos conditions afin de déterminer lequel serait ensuite utilisé pour la comparaison avec les gènes-cibles testés.

Pour ce faire, nous avons réalisé une qPCR avec le système TaqMan sur une plaque contenant des amorces pour plusieurs gènes de référence couramment utilisés (32 gènes au total). Ces plaques à façon TaqMan (Life Technologies) permettent de s'affranchir des étapes de création d'amorces et des vérifications de spécificité et d'efficacité des amorces (ces étapes étant garanties par le fournisseur). 30 ng d'ADNc provenant d'animaux Ctrl et HFruD à 4 et 8 semaines de régime (n = 3 par groupe) ont été déposés en duplicat avec un tampon adapté (Taqman fast universal master mix) et le programme de PCR suivant a été utilisé : 95°C (20s) puis 40 cycles à 95°C (3s) – 60°C (30s). Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide des logiciels GeNorm, NormFinder et BestKeeper.

Ces logiciels permettent d'évaluer la stabilité de chaque gène en fonction des conditions expérimentales. La **Table 5** présente le classement des meilleurs gènes de référence obtenu avec chaque logiciel.

logiciel	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
GeNorm	<i>pum1</i>	<i>ubc</i>	<i>elf1</i>	<i>casc3</i>	<i>tbp</i>
NormFinder	<i>elf1</i>	<i>ubc</i>	<i>casc3</i>	<i>elf2b1</i>	<i>rpl30</i>
BestKeeper	<i>tbp</i>	<i>ubc</i>	<i>elf2b1</i>	<i>casc3</i>	<i>elf1</i>

Table 5 : Résultats pour la sélection du gène de référence

En prenant en compte les analyses des trois logiciels, il apparaît que le gène le plus stable dans nos conditions expérimentales est *ubc*, le gène codant pour l'ubiquitine c. C'est donc ce gène que nous avons choisi comme gène de référence pour la suite de l'étude.

Design et tests des amorces

Afin d'étudier l'expression du récepteur à l'insuline, nous avons créé des amorces spécifiques pour *ubc*, pour le gène du récepteur à l'insuline (*insr*) et pour ses différents isoformes (*ir-a* et *ir-b*) grâce aux logiciels Amplifx et Primer Blast. Les critères retenus pour la meilleure paire d'amorces étaient : la température d'hybridation (entre 58-62°C), la composition des amorces en GC (proche de 50%), la taille des oligonucléotides (autour de 20 bases), la taille de l'amplicon (entre 80-120 paires de bases) et la non-formation de dimères

d'amorces. Toutes ces amorces et les amplicons théoriques ont été vérifiés sur Blast *via* NCBI et reconnaissent *in silico* spécifiquement les régions d'intérêt (**Table 6**).

Comme expliqué précédemment, les deux isoformes du récepteur à l'insuline sont exprimés dans la muqueuse olfactive (Lacroix et al., 2008). La forme courte IR-a ne possède pas l'exon 11. Les amorces ont donc été créées de manière à reconnaître le récepteur dans sa globalité (exon 10), uniquement la forme longue IR-b (exon 11) ou uniquement la forme courte (à cheval sur les exons 10 et 12). Afin d'être certains de la spécificité de nos amorces, les produits de PCR réalisées avec ces amorces ont été séquencés (séquençage réalisé par Beckman & Coulters Genomics) et les séquences obtenues vérifiées et alignées sous Nucleotide Blast. Les résultats obtenus confirment que nous amplifions bien les bonnes régions des gènes d'intérêt.

Gène	Séquence (5'-> 3')	Taille de l'amplicon	T° d'hybridation
<i>insr</i> sens <i>insr</i> antisens	TGCTCATGCCCTAAGACTGAC CCACGTTGTGCAGGTAATCC	91 pb	60°C
<i>ir-a</i> sens <i>ir-a</i> antisens	TGCTCATGCCCTAAGACTGACT TCTGCCTTAGCTGGGGACAAAA	102 pb	60°C
<i>ir-b</i> sens <i>ir-b</i> antisens	TACCATTGTGCCCACAAGTCA ATGCGGTACCCAGTGAAGTGT	114 pb	60°C
<i>ubc</i> sens <i>ubc</i> antisens	CCCACACAAAGCCCCTCAAT AAGATCTGCATCGTCTCTCTCAC	70 pb	60°C

Table 6 : Design des amorces pour la RTqPCR

L'efficacité de la réaction de PCR a été vérifiée en réalisant un test d'efficacité des amorces. Pour cela, une PCR a été réalisée à partir d'une gamme de dilution standard d'ADNc d'épithélium olfactif. Pour chaque paires d'amorces, l'efficacité de PCR est calculée selon la formule suivante : $E = (10^{1/k} - 1) * 100$ où k représente la pente de la droite du nombre du Ct (cycle treshold ; *i.e.* le nombre de cycles nécessaires à atteindre la valeur-seuil) en fonction de la concentration en ADNc. Il résulte de ces expériences que l'efficacité de PCR pour ces amorces est la même pour tous les couples d'amorces (entre 90 et 93%).

La qPCR à proprement parler a été réalisée par la méthode du SyBrGreen, un marqueur fluorescent qui s'incorpore aux gènes amplifiés à chaque cycle du programme de PCR. 100 ng d'ADNc ont été déposés en duplicat dans chaque puit avec un tampon approprié (Fast SyBrGreen Master mix 2x, Life technologies) avec 250 µM d'amorces et le programme de PCR suivant a été réalisé : 95°C (20s) puis 45 cycles à 95°C (3s) – 60°C (30s).

Résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en Ct puis normalisés avec la méthode du $\Delta\Delta C_t$ qui permet dans un premier temps de normaliser les résultats par rapport au gène de référence puis entre les différents groupes. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une valeur R représentant le ratio d'expression (plus R est proche de 1 et plus l'expression du gène est stable). Ces analyses ont été effectuées grâce au logiciel REST (Pfaffl et al., 2002).

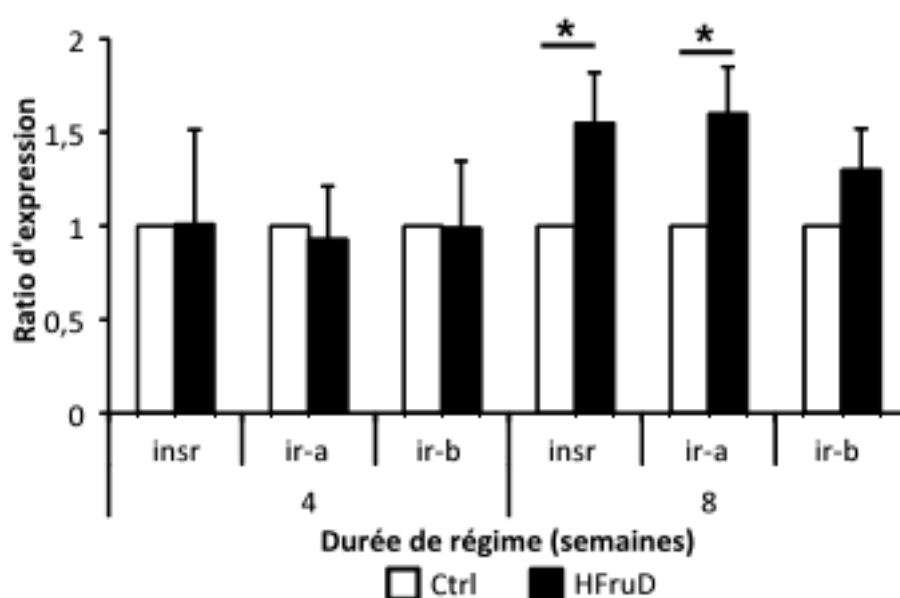


Figure 63 : Surexpression du transcrit du gène codant pour le récepteur à l'insuline dans la MO après 8 semaines de HFrud. Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl et les histogrammes noirs les animaux sous HFrud après 4 (n=3 pour chaque groupe) et 8 (n=4 pour ir-a et n=5 pour insr et ir-b dans chaque groupe) semaines de régime. * : $p < 0,05$ après un test de randomisation avec réallocation appariée.

Il apparaît tout d'abord que le HFrud ne modifie pas l'expression de l'ARNm du gène codant pour le récepteur à l'insuline ni de ses isoformes après 4 semaines de régime (respectivement $p = 0,79$, $p = 0,46$ et $p = 0,96$). En revanche, après 8 semaines de HFrud, une surexpression de l'ARNm du gène codant pour le récepteur à l'insuline dans son ensemble ainsi que pour la forme courte est retrouvée (de respectivement 55 et 65%, $p < 0,05$ dans les deux cas) mais pas pour la forme longue ($p = 0,16$) (Figure 63).

b. Expression protéique du récepteur à l'insuline dans la MO

Afin de savoir si l'augmentation de l'expression de l'ARNm du gène codant pour le récepteur à l'insuline dans la MO se retrouvait au niveau de la protéine, l'expression du récepteur à l'insuline a été mesurée par western blot. L'EO septal des animaux a été récupéré de la même façon que pour les expériences de biologie moléculaire et les tissus stockés à -80°C avant usage. Les tissus ont ensuite été lysés dans un tampon approprié (RIPA + anti-

protéases) et, après quantification de la quantité totale de protéines (kit DC Protein Assay, Biorad), 100 µg de protéines ont été déposées sur un gel d'agarose 10%.

Après migration des protéines, transfert sur membrane de nitrocellulose et blocage dans une solution contenant 5% de lait, les membranes ont été incubées pendant 16h à 4°C avec un anticorps souris anti-IR au 1000^{ème} (Millipore) puis avec un anticorps secondaire mouton anti-souris conjugué avec HRP (horseradish peroxidase, GE Healthcare) au 1000^{ème} pendant 1h à température ambiante. L'actine ayant été choisie comme protéine de référence, les membranes sont ensuite incubées 1h à température ambiante avec un anticorps primaire souris anti-actine au 10000^{ème} (Millipore) puis avec un anticorps secondaire mouton anti-souris conjugué avec HRP (GE Healthcare) au 1000^{ème} pendant 1 h à température ambiante. Les protéines marquées ont ensuite été visualisées par chimiluminescence (enhanced chemoluminescence kit, GE Healthcare) et la densité des bandes de protéines analysée grâce au logiciel Image lab (Biorad).

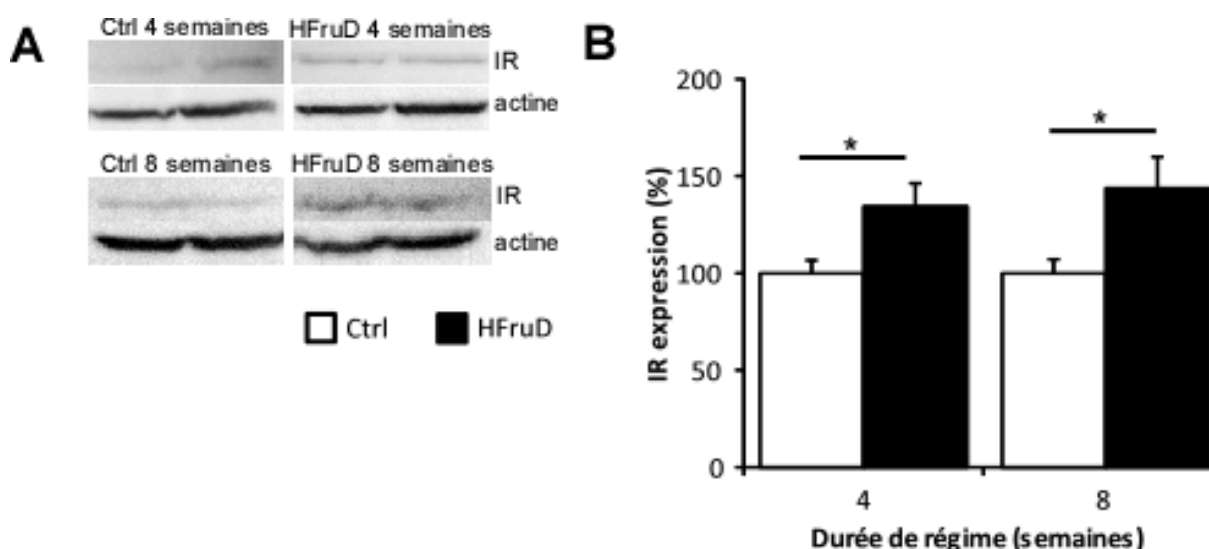


Figure 64 : Surexpression du récepteur à l'insuline dans la muqueuse olfactive après un HFruD. A. Photos représentatives des bandes de protéines obtenues pour IR et pour l'actine. B. Quantification de la densité des bandes de protéines marquées. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl après 4 (n=8) et 8 (n=9) semaines de régime et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD après 4 (n=9) et 8 (n=8) semaines de régime. * : $p < 0,05$ après un test de Mann-Whitney.

Une surexpression du récepteur à l'insuline est retrouvée dans la muqueuse olfactive après 4 et 8 semaines de HFruD ($p < 0,05$ dans les deux cas) (Figure 64). L'augmentation du niveau des transcrits du gène codant pour IR est donc suivie d'une augmentation de l'expression protéique du récepteur. Après 4 semaines de HFruD, aucune régulation des transcrits du gène *insr* n'avait été retrouvée alors qu'une augmentation de l'expression protéique de IR a bien lieu dans la muqueuse olfactive. Il est possible que le faible nombre d'individus en RTqPCR n'ait pas permis de mettre en évidence cette régulation ou que des phénomènes de modifications post-traductionnelles ou de traduction locale puissent expliquer ces résultats.

Le possible rôle de l'insuline dans la muqueuse olfactive chez nos animaux diabétiques sera discuté dans **partie VI.a** de ce chapitre.

c. Expression d'un marqueur d'inflammation : iba1

Une possible inflammation du tissu a été étudiée par western blot (même protocole que pour IR) en utilisant un anticorps primaire chèvre anti-iba1 au 500^{ème} puis un anticorps secondaire lapin anti-chèvre conjugué avec HRP (Invitrogen) au 1000^{ème}. En effet iba1 est une protéine spécifique des macrophages et est couramment utilisée en tant que marqueur de l'inflammation (Imai et al., 1996).

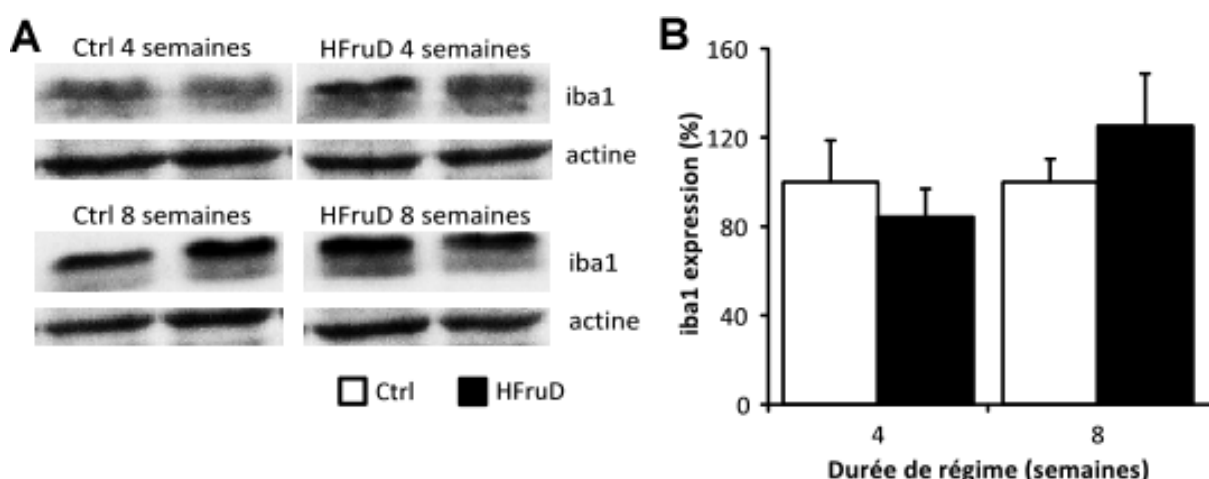


Figure 65 : Expression d'iba1 dans la muqueuse olfactive après 4 et 8 semaines de HFruD. A. Photos représentatives des bandes de protéines obtenues pour iba1 et pour l'actine. B. Quantification de la densité des bandes de protéines marquées. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ sem. Les histogrammes blancs représentent les animaux sous régime Ctrl après 4 (n=9) et 8 (n=9) semaines de régime et les histogrammes noirs les animaux sous HFruD après 4 (n=9) et 8 (n=9) semaines de régime.

Que ce soit après 4 ou 8 semaines de régime, aucune différence d'expression d'iba1 n'a été retrouvée entre les animaux contrôle et HFruD (respectivement $p = 0,57$ et $p = 0,51$) (Figure 65). Il est possible qu'il n'y ait pas d'inflammation dans la muqueuse olfactive même si d'autres marqueurs inflammatoires pourraient être testés. L'implication de l'inflammation dans la muqueuse olfactive chez nos animaux diabétiques sera discutée dans la **partie VI.b** de ce chapitre.

VI. Discussion et conclusions du chapitre

Il apparaît donc qu'un régime diabétogène enrichi en fructose induit des modifications anatomiques et fonctionnelles au niveau de la muqueuse olfactive. Premièrement, après 4 semaines de HFruD, l'amplitude de réponse de la MO après stimulation olfactive est réduite et les cinétiques de réponse sont plus lentes. Ces effets se retrouvent après 8 semaines de HFruD et sont même amplifiés. Ces résultats peuvent être dus à une baisse du nombre d'OSNs et / ou une diminution de l'activité électrique de chaque OSN pris individuellement.

Le nombre d'OSNs dans la MO est plus élevé après 8 semaines de HFruD. Cela est probablement dû à une baisse de l'apoptose dans le tissu alors que le taux de prolifération cellulaire reste inchangé. Il est possible que des neurones vieillissants (qui seraient moins fonctionnels) soient maintenus dans la MO au lieu de rentrer dans le programme apoptotique. En revanche, après 4 semaines de HFruD, aucune modification anatomique n'a été retrouvée.

Au niveau du neurone individuel, l'activité électrique des OSNs en réponse aux odorants est diminuée après 8 semaines de HFruD. De plus, les éléments de la cascade de transduction sont affectés par le HFruD et l'excitabilité des OSNs est réduite. Cela est cohérent avec l'hypothèse que des neurones vieillissants seraient maintenus dans la MO. Si l'augmentation du nombre d'OSNs semble, à première vue, contradictoire avec les résultats obtenus en EOG, la diminution de l'activité des neurones individuels est suffisante pour expliquer la baisse des signaux EOG. En revanche, il nous est impossible de savoir si ces neurones sont moins fonctionnels parce qu'ils sont vieillissants ou pour une autre raison. Un marquage avec du Brdu pourrait apporter un premier élément de réponse à cette question.

L'expression du récepteur à l'insuline est augmentée dans la MO après 4 et 8 semaines de HFruD. Au niveau des transcrits, seule l'expression du récepteur dans son intégralité et de l'isoforme courte *ir-a* sont augmentées et uniquement après 8 semaines de HFruD. Il semble donc probable que les effets du HFruD dans la MO soient dus à l'hyperinsulinémie constatée chez nos animaux diabétiques après 4 et 8 semaines de HFruD. Quels pourraient être les mécanismes possibles de l'action de l'insuline sur ce tissu ? Quels autres mécanismes pourraient expliquer les effets anatomiques et fonctionnels du HFruD dans la muqueuse olfactive ?

a. Implication de l'insuline ?

L'implication de l'insuline dans les changements constatés dans la muqueuse olfactive chez nos animaux diabétiques est probable étant donnée l'augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline. Si, à première vue, il semble étrange qu'une élévation de la disponibilité en insuline entraîne une augmentation de l'expression du récepteur, il a déjà été prouvé que, après 48h de mise à jeun chez le rat, une augmentation de la quantité d'insuline dans la muqueuse olfactive était retrouvée et était associée à une hausse du nombre de récepteurs à l'insuline à haute affinité (Lacroix et al., 2008). En revanche, une étude ultérieure menée par le même groupe a prouvé que des rats rendus obèses et diabétiques (par l'utilisation d'un régime enrichi en graisses et en sucres) manifestaient une hyperinsulinémie ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur à l'insuline dans la muqueuse olfactive, à la fois au niveau des transcrits et de la protéine (Lacroix et al., 2015). Cependant, le niveau d'insuline de la MO n'était pas mesuré dans ce modèle.

Comment l'insuline présente dans la circulation générale parvient-elle à atteindre la muqueuse olfactive ? En effet la muqueuse olfactive contient à son pôle basal des jonctions

serrées qui rendent impossible le passage de molécules depuis la circulation sanguine vers les tissus de la MO (Hussar et al., 2002). Lacroix et collaborateurs en 2008 ont proposé que l'insuline pourrait être transportée dans le tissu *via* les récepteurs à l'insuline présents dans les cellules endothéliales (Lacroix et al., 2008). En effet, un tel mécanisme a été prouvé au niveau du bulbe olfactif (Banks et al., 1999). Une autre possibilité serait que l'insuline atteigne la lumière de la cavité nasale *via* les glandes de Bowman, dont la base se situe en profondeur dans la sous-muqueuse.

Chez l'humain, il a été mis en évidence que des patients DT2 ont une concentration d'insuline plus élevée dans le mucus nasal que des sujets témoins (Henkin, 2010). De façon surprenante, les auteurs ont prouvé que chez des sujets sains et diabétiques, l'insuline dans le mucus olfactif augmentait lorsque l'insulinémie diminuait après le jeûne, ce qui est cohérent avec ce qui se passe chez le rat (Lacroix et al., 2008). Le lien entre l'insulinémie et la quantité d'insuline et l'expression de son récepteur dans la MO est donc loin d'être clair. Il serait intéressant de pouvoir doser la concentration en insuline de la MO chez nos animaux HFruD. Cela étant dit, quelle que soit la voie d'entrée de l'insuline dans le tissu, quels sont ses effets sur la muqueuse olfactive ?

Effets sur l'apoptose

L'insuline est un puissant facteur anti-apoptotique dans la muqueuse olfactive *in vitro* et *in vivo* (Lacroix et al., 2011). *In vivo*, l'apoptose induite par bulbectomie chez le rat est réduite lorsque les animaux reçoivent des instillations intranasales d'insuline entre 2 jours avant et 1 jour après la chirurgie. De façon intéressante, cet effet anti-apoptotique *in vivo* a principalement lieu au niveau de la couche des neurones olfactifs matures. *In vitro*, l'apoptose est induite sur des cultures de cellules de la MO par déplétion du sérum et traitement à l'étoposide. Là aussi, l'insuline a un effet anti-apoptotique. L'insuline agit sur la voie intrinsèque en diminuant la phosphorylation (et donc l'activation) du facteur de transcription p53. L'inhibition de ce facteur de transcription lève l'inhibition de la synthèse de BCL2, une protéine mitochondriale ayant un effet inhibiteur sur l'apoptose et inhibe l'activation de la transcription de gènes pro-apoptotiques (Mayo and Donner, 2001).

Nos résultats sont cohérents avec cette étude. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les effets anti-apoptotiques de l'insuline sont généralement médiés par l'isoforme courte du récepteur IR-a (Denley et al., 2003), ce qui est également cohérent avec le fait que l'expression du transcrit du gène codant pour IR-a est augmentée chez nos animaux HFruD après 8 semaines de régime mais pas après 4 semaines. De même la baisse de l'apoptose chez nos animaux n'a lieu qu'après 8 semaines de HFruD.

L'effet anti-apoptotique de l'insuline pourrait être médié par plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La PI3K, exprimée dans les OSNs (Ukhanov et al., 2010), peut activer Akt, qui va soit inhiber Bad, ce qui va inhiber MMP (Brunet et al., 2001; Duronio, 2008), soit activer la translocation de Mdm2 dans le noyau, ce qui va inhiber p53 et donc inhiber l'apoptose (en

empêchant la transcription de nombreux facteurs pro-apoptotiques et en levant l'inhibition de la transcription de facteurs anti-apoptotiques tel BCL2) (Mayo and Donner, 2001). Une activation de BCL2 par la voie MAP Kinase est également possible (Deng et al., 2001), ce qui entraînerait une inhibition de MMP et de l'apoptose (Figure 66).

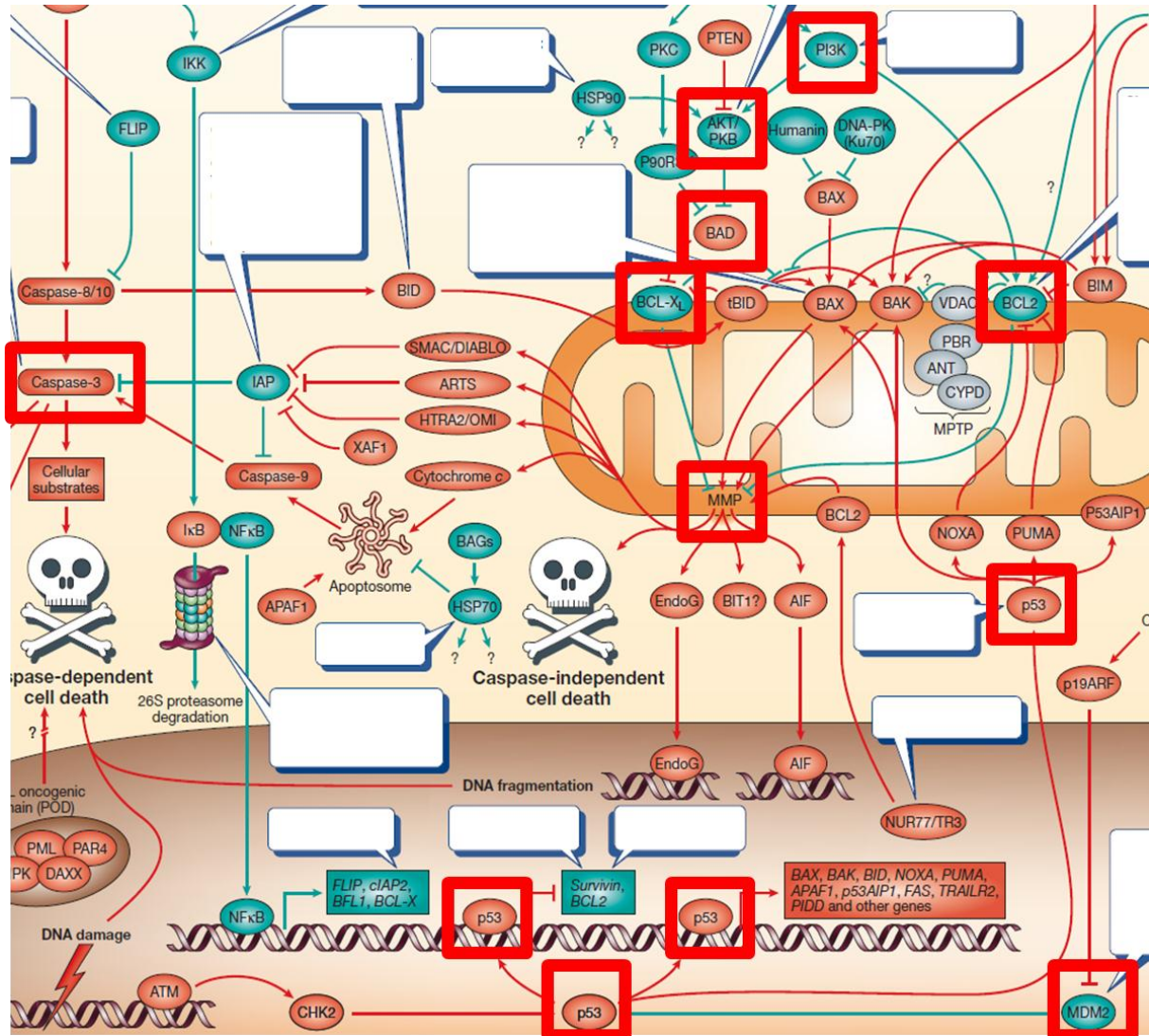


Figure 66 : Schéma présentant les possibles voies de signalisation anti-apoptotique pouvant être activées par l'insuline. Les flèches rouges représentent les voies pro-apoptotiques et les flèches vertes les voies anti-apoptotiques. Les protéines encadrées en rouge sont celles pouvant être impliquées dans l'effet anti-apoptotique de l'insuline. Modifié d'après (Reed and Huang, 2004).

Effets fonctionnels

Les animaux sous HFruD présentent une diminution de l'amplitude des réponses aux odorants (octanol et acétophénone) en EOG. Les cinétiques de ces réponses sont également plus lentes. Or il a été prouvé que l'amplitude de réponses en EOG après stimulation avec deux autres odorants (acétate d'isoamyl et citral) était réduite après application d'insuline sur la MO (Lacroix et al., 2008). Une fois de plus cela est cohérent avec nos résultats. En

revanche, dans cette étude, les cinétiques de réponses EOG n'étaient pas modifiées par l'application d'insuline alors qu'elles sont plus lentes dans nos conditions.

Il est possible que les deux études ne soient pas comparables car les cinétiques étudiées ne sont pas exactement les mêmes. Ici, nous nous sommes intéressés aux *temps* d'attaque et de repolarisation alors que Lacroix et collaborateurs étudiaient les *pent*es d'attaque et de repolarisation. Dans nos conditions, les pentes de repolarisation rapide et lente ne sont pas non plus modifiées par le HFruD (résultats non montrés).

Une autre étude a fait état d'une diminution de l'amplitude des signaux EOG en réponse à une stimulation avec de l'acétate d'isoamyl après application d'insuline (Savigner et al., 2009). Les cinétiques de réponse n'étaient pas étudiées dans ces travaux. Nos résultats sont donc cohérents avec l'effet attendu d'une application d'insuline sur la MO. Cependant, ces études utilisent un protocole d'application d'insuline en aigu. Il est possible que l'application d'insuline en aigu n'ait pas le même effet qu'une insuline plus élevée de façon chronique.

Dans nos conditions, il est probable que les effets fonctionnels au niveau de la muqueuse olfactive soient dus à une diminution de l'activité électrique des OSNs individuels, puisque cette dernière est diminuée après 8 semaines de HFruD chez nos animaux. A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux réponses des OSNs après application d'insuline (Savigner et al., 2009). Il en résulte qu'après application d'insuline, la fréquence de décharge spontanée des OSNs est augmentée (pas de changements dans nos conditions). De plus l'excitabilité des OSNs est augmentée. En effet le temps de latence avant l'apparition du premier potentiel d'action est diminué ainsi que la valeur de l'intervalle inter-potentiels d'action. Au contraire, nous avons mis en évidence chez nos animaux HFruD une diminution de l'excitabilité des OSNs.

Concernant la réponse aux odorants, Savigner et collaborateurs ont mis en évidence une diminution de l'amplitude de la réponse des OSNs à l'acétate d'isoamyl. Ce résultat est cohérent avec la baisse de l'amplitude de réponse des neurones MOR23 au lyral chez nos animaux HFruD. Une fois de plus, les différences observées entre cette étude et la nôtre peuvent s'expliquer par le fait que les effets d'une application directe d'insuline peuvent être différents des effets d'une exposition continue à l'insuline. Il est probable que cette dernière puisse induire à terme une insulino-résistance du tissu. Les mécanismes cellulaires seraient alors dissemblables d'une étude à l'autre. Par conséquent, il serait intéressant de tester l'insulino-résistance du tissu en réalisant des expériences d'EOG avec application directe d'une concentration physiologique d'insuline sur des MO d'animaux après 8 semaines de HFruD.

Possibles mécanismes ?

Que les effets fonctionnels soient dus à une action directe de l'insuline ou à une insulino-résistance du tissu, quels mécanismes cellulaires pourraient être impliqués ? L'insuline peut

agir sur la régulation génique par l'intermédiaire de la voie MAP Kinase (Kim and Feldman, 2012) ou par l'intermédiaire de la voie PI3K / Akt (Khanh et al., 2014). Une activité plus ou moins importante de ces voies pourrait donc avoir une influence sur la synthèse de plusieurs effecteurs de la voie de transduction olfactive. Il serait alors intéressant d'étudier l'expression de ces derniers par RTqPCR sur cellule unique.

La mise en place d'une insulino-résistance du tissu pourrait entraîner des régulations différentes de l'activité des OSNs. Il a été prouvé, *in vitro*, que pendant l'hyperinsulinémie durant la mise en place de l'insulino-résistance, l'activité de la voie Akt était diminuée dans une culture de cellules neuronales périphériques (neurones du DRG) (Kim et al., 2011). En plus d'agir sur la régulation génique, d'autres mécanismes pourraient ainsi expliquer nos résultats en patch-clamp.

Dans les tissus périphériques, l'insuline est connue pour induire la translocation du transporteur au glucose GLUT4 à la membrane de la cellule *via* l'activation de la voie Akt (Kim and Feldman, 2012). De même, il a été prouvé que la translocation de GLUT4 par l'insuline était médiée par la voie PI3K / Akt dans les neurones de l'hippocampe (Grillo et al., 2009). De plus, l'expression de GLUT4 a été montrée au sein de la muqueuse olfactive (Lacroix et al., 2015) et elle est augmentée chez des rats obèses et hyperinsulinémiques. Cependant, le rôle exact de GLUT4 dans le système nerveux restant encore à élucider (Ren et al., 2014, 2015), il est difficile d'émettre une hypothèse sur le rôle de cette protéine dans la MO.

Une autre hypothèse probable serait une modification de l'activité mitochondriale. En effet, l'insuline est connue pour i) agir sur la régulation des gènes mitochondriaux *via* la voie Akt, ii) jouer un rôle dans la synthèse des protéines mitochondriales et iii) stimuler la production d'ATP (Cheng et al., 2010). Tout d'abord une baisse de la production d'ATP par les neurones pourrait entraîner une diminution de la réponse des OSNs aux odorants car l'AMPc (essentiel pour la transduction olfactive) est produit à partir de l'ATP par l'ACIII (Lowe et al., 1989).

Une autre étude a prouvé que le calcium mitochondrial est essentiel dans les dynamiques de réponses des OSNs et régule la décharge des potentiels d'action (Fluegge et al., 2012). En effet un canal perméable au Ca^{2+} au sein des mitochondries assure la libération et la clairance rapide du Ca^{2+} intracellulaire au niveau des boutons dendritiques. De plus, après une stimulation odorante, les mitochondries se concentrent au niveau du bouton dendritique où leur activité semble essentielle dans les réponses des OSNs à une stimulation odorante. Une baisse de la synthèse du canal Ca^{2+} ou des protéines responsables de la mobilité mitochondriale pourrait donc être impliquée dans les changements fonctionnels constatés chez nos animaux HFruD. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité et la mobilité des mitochondries chez nos animaux HFruD (activité de l'ATPase, Mito Tracker).

Si certains de ces mécanismes s'appliquent uniquement aux neurones, l'insuline (ou l'insulino-résistance) pourrait aussi agir sur d'autres types cellulaires dans la MO, telles que

les cellules de soutien qui expriment également le récepteur à l'insuline (Lacroix et al., 2008). Ces dernières étant connues pour moduler la sensibilité aux odeurs (Hegg et al., 2003), il n'est pas impossible qu'elles soient impliquées dans les mécanismes sous-tendant nos résultats expérimentaux.

En résumé, l'insuline (ou la résistance à l'insuline) pourrait agir de nombreuses façons sur la muqueuse olfactive dans nos conditions expérimentales afin d'expliquer les effets anatomiques et fonctionnels du HFruD chez nos animaux (Figure 67).

b. Autre mécanismes

Si les actions connues de l'insuline sur la muqueuse olfactive sont cohérentes avec nos résultats, d'autres mécanismes pourraient également expliquer ces derniers, parmi lesquels une action directe du glucose, une action endocrine médiée par une autre hormone ou neuropeptide ou encore un processus inflammatoire.

Effets de l'hyperglycémie

Plusieurs transporteurs au glucose sont présents au sein de la MO : GLUT1 au niveau des OSNs, des cellules de soutien et des glandes de Bowman, GLUT3 au niveau des cellules de soutien et des glandes de Bowman (Nunez-Parra et al., 2011) et GLUT4, bien que l'on ignore dans quel type cellulaire il est exprimé (Lacroix et al., 2015). Pour l'heure, il n'a pas été prouvé que les OSNs soient capables de moduler leur activité électrique en réponse au glucose comme c'est le cas dans le bulbe olfactif (Tucker et al., 2010; Al Koborssy et al., 2014).

Cependant, l'hyperglycémie dans le système nerveux périphérique est connue pour avoir des effets délétères. Tout d'abord, lorsqu'on parle d'hyperglycémie et de neurones, les neuropathies diabétiques viennent tout de suite à l'esprit (Sajic, 2014; Sandireddy et al., 2014). Cependant ces pathologies apparaissent tardivement dans le DT2 et touchent d'abord les neurones émettant les axones les plus longs (Forbes and Cooper, 2013). Une fois de plus, nous nous situons dans une phase précoce du DT2 et les axones des OSNs sont loin de faire partie des plus longs axones du système nerveux. Il est aussi à noter qu'une étude chez le rat a mis en évidence l'absence de développement de neuropathie diabétique après 16 semaines de HFruD (Patel et al., 2009). Il est donc peu probable que la mise en place d'une neuropathie diabétique dans la MO puisse expliquer nos résultats.

Cependant, même sans neuropathie diabétique, l'hyperglycémie dans le système nerveux périphérique est connue pour être un facteur pro-apoptotique (Russell et al., 1999; Schmeichel et al., 2003; Leininger et al., 2006). Cela semble en contradiction avec la diminution de l'apoptose constatée après 8 semaines de HFruD chez nos animaux. Il est possible que d'autres facteurs anti-apoptotiques contrebalancent cet effet de l'hyperglycémie (comme l'insuline par exemple).

L'hyperglycémie est aussi connue pour diminuer la conduction nerveuse ainsi que la régénération axonale (Tomlinson and Gardiner, 2008). Cependant, ces effets sont limités aux axones et ne peuvent expliquer la diminution de la capacité de transduction des OSNs constatée en patch-clamp sur nos souris diabétiques.

En revanche, l'hyperglycémie induit des dysfonctionnements mitochondriaux dans les neurones, entraînant une perturbation de la production d'ATP ainsi que de l'homéostasie du Ca^{2+} dans la mitochondrie (Verkhatsky and Fernyhough, 2008), ces deux processus pouvant

avoir un impact sur la transduction olfactive. L'hyperglycémie est aussi connue pour augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (Nishikawa et al., 2000), lesquelles peuvent avoir de nombreux effets délétères sur la cellule et agir sur la signalisation cellulaire (Nemoto et al., 2000; Le Bras et al., 2005; Rochette et al., 2014).

Autres hormones ou peptides impliqués dans le métabolisme

Mise à part l'insuline, d'autres facteurs métaboliques sont connus pour avoir une influence sur la muqueuse olfactive (Palouzier-Paulignan; Lacroix et al., 2012). La leptine, à l'instar de l'insuline, augmente l'activité spontanée et l'excitabilité des OSNs mais diminue leur réponse à une stimulation olfactive (Savigner et al., 2009). Cependant, l'absence de changement de la léptinémie chez nos animaux HFruD fait qu'un rôle direct de cette hormone semble peu probable ici.

Le NPY joue un rôle protecteur dans la muqueuse olfactive. En effet, des souris KO pour le récepteur au NPY, Y1, présentent une diminution du nombre total d'OSNs (Doyle et al., 2008). De plus, le NPY joue un rôle anti-apoptotique dans la muqueuse olfactive (Montani et al., 2006). Si ces effets sont cohérents avec les changements anatomiques constatés chez nos animaux diabétiques, le NPY est aussi connu pour augmenter l'amplitude de réponse en EOG (Negroni et al., 2012), ce qui semble contradictoire avec nos résultats. Bien sûr, il est parfaitement possible que les changements anatomiques et fonctionnels produits par le HFruD soient le résultat de l'action de plusieurs facteurs différents.

Rôle de l'inflammation

Un rôle de l'inflammation dans la muqueuse olfactive est possible car les processus inflammatoires sont fortement liés au développement du DT2 (Hameed et al., 2015) et l'inflammation au niveau cérébral est augmentée dans le DT2 et induit des effets délétères sur le système nerveux central (Cai, 2013; Purkayastha and Cai, 2013).

Dans notre modèle, aucune élévation du marqueur de macrophages iba1 n'est retrouvée chez les animaux HFruD. Dans une étude récente, Thiebaud et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'iba1 dans la muqueuse olfactive de souris nourries avec un western diet (Thiebaud et al., 2014). Une fois encore, ces souris présentent un phénotype obèse mais ne sont ni hyperglycémiques ni intolérantes au glucose. Il est donc probable que la hausse de l'expression d'iba1 chez ces animaux soit reliée à l'obésité.

Dans une autre étude récente, des rats nourris avec un western diet et présentant un phénotype de syndrome métabolique (obésité, hyperglycémie et hyperinsulinémie à jeun) ne montrent pas de changement d'expression de marqueurs d'inflammation (TNF α , IL-6 et CD11c) (Lacroix et al., 2015). Le lien entre les maladies métaboliques et une possible inflammation au niveau de la muqueuse olfactive est donc encore loin d'être établi.

En conclusion de ce chapitre, des souris nourries pendant 8 semaines avec un régime enrichi en fructose présentent des altérations anatomiques et fonctionnelles de la muqueuse olfactive. Si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés, un rôle de l'insuline (ou de la résistance à l'insuline) est fortement suspecté, bien qu'on ne puisse exclure d'autres mécanismes plausibles (en particulier un rôle de l'hyperglycémie).

Conclusions et perspectives

En résumé, un régime enrichi en fructose induit un phénotype diabétique chez la souris ainsi que des déficits olfactifs causés, en partie, par des perturbations anatomiques et fonctionnelles dans la muqueuse olfactive.

De façon un peu plus détaillée, 8 semaines de HFruD entraînent un diabète précoce, caractérisé par une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun ainsi qu'une intolérance au glucose. Au niveau comportemental, les souris HFruD font preuve d'une diminution de leurs capacités olfactives globales pour une odeur de nourriture ainsi que d'une altération de leurs capacités de discrimination olfactive. Au sein de la muqueuse olfactive, ces souris présentent une hausse du nombre de neurones sensoriels olfactifs et une baisse de l'apoptose ainsi qu'une diminution de l'activité électrique du tissu et des neurones en eux-mêmes. L'augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline laisse penser à une action possible de l'insuline ou à une mise en place d'une insulino-résistance de la MO.

Premièrement, la baisse de la capacité de réponse aux odorants des OSNs et de la MO est cohérente avec les résultats de la partie comportementale. En effet, des difficultés au niveau de la chémoréception pourraient expliquer à elles seules la diminution de l'acuité des animaux dans la tâche du buried food. En revanche, il est plus difficile d'établir un lien direct entre les perturbations de l'activité de la MO et l'altération des capacités discriminatives des souris. Il est plus que probable que les troubles olfactifs constatés chez les souris HFruD soient dus à une modulation centrale.

A l'issue de ce travail de thèse, l'hypothèse la plus probable afin d'expliquer les mécanismes sous-jacents des perturbations anatomiques et fonctionnelles de la MO est une action de l'insuline ou la mise en place d'une résistance à l'insuline. Une action de l'hyperglycémie, si elle n'est pas cohérente avec l'intégralité des résultats, serait également une piste intéressante à étudier. Pourquoi ces deux modalités en particulier ?

Tout d'abord, les souris HFruD présentent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun. Le glucose et l'insuline pourraient donc atteindre le système olfactif et y jouer un rôle crucial. Dans le chapitre précédent, j'ai explicité les potentiels effets que ces deux molécules pourraient avoir sur la muqueuse olfactive mais une action au niveau du bulbe est encore plus probable.

Le bulbe olfactif est l'endroit du cerveau contenant le plus d'insuline (Baskin et al., 1983) et de récepteurs à l'insuline (Hill et al., 1986). De plus, il a été prouvé que l'activité du BO était modifiée en réponse à l'insuline (Tucker et al., 2010; Fadool et al., 2011). De même, les neurones du BO peuvent moduler leur activité en réponse au glucose (Tucker et al., 2010; Al Koborssy et al., 2014). Il est donc plus que probable que, dans nos conditions, des changements anatomiques et / ou fonctionnels surviennent dans le bulbe olfactif et participent à la baisse des capacités olfactives de nos souris HFruD. L'étude de l'effet du HFruD au niveau du BO est donc l'une des perspectives les plus prometteuses à envisager pour la suite de ces travaux.

Au niveau comportemental, l'insuline est également connue pour diminuer l'acuité olfactive des rats, aussi bien pour une odeur neutre que pour une odeur de nourriture (Aimé et al., 2012). Une autre étude, au contraire, a fait état d'une amélioration des capacités discriminatives de souris ayant reçu une administration intranasale d'insuline (Marks et al., 2009). Cependant, dans cette étude les souris exploraient plus un nouvel objet dans un test de reconnaissance d'objet, ce qui laisse supposer un effet de l'instillation intranasale d'insuline sur les capacités mnésiques des animaux et rend difficile de conclure sur les tests basés sur l'olfaction. Il est, de toute façon, connu que l'administration intranasale d'insuline augmente la mémoire de travail aussi bien chez l'animal que chez l'être humain (Benedict et al., 2011).

Un autre point intéressant de cette étude est le fait que le DT2 en lui-même soit suffisant pour induire des modifications anatomiques, fonctionnelles et comportementales dans le système olfactif. Comme je l'ai discuté dans le chapitre 2, cela semble en contradiction avec les études chez l'être humain qui pointent plutôt du doigt le rôle de pathologies secondaires au DT2 dans le développement des altérations de l'olfaction chez les patients (Naka et al., 2010; Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014). Cependant, il est parfaitement possible que la baisse de l'acuité olfactive dans notre étude et dans les études citées précédemment ne soit pas due aux mêmes mécanismes. L'absence de données sur des patients en début de pathologie (ce qui est plutôt logique car ils ne sont pas encore diagnostiqués) rend difficile la comparaison avec ce qui se passe chez l'être humain. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude sur la MO (et sur le BO) en utilisant une durée de régime beaucoup plus longue (et donc d'avoir des souris ayant développé des pathologies secondaires au DT2).

Quel peut-être l'effet de l'altération de l'olfaction chez des animaux (ou des individus) en début de DT2 ? Il est possible que cette baisse des capacités olfactives participe à l'aggravation du phénotype diabétique. En effet, nous avons vu dans le chapitre 2 de l'introduction que l'olfaction joue un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire. L'olfaction peut moduler la quantité de nourriture ingérée (Miro et al., 1980, 1982; Ségué et Perret, 2005) mais également le plaisir ressenti en mangeant (Rolls et al., 1984; Sørensen et al., 2003) ou, de façon générale, la façon de s'alimenter (Meguid et al., 1993, 1997).

Dans nos conditions, la prise alimentaire des animaux HFruD n'est modifiée que durant les deux premières semaines de régime puis n'est plus différente de celle des animaux contrôle. Cependant, il est possible que la façon de s'alimenter des animaux soit différente. Dans une étude récente, Lacroix et collaborateurs ont fait état que des rats ayant reçu un régime enrichi en graisses et en sucre pendant 6 ou 12 semaines présentaient un comportement alimentaire perturbé, le pourcentage de nourriture ingérée par ces animaux durant la période diurne augmentant d'environ 20% (Lacroix et al., 2015). Ces animaux présentaient aussi une baisse de leurs capacités olfactives. Cependant, cette dernière n'étant testée, au plus tôt, qu'après 11 semaines de régime, il est difficile de savoir si la modification du

comportement alimentaire constatée chez ces animaux est due au régime en lui-même, à ses effets physiologiques ou à l'altération des capacités olfactives des animaux.

En conclusion, 8 semaines de régime enrichi en fructose induisent un DT2 précoce chez la souris ainsi que des déficits olfactifs causés, en partie, par des changements anatomiques et fonctionnels au sein de la muqueuse olfactive. Cette altération des capacités olfactives des animaux pourrait aggraver le phénotype diabétique en participant à la dérégulation du comportement alimentaire.

Références bibliographiques

A

- Abraham NM, Spors H, Carleton A, Margrie TW, Kuner T, Schaefer AT.** Maintaining accuracy at the expense of speed: Stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44: 865–876, 2004.
- Ahokas AJ, Goetzl FR.** The influence of distention of the stomach upon olfactory acuity and sensations associated with food intake. *Perm Found Med Bull* 9: 105–113, 1951.
- Aimé P, Duchamp-Viret P, Chaput M a, Savigner a, Mahfouz M, Julliard a K.** Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav Brain Res* 179: 258–64, 2007.
- Aimé P, Hegoburu C, Jaillard T, Degletagne C, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Lorsignol A, Duchamp C, Mouly A-M, Julliard AK.** A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats. *PLoS One* 7: e51227, 2012.
- Aimé P, Palouzier-Paulignan B, Salem R, Al Koborssy D, Garcia S, Duchamp C, Romestaing C, Julliard a. K.** Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front Behav Neurosci* 8: 326, 2014.
- Al Koborssy D, Palouzier-Paulignan B, Salem R, Thevenet M, Romestaing C, Julliard a. K.** Cellular and molecular cues of glucose sensing in the rat olfactory bulb. *Front Neurosci* 8: 333, 2014.
- Albrecht J, Schreder T, Kleemann a M, Schöpf V, Kopietz R, Anzinger a, Demmel M, Linn J, Kettenmann B, Wiesmann M.** Olfactory detection thresholds and pleasantness of a food-related and a non-food odour in hunger and satiety. *Rhinology* 47: 160–5, 2009.
- Anderzhanova E, Covasa M, Hajnal A.** Altered basal and stimulated accumbens dopamine release in obese OLETF rats as a function of age and diabetic status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R603–11, 2007.
- Angulo P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346: 1221–31, 2002.
- Aoudé I.** Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement : étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale. Université de Bourgogne 2012.
- Apelbaum a F, Chaput M a.** Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 28: 389–95, 2003.
- Aschenbrenner K, Scholze N, Joraschky P, Hummel T.** Gustatory and olfactory sensitivity in patients with anorexia and bulimia in the course of treatment. *J Psychiatr Res* 43: 129–37, 2008.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche a C, Karnup S V, Hayar a, Szabo G, Shipley MT.** Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426: 623–629, 2003.

B

- Badonnel K, Lacroix M-C, Monnerie R, Durieux D, Caillol M, Baly C.** Chronic restricted access to food leading to undernutrition affects rat neuroendocrine status and olfactory-driven behaviors. *Horm Behav* 62: 120–7, 2012.
- Baier PC, Weinhold SL, Huth V, Gottwald B, Ferstl R, Hinze-Selch D.** Olfactory dysfunction in patients with narcolepsy with cataplexy is restored by intranasal Orexin A (Hypocretin-1). *Brain* 131: 2734–41, 2008.
- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix M-C, Durieux D, Schlegel C, Salesse R, Caillol M.** Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 1129: 130–41, 2007.
- Banks W a., Kastin AJ, Pan W.** Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* 20: 373–378, 1999.
- Bantle JP.** Clinical aspects of sucrose and fructose metabolism. *Diabetes Care* 12: 56–61; discussion 81–2, 1989.
- Barone FC, Wayner MJ, Scharoun SL, Guevara-Aguilar R, Aguilar-Baturoni HU.** Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res Bull* 7: 75–88, 1981.
- Baskin DG, Porte D, Guest K, Dorsa DM.** Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* 112: 898–903, 1983.
- Baskin DG, Stein LJ, Ikeda H, Woods SC, Figlewicz DP, Porte D, Greenwood MR, Dorsa DM.** Genetically obese Zucker rats have abnormally low brain insulin content. *Life Sci* 36: 627–633, 1985.

Bauer S, Rasika S, Han J, Mauduit C, Raccurt M, Morel G, Jourdan F, Benahmed M, Moyse E, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci* 23: 1792–803, 2003.

Bayard S, Plazzi G, Poli F, Serra L, Ferri R, Dauvilliers Y. Olfactory dysfunction in narcolepsy with cataplexy. *Sleep Med* 11: 876–81, 2010.

Beck B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1159–85, 2006.

Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414: 788–91, 2001.

Belluscio L, Gold GH, Nemes a, Axel R. Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20: 69–81, 1998.

Bender AE, Thadani P V. Some metabolic effects of dietary sucrose. *Nutr Metab* 12: 22–39, 1970.

Benedict C, Frey WH, Schiöth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol* 46: 112–115, 2011.

Berg HW, Pangborn RM, Roessler EB, Webb AD. Influence of hunger on olfactory acuity. *Nature* 197: 108, 1963.

Bernard C, Della Zuana O, Ktorza A. [Interaction between environment and genetic background in type 2 diabetes: lessons from animal models]. *Med Sci (Paris)* 29: 791–9, 2013.

Bhosale SH, Rao MB, Deshpande V V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 60: 280–300, 1996.

Billig GM, Pál B, Fidzinski P, Jentsch TJ. Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nat Neurosci* 14: 763–769, 2011.

Björkman O, Felig P. Role of the kidney in the metabolism of fructose in 60-hour fasted humans. *Diabetes* 31: 516–20, 1982.

Black MM, Slaughter T, Moshia S, Obrocka M, Fischer I. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 16: 3601–3619, 1996.

Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr* 111: 307–14, 1981.

Boden G, Chen X, Polansky M. Disruption of circadian insulin secretion is associated with reduced glucose uptake in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 2182–8, 1999.

Bodyak N, Slotnick B. Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory. *Chem Senses* 24: 637–645, 1999.

Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J* 9: 2453–8, 1990.

Boekhoff I, Touhara K, Danner S, Inglese J, Lohse MJ, Breer H, Lefkowitz RJ. Phosducin, potential role in modulation of olfactory signaling. *J Biol Chem* 272: 4606–12, 1997.

Bolli GB, De Feo P, De Cosmo S, Perriello G, Ventura MM, Calcinaro F, Lolli C, Campbell P, Brunetti P, Gerich JE. Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes* 33: 1150–3, 1984.

Bonino M, Cantino D, Sassoè-Pognetto M. Cellular and subcellular localization of gamma-aminobutyric acidB receptors in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 274: 195–8, 1999.

Borowsky B, Adham N, Jones K a, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhani PP, Bonini J a, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek T a, Gerald C. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8966–71, 2001.

Brady S, Lalli P, Midha N, Chan A, Garven A, Chan C, Toth C. Presence of neuropathic pain may explain poor performances on olfactory testing in diabetes mellitus patients. *Chem Senses* 38: 497–507, 2013.

Brämerson A, Johansson L, Ek L, Nordin S, Bende M. Prevalence of olfactory dysfunction: the skövde population-based study. *Laryngoscope* 114: 733–7, 2004.

Brauchi S, Cea C, Farias JG, Bacigalupo J, Reyes JG. Apoptosis induced by prolonged exposure to odorants in cultured cells from rat olfactory epithelium. *Brain Res* 1103: 114–122, 2006.

Bray G a, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79: 537–43, 2004.

Bray G a. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S127–31, 2008.

Bressel OC, Khan M, Mombaerts P. Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 00: n/a–n/a, 2015.

Breunig E, Manzini I, Piscitelli F, Gutermann B, Di Marzo V, Schild D, Czesnik D. The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol controls odor sensitivity in larvae of *Xenopus laevis*. *J Neurosci* 30: 8965–73, 2010.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402: 460–74, 1998.

Broillet MC, Firestein S. Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Ann N Y Acad Sci* 868: 730–40, 1999.

Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J* 85: 614–21, 2009.

Bruckdorfer KR, Khan IH, Yudkin J. Fatty acid synthetase activity in the liver and adipose tissue of rats fed with various carbohydrates. *Biochem J* 129: 439–46, 1972.

Bruckdorfer KR, Yudkin J. A comparison of dietary starch and dietary sucrose in the pig. *Nutr Metab* 19: 225–32, 1975.

Brunet a., Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 297–305, 2001.

Brunet LJ, Gold GH, Ngai J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17: 681–93, 1996.

Brunjes PC, Frazier LL. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res* 396: 1–45, 1986.

Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175–187, 1991.

Buck LB. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19: 517–44, 1996.

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E834–42, 2002.

Burchell B. Turning on and turning off the sense of smell. *Nature* 350: 16–7, 1991.

Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller a. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343: 1370–2, 2014.

Buskova J, Klaschka J, Sonka K, Nevsimalova S. Olfactory dysfunction in narcolepsy with and without cataplexy. *Sleep Med* 11: 558–61, 2010.

Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigné C, Mazur A, Rayssiguier Y. Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr* 133: 1903–8, 2003.

C

Cadiou H, Aoudé I, Tazir B, Molinas A, Fenech C, Meunier N, Grosmaître X. Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *J Neurosci* 34: 4857–70, 2014.

Cai D. Neuroinflammation in Overnutrition-Induced Diseases. *Vitam Horm* 91: 195–218, 2013.

Caillol M, Aïoun J, Baly C, Persuy M-A, Salesse R. Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 960: 48–61, 2003.

Cain DP. Effects of insulin injection on responses of olfactory bulb and amygdala single units to odors. *Brain Res* 99: 69–83, 1975.

Calof a L, Chikaraishi DM. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 3: 115–27, 1989.

Calof a L. Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 5: 19–27, 1995.

Calof AL, Hagiwara N, Holcomb JD, Mumm JS, Shou J. Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J Neurobiol* 30: 67–81, 1996.

Carlson LA, Böttiger LE. Ischaemic heart-disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. Stockholm prospective study. *Lancet* 1: 865–8, 1972.

Carr VM, Farbman AI. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* 124: 308–314, 1993.

Carroll KF, Nestel PJ. Diurnal variation in glucose tolerance and in insulin secretion in man. *Diabetes* 22: 333–48, 1973.

Carter L a, MacDonald JL, Roskams a J. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24: 5670–83, 2004.

Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest* 106: 329–33, 2000.

Cefalu WT. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR J* 47: 186–98, 2006.

Cerasi E, Luft R. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 55: 278–304, 1967.

Challis RC, Tian H, Wang J, He J, Jiang J, Chen X, Yin W, Connelly T, Ma L, Yu CR, Pluznick JL, Storm DR, Huang L, Zhao K, Ma M. An Olfactory Cilia Pattern in the Mammalian Nose Ensures High Sensitivity to Odors. *Curr. Biol.* (2015). doi: 10.1016/j.cub.2015.07.065.

Chan SMH, Sun R-Q, Zeng X-Y, Choong Z-H, Wang H, Watt MJ, Ye J-M. Activation of PPAR α ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* 62: 2095–105, 2013.

Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N. Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav Neurosci* 121: 1383–1392, 2007.

Chaput M, Holley A. Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chem Senses* 2: 189–201, 1976.

Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23: 245–58, 2009.

Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8: 228–236, 2011.

Chen TY, Yau KW. Direct modulation by Ca(2+)-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* 368: 545–8, 1994.

Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21Elsevier Ltd: 589–598, 2010.

Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78: 823–834, 1994.

Chess DJ, Xu W, Khairallah R, O'Shea KM, Kop WJ, Azimzadeh AM, Stanley WC. The antioxidant tempol attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in mice fed a high-fructose diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2223–30, 2008.

Choo H-J, Kim J-H, Kwon O-B, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon Y-S, Yoon G, Choi K-M, Ko Y-G. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* 49: 784–91, 2006.

Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15: 1159–81, 1985.

Clark JM, Diehl AM. Hepatic steatosis and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2: 210–5, 2002.

Cohen a M, Teitelbaum a, Rosenman E. Diabetes induced by a high fructose diet. *Metabolism* 26: 17–24, 1977.

Cohen AM, Teitelbaum A, Balogh M, Groen JJ. Effect of interchanging bread and sucrose as main source of carbohydrate in a low fat diet on the glucose tolerance curve of healthy volunteer subjects. *Am J Clin Nutr* 19: 59–62, 1966.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1: 1–16, 1997.

Cook GC. Absorption products of D(-) fructose in man. *Clin Sci* 37: 675–87, 1969.

Corpe CP, Boveland FJ, Munoz CM, Hoekstra JH, Simpson I a, Kwon O, Levine M, Burant CF. Cloning and functional characterization of the mouse fructose transporter, GLUT5. *Biochim Biophys Acta* 1576: 191–7, 2002.

Cowan CM, Roskams a. J. Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 58: 204–215, 2002.

Crapo PA, Kolterman OG. The metabolic effects of 2-week fructose feeding in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 39: 525–34, 1984.

Crossley JN, Macdonald I. The influence in male baboons, of a high sucrose diet on the portal and arterial levels of glucose and fructose following a sucrose meal. *Nutr Metab* 12: 171–8, 1970.

Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89: 71–84, 2006.

Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83: 572–84, 1968.

Curry DL. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas* 4: 2–9, 1989.

D

- Dai S, McNeill JH.** Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33: 101–7, 1995.
- Das P, Parsons a. D, Scarborough J, Hoffman J, Wilson J, Thompson RN, Overton JM, Fadool D a.** Electrophysiological and behavioral phenotype of insulin receptor defective mice. *Physiol Behav* 86: 287–296, 2005.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi a, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255–61, 2000.
- Davis SN, Piatti PM, Monti L, Brown MD, Branch W, Hales CN, Alberti KG.** Proinsulin and insulin concentrations following intravenous glucose challenges in normal, obese, and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Metabolism* 42: 30–5, 1993.
- Dawson TM, Arriza JL, Jaworsky DE, Borisy FF, Attramadal H, Lefkowitz RJ, Ronnett G V.** Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 259: 825–9, 1993.
- de Olmos J, Hardy H, Heimer L.** The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol* 181: 213–244, 1978.
- DeFronzo R a, Ferrannini E, Hendler R, Wahren J, Felig P.** Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5173–7, 1978.
- DeHamer MK, Guevara JL, Hannon K, Olwin BB, Calof a L.** Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors. *Neuron* 13: 1083–97, 1994.
- Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJG, Hofman A, Witteman JCM.** High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31: 361–2, 2008.
- DeMaria S, Ngai J.** The cell biology of smell. *J Cell Biol* 191: 443–52, 2010.
- Deng X, Kornblau SM, Ruvoilo PP, May WS.** Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *J Natl Cancer Inst Monogr* 0232: 30–37, 2001.
- Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE.** The Insulin Receptor Isoform Exon 11- (IR-A) in Cancer and Other Diseases: A Review. *Horm. Metab. Res.* 35: 778–785, 2003.
- Desgranges B, Sevelinges Y, Bonnefond M, Lévy F, Ravel N, Ferreira G.** Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *Eur J Neurosci* 29: 1654–1662, 2009.
- Després J-P, Lemieux I.** Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881–7, 2006.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T.** Endocannabinoids Part I: molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 5: 241–65, 2001.
- DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH, Lucan SC.** Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences. *Mayo Clin Proc* 90: 372–81, 2015.
- Doty RL, Kamath V.** The influences of age on olfaction: A review. *Front. Psychol.* 5: 1–20, 2014.
- Doyle KL, Hort YJ, Herzog H, Shine J.** Neuropeptide Y and peptide YY have distinct roles in adult mouse olfactory neurogenesis. *J Neurosci Res* 90: 1126–35, 2012.
- Doyle KL, Karl T, Hort Y, Duffy L, Shine J, Herzog H.** Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium. *J Neurochem* 105: 641–52, 2008.
- Drewnowski A, Bellisle F.** Liquid calories, sugar, and body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 651–661, 2007.
- Dugué GP, Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S.** Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses. *J Neurosci* 25: 6490–6498, 2005.
- Duronio V.** The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415: 333–344, 2008.

E

- Edwards DA, Thompson ML, Burge KG.** Olfactory bulb removal vs peripherally induced anosmia: differential effects on the aggressive behavior of male mice. *Behav Biol* 7: 823–828, 1972.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ.** Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76: 911–22, 2002.
- Elsaesser R, Paysan J.** Morituri te salutant? Olfactory signal transduction and the role of phosphoinositides. *J Neurocytol* 34: 97–116, 2005.
- Ennis M, Hamilton KA, Hayar A.** Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Boston, MA: Springer US, 2007.
- Erlich Y, Rosenthal T.** Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on fructose induced hypertension and hyperinsulinaemia in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 22: S347–9, 1995.
- Exton JH, Park CR.** Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats. *J Biol Chem* 242: 2622–36, 1967.

F

- Fadool D a, Tucker K, Phillips JJ, Simmen J a.** Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83: 2332–2348, 2000.
- Fadool D a, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons a. D, Overton JM, Koni P a., Flavell R a., Kaczmarek LK.** Kv1.3 Channel Gene-Targeted Deletion Produces “Super-Smeller Mice” with Altered Glomeruli, Interacting Scaffolding Proteins, and Biophysics. *Neuron* 41: 389–404, 2004.
- Fadool DA, Tucker K, Pedarzani P.** Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS One* 6: e24921, 2011.
- Failla ML, Babu U, Seidel KE.** Use of immunoresponsiveness to demonstrate that the dietary requirement for copper in young rats is greater with dietary fructose than dietary starch. *J Nutr* 118: 487–96, 1988.
- Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, Morris M.** Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci* 130: 41–50, 2006.
- Farbman AI, Buchholz JA.** Transforming growth factor- α and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro. *J Neurobiol* 30: 267–80, 1996.
- Farbman AI, Margolis FL.** Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74: 205–15, 1980.
- Fedoroff IC, Stoner SA, Andersen AE, Doty RL, Rolls BJ.** Olfactory dysfunction in anorexia and bulimia nervosa. *Int J Eat Disord* 18: 71–7, 1995.
- Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Vassalli A, Mombaerts P.** Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* 117: 833–846, 2004.
- Fergusson G, Ethier M, Guevremont M, Chretien C, Attane C, Joly E, Fioramonti X, Prentki M, Poitout V, Alquier T.** Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab* 3: 848–854, 2014.
- Figlewicz DP, Dorsa DM, Stein LJ, Baskin DG, Paquette T, Greenwood MR, Woods SC, Porte D.** Brain and liver insulin binding is decreased in Zucker rats carrying the “fa” gene. *Endocrinology* 117: 1537–1543, 1985.
- File SE.** Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. In: *Behavioural Brain Research*. 2001, p. 151–157.
- Firestein S, Zufall F, Shepherd GM.** Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J Neurosci* 11: 3565–3572, 1991.
- Firestein S.** How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413: 211–8, 2001.

Fitzsimons TJ, Le Magnen J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 67: 273–283, 1969.

Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4: 257–91, 2003.

Fluegge D, Moeller LM, Cichy A, Gorin M, Weth A, Veitinger S, Cainarca S, Lohmer S, Corazza S, Neuhaus EM, Baumgartner W, Spehr J, Spehr M. Mitochondrial Ca²⁺ mobilization is a key element in olfactory signaling. *Nat. Neurosci.* 15: Nature Publishing Group: 754–762, 2012.

Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137–88, 2013.

Freedland RA, Harper AE. Metabolic adaptations in higher animals. I. Dietary effects on liver glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 228: 743–51, 1957.

Frings S, Seifert R, Godde M, Kaupp UB. Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15: 169–79, 1995.

G

Galipeau DM, Yao L, McNeill JH. Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H562–H567, 2002.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493–501, 1992.

Getchell T V, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML. Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 87: 848–56, 2006.

Giustetto M, Bovolin P, Fasolo A, Bonino M, Cantino D, Sassoè-Pognetto M. Glutamate receptors in the olfactory bulb synaptic circuitry: Heterogeneity and synaptic localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 and AMPA receptor subunit 1. *Neuroscience* 76: 787–798, 1996.

Goetzl FR, Abel MS, Ahokas AJ. Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *J Appl Physiol* 2: 553–562, 1950.

Goetzl FR, Ahokas AJ, Goldschmidt M. Influence of sucrose in various concentrations upon olfactory acuity and sensations associated with food intake. *J Appl Physiol* 4: 30–36, 1951.

Goetzl FR, Stone F. Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology* 9: 444–453, 1947.

Goetzl FR, Stone F. Olfactory acuity and appetite; effects of bitter tonics on olfactory acuity in normal human subjects. *Fed Proc* 7: 120, 1948.

Gokoffski KK, Kawauchi S, Wu H-H, Santos R, Hollenbeck, Piper L.W. Lander AD, L. Calof A. Feedback Regulation of Neurogenesis in the Mammalian Olfactory Epithelium: New Insights from Genetics and Systems Biology. In: *The Neurobiology of Olfaction.*, edited by Menini A. Boca Raton (FL): CRC Press, 2010.

Gold GH. Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annu Rev Physiol* 61: 857–71, 1999.

Goran MI, Ulijaszek SJ, Ventura EE. High fructose corn syrup and diabetes prevalence: a global perspective. *Glob Public Health* 8: 55–64, 2013.

Gorojankina T, Grébert D, Salesse R, Tanfin Z, Caillol M. Study of orexins signal transduction pathways in rat olfactory mucosa and in olfactory sensory neurons-derived cell line Odora: multiple orexin signalling pathways. *Regul Pept* 141: 73–85, 2007.

Gouveri E, Katotomichelakis M, Gouveris H, Danielides V, Maltezos E, Papanas N. Olfactory dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an additional manifestation of microvascular disease? *Angiology* 65: 869–876, 2014.

Grant AM, Christie MR, Ashcroft SJ. Insulin release from human pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 19: 114–7, 1980.

Graziadei PP. Cell dynamics in the olfactory mucosa. *Tissue Cell* 5: 113–31, 1973.

Gregg B, Thiessen DD. A simple method of olfactory discrimination of urines for the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Physiol Behav* 26: 1133–1136, 1981.

Grillo C a., Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res* 1296: 35–45, 2009.

Grosmaître X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M. Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10: 348–354, 2007.

Grosmaître X, Vassalli A, Mombaerts P, Shepherd GM, Ma M. 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: 1970–5, 2006.

Guarino MP, Santos AI, Mota-Carmo M, Costa PF. Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. *In Vivo* 27: 127–32, 2013.

Guevara-Aguilar R, Jimenez-Montufar LL, Garcia-Diaz DE, Wayner MJ, Armstrong DL. Olfactory and visceral projections to the paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20: 799–801, 1988.

Guzmán-Maldonado H, Paredes-López O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 373–403, 1995.

H

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

Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J* 4: 2652–60, 1990.

Hameed I, Masoodi SR, Mir S a, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai B a. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes* 6: 598–612, 2015.

Hansel DE, Eipper B a, Ronnett G V. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* 410: 940–4, 2001.

Harris JA, West AK, Chuah MI. Olfactory ensheathing cells: nitric oxide production and innate immunity. *Glia* 57: 1848–57, 2009.

Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 719–58, 2005.

Hass N, Haub H, Stevens R, Breer H, Schwarzenbacher K. Expression of adiponectin receptor 1 in olfactory mucosa of mice. *Cell Tissue Res* 334: 187–97, 2008.

Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT. Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J Neurosci* 23: 8291–301, 2003.

Hegg CC, Jia C, Chick WS, Restrepo D, Hansen A. Microvillous cells expressing IP3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice. *Eur J Neurosci* 32: 1632–1645, 2010.

Heinz F. The enzymes of carbohydrate degradation. *Prog Biochem Pharmacol* 8: 1–56, 1973.

Henkin RI. Intranasal insulin: From nose to brain. *Nutrition* 26: 624–633, 2010.

Henquin J-C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 Suppl 1: S27–31, 2011.

Henry RR, Crapo P a, Thorburn a W. Current issues in fructose metabolism. *Annu Rev Nutr* 11: 21–39, 1991.

Hers HG, Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J* 206: 1–12, 1982.

Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17: 1127–1138, 1986.

Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest* 118: 1796–805, 2008.

Holley A, Duchamp A, Revial MF, Juge A. Qualitative and quantitative discrimination in the frog olfactory receptors: analysis from electrophysiological data. *Ann N Y Acad Sci* 237: 102–14, 1974.

Hu J, Zhong C, Ding C, Chi Q, Walz A, Mombaerts P, Matsunami H, Luo M. Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317: 953–7, 2007.

Hubert HB, Fabsitz RR, Feinleib M, Brown KS. Olfactory sensitivity in humans: genetic versus environmental control. *Science* 208: 607–9, 1980.

Hussar P, Tserentsoodol N, Koyama H, Yokoo-Sugawara M, Matsuzaki T, Takami S, Takata K. The glucose transporter GLUT1 and the tight junction protein occludin in nasal olfactory mucosa. *Chem Senses* 27: 7–11, 2002.

Hutch CR, Hillard CJ, Jia C, Hegg CC. An endocannabinoid system is present in the mouse olfactory epithelium but does not modulate olfaction. *Neuroscience* 300: 539–53, 2015.

I

- Iatropoulos MJ, Williams GM.** Proliferation markers. *Exp Toxicol Pathol* 48: 175–181, 1996.
- Imai T, Sakano H.** Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* 17: 507–15, 2007.
- Imai T, Sakano H.** Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr Opin Neurobiol* 18: 251–60, 2008.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S.** A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 855–862, 1996.
- Inoue I, Takahashi K, Katayama S, Harada Y, Negishi K, Itabashi A, Ishii J.** Effect of troglitazone (CS-045) and bezafibrate on glucose tolerance, liver glycogen synthase activity, and beta-oxidation in fructose-fed rats. *Metabolism* 44: 1626–30, 1995.
- International Diabetes Federation.** *International Diabetes Federation. 2013. IDF Diabetes Atlas, 6th edn.* Brussels, Belgium : international diabetes federation: 2013.
- Islam MS.** Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s. *J Diabetes Res* 2013: 149452, 2013.

J

- Jackerott M, Møldrup A, Thams P, Galsgaard ED, Knudsen J, Lee YC, Nielsen JH.** STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes* 55: 2705–12, 2006.
- Janowitz HD, Grossman MI.** Gustoolfactory thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *J Appl Physiol* 2: 217–222, 1949.
- Jarriault D, Grosmaître X.** Perforated Patch-clamp Recording of Mouse Olfactory Sensory Neurons in Intact Neuroepithelium: Functional Analysis of Neurons Expressing an Identified Odorant Receptor. *J Vis Exp* , 2015.
- Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T.** The effect of fructose on renal biology and disease. *J Am Soc Nephrol* 21: 2036–9, 2010.
- Jolin T, Montes A.** Daily rhythm of plasma glucose and insulin levels in rats. *Horm Res* 4: 153–6, 1973.
- Jones DT, Reed RR.** Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244: 790–5, 1989.
- Jorgensen MB, Buch NH.** Studies on the sense of smell and taste in diabetics. *Acta Otolaryngol* 53: 539–45, 1961.
- Jourdan F.** [Ultrastructure of the olfactory epithelium of the rat: polymorphism of the receptors]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 280: 443–6, 1975.
- Juilfs DM, Fülle HJ, Zhao a Z, Houslay MD, Garbers DL, Beavo J a.** A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3388–95, 1997.
- Julliard a K, Chaput M a, Apfelbaum a, Aimé P, Mahfouz M, Duchamp-Viret P.** Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav Brain Res* 183: 123–9, 2007.

K

- Kaku K, Fiedorek FT, Province M, Permutt MA.** Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control. *Diabetes* 37: 707–13, 1988.
- Kaneko H, Putzier I, Frings S, Kaupp UB, Gensch T.** Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J Neurosci* 24: 7931–8, 2004.
- Kaneko-Goto T, Sato Y, Katada S, Kinameri E, Yoshihara S, Nishiyori A, Kimura M, Fujita H, Touhara K, Reed RR, Yoshihara Y.** Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling. *J Neurosci* 33: 12987–96, 12996a, 2013.
- Kannel WB, McGee DL.** Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 241: 2035–8, 1979.
- Kawahito S, Kitahata H, Oshita S.** Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol* 15: 4137–42, 2009.
- Kayo T, Fujita H, Nozaki J, E X, Koizumi a.** Identification of two chromosomal loci determining glucose intolerance in a C57BL/6 mouse strain. *Comp Med* 50: 296–302, 2000.
- Kellerer M, Lammers R, Fritsche a, Strack V, Machicao F, Borboni P, Ullrich a, Häring HU.** Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance. *Diabetologia* 44: 1125–32, 2001.
- Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi R a F, Kuller LH, Kalhan SC.** Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E906–16, 2003.
- Kerr DS, Von Dannecker LEC, Davalos M, Michaloski JS, Malnic B.** Ric-8B interacts with G alpha olf and G gamma 13 and co-localizes with G alpha olf, G beta 1 and G gamma 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 38: 341–8, 2008.
- Khanh D V, Choi Y-H, Moh SH, Kinyua AW, Kim KW.** Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. *Front Psychol* 5: 846, 2014.
- Kharroubi AT, Darwish HM.** Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 6: 850–67, 2015.
- Kim B, Feldman EL.** Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 23Elsevier Ltd: 133–141, 2012.
- Kim B, McLean LL, Philip SS, Feldman EL.** Hyperinsulinemia induces insulin resistance in dorsal root ganglion neurons. *Endocrinology* 152: 3638–3647, 2011.
- Kissileff HR.** Food-associated drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 67: 284–300, 1969.
- Kleene SJ, Gesteland RC.** Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. *Brain Res* 229: 536–40, 1981.
- Kleene SJ, Gesteland RC.** Transmembrane currents in frog olfactory cilia. *J Membr Biol* 120: 75–81, 1991.
- Klevay LM.** Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis. *Am J Clin Nutr* 28: 764–74, 1975.
- Koivisto VA.** Fructose as a dietary sweetener in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1: 241–6, 1978.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K.** Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656–60, 1999.
- Kondo K, Suzukawa K, Sakamoto T, Watanabe K, Kanaya K, Ushio M, Yamaguchi T, Nibu KI, Kaga K, Yamasoba T.** Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: Cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *J Comp Neurol* 518: 1962–1975, 2010.
- Kooptiwut S, Zraika S, Thorburn AW, Dunlop ME, Darwiche R, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S.** Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to beta-cell failure. *Endocrinology* 143: 2085–92, 2002.
- Korc M.** Update on diabetes mellitus. *Dis Markers* 20: 161–5, 2004.
- Kramer RH, Siegelbaum SA.** Intracellular Ca²⁺ regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. *Neuron* 9: 897–906, 1992.
- Krause M, Mahan L.** *Food, nutrition and diet therapy*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company: 1984.

L

- La Fleur SE, Kalsbeek a, Wortel J, Buijs RM.** A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11: 643–52, 1999.
- Lacroix M-C, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M.** Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20: 1176–90, 2008.
- Lacroix M-C, Caillol M, Durieux D, Monnerie R, Grebert D, Pellerin L, Repond C, Tolle V, Zizzari P, Baly C.** Long-Lasting Metabolic Imbalance Related to Obesity Alters Olfactory Tissue Homeostasis and Impairs Olfactory-Driven Behaviors. *Chem. Senses* (2015). doi: 10.1093/chemse/bjv039.
- Lacroix M-C, Rodriguez-Enfedaque a, Grébert D, Laziz I, Meunier N, Monnerie R, Persuy M, Riviere S, Caillol M, Renaud F.** Insulin but not leptin protects olfactory mucosa from apoptosis. *J Neuroendocrinol* 23: 627–40, 2011.
- Lam DW, LeRoith D.** The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19: 93–6, 2012.
- Lamar CP.** Comparative oral glucose and fructose tolerance tests in normal subjects and in diabetic patients. *J Fla Med Assoc* 46: 180–6, 1959.
- Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC.** Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med* 301: 1023–7, 1979.
- Langfeld H.** On the psychophysiology of a prolonged fast. *Psychol Monogr Gen Appl* 16: i–62, 1914.
- Le Bras M, Clément M-V, Pervaiz S, Brenner C.** Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 20: 205–219, 2005.
- Le Floch JP, Le Lièvre G, Labroue M, Paul M, Peynegre R, Perlemuter L.** Smell dysfunction and related factors in diabetic patients. *Diabetes Care* 16: 934–7, 1993.
- Le Magnen J.** Increased food intake induced in rats by changes in the satiating sensory input from food (first published in French in 1956). *Appetite* 33: 33–5, 1999.
- Lee C-C, Hsu W-H, Shen S-R, Cheng Y-H, Wu S-C.** Fagopyrum tataricum (buckwheat) improved high-glucose-induced insulin resistance in mouse hepatocytes and diabetes in fructose-rich diet-induced mice. *Exp Diabetes Res* 2012: 375673, 2012.
- Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD.** Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14507–12, 2007.
- Leinders-Zufall T, Greer C a, Shepherd GM, Zufall F.** Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J Neurosci* 18: 5630–9, 1998.
- Leininger GM, Backus C, Sastry AM, Yi YB, Wang CW, Feldman EL.** Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* 23: 11–22, 2006.
- Lesault A, Elchinger B, Desbals B.** Circadian rhythms of food intake, plasma glucose and insulin levels in fed and fasted rabbits. *Horm Metab Res* 23: 515–6, 1991.
- Leung CT, Coulombe P a, Reed RR.** Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10: 720–6, 2007.
- Liberles SD, Buck LB.** A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442: 645–50, 2006.
- Liberles SD.** Trace amine-associated receptors are olfactory receptors in vertebrates. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009, p. 168–172.
- Liberles SD.** Trace amine-associated receptors: ligands, neural circuits, and behaviors. *Curr Opin Neurobiol* 34C: 1–7, 2015.
- Linster C, Hasselmo ME.** Behavioral responses to aliphatic aldehydes can be predicted from known electrophysiological responses of mitral cells in the olfactory bulb. *Physiol Behav* 66: 497–502, 1999.
- Linster C, Johnson B a, Morse A, Yue E, Leon M.** Spontaneous versus reinforced olfactory discriminations. *J Neurosci* 22: 6842–6845, 2002.
- Linster C, Johnson B a, Yue E, Morse A, Xu Z, Hingco EE, Choi Y, Choi M, Messiha A, Leon M.** Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers. *J Neurosci* 21: 9837–9843, 2001.
- Lischka FW, Zviman MM, Teeter JH, Restrepo D.** Characterization of inositol-1,4,5-trisphosphate-gated channels in the plasma membrane of rat olfactory neurons. *Biophys J* 76: 1410–22, 1999.

Litherland GJ, Hajduch E, Gould GW, Hundal HS. Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 261: 23–33, 2004.

Liu M, Chen TY, Ahamed B, Li J, Yau KW. Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science* 266: 1348–54, 1994.

Löbel D, Strotmann J, Jacob M, Breer H. Identification of a third rat odorant-binding protein (OBP3). *Chem Senses* 26: 673–80, 2001.

Loch D, Breer H, Strotmann J. Endocrine Modulation of Olfactory Responsiveness: Effects of the Orexigenic Hormone Ghrelin. *Chem. Senses* (2015). doi: 10.1093/chemse/bjv028.

Loch D, Heidel C, Breer H, Strotmann J. Adiponectin enhances the responsiveness of the olfactory system. *PLoS One* 8: e75716, 2013.

Louis-Sylvestre J. Preabsorptive insulin release and hypoglycemia in rats. *Am J Physiol* 230: 56–60, 1976.

Lowe G, Gold GH. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366: 283–6, 1993.

Lowe G, Nakamura T, Gold GH. Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5641–5645, 1989.

Lu XCM, Slotnick BM. Olfaction in rats with extensive lesions of the olfactory bulbs: Implications for odor coding. *Neuroscience* 84: 849–866, 1998.

Luzi L, DeFronzo RA. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol* 257: E241–6, 1989.

M

Macdonald I, Turner LJ. Serum-fructose levels after sucrose or its constituent monosaccharides. *Lancet* 1: 841–3, 1968.

Mackay-Sim a. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Arch Ital Biol* 148: 47–58, 2010.

Macknin JB, Higuchi M, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Doty RL. Olfactory dysfunction occurs in transgenic mice overexpressing human tau protein. *Brain Res* 1000: 174–178, 2004.

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

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713–23, 1999.

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

Mantych GJ, James DE, Devaskar SU. Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132: 35–40, 1993.

Marks DR, Tucker K, Cavallin M a, Mast TG, Fadool D a. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29: 6734–51, 2009.

Martin B, Maudsley S, White CM, Egan JM. Hormones in the naso-oropharynx: endocrine modulation of taste and smell. *Trends Endocrinol Metab* 20: 163–70, 2009.

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

Martínez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: a slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem* 62: 303–306, 2006.

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

Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 22: 241–251, 2007.

Matthews DR, Naylor BA, Jones RG, Ward GM, Turner RC. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* 32: 617–21, 1983.

Matthews HR, Reisert J. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. *Curr Opin Neurobiol* 13: 469–75, 2003.

Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 58: 754S–765S, 1993.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11598–11603, 2001.

McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490: 13–24, 2004.

McEwen DP, Jenkins PM, Martens JR. Olfactory cilia: our direct neuronal connection to the external world. 1st ed. Elsevier Inc., 2008.

McMurray F, Cox RD. Mouse models and type 2 diabetes: translational opportunities. *Mamm Genome* 22: 390–400, 2011.

Meguid MM, Gleason JR, Yang ZJ. Olfactory bulbectomy in rats modulates feeding pattern but not total food intake. *Physiol Behav* 54: 471–475, 1993.

Meguid MM, Koseki M, Yang ZJ, Gleason JR, Laviano A. Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. *Neuroreport* 8: 1439–1444, 1997.

Mehdizadeh Seraj J, Mehdizadeh Seraj S, Zakeri H, Bidar Z, Hashemi S, Mahdavi Parsa F, Yazdani N. Olfactory dysfunction in Iranian diabetic patients. *Acta Med Iran* 53: 204–6, 2015.

Meisami E, Bhatnagar KP. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 43: 476–499, 1998.

Mellor K, Ritchie RH, Meredith G, Woodman OL, Morris MJ, Delbridge LMD. High-fructose diet elevates myocardial superoxide generation in mice in the absence of cardiac hypertrophy. *Nutrition* 26: 842–8, 2010.

Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LMD. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. *J Mol Cell Cardiol* 50: 1035–43, 2011.

Mellor KM, Wendt IR, Ritchie RH, Delbridge LMD. Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca²⁺ handling and myofilament responsiveness. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H964–72, 2012.

Menco BP, Birrell GB, Fuller CM, Ezeh PI, Keeton DA, Benos DJ. Ultrastructural localization of amiloride-sensitive sodium channels and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in the rat's olfactory epithelial surface. *Chem Senses* 23: 137–49, 1998.

Meyer MR, Angele A, Kremmer E, Kaupp UB, Muller F. A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10595–600, 2000.

Miro JL, Canguilhem B, Schmitt P, Koch A. Hyperphagia and obesity after olfactory bulbectomy performed at different times of the year in the European hamster. *Physiol Behav* 29: 681–685, 1982.

Miro JL, Canguilhem B, Schmitt P. Effects of bulbectomy on hibernation, food intake and body weight in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Physiol Behav* 24: 859–862, 1980.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87: 675–686, 1996.

Montani G, Tonelli S, Elsaesser R, Paysan J, Tirindelli R. Neuropeptide Y in the olfactory microvillar cells. *Eur J Neurosci* 24: 20–4, 2006.

Montonen J, Järvinen R, Knekt P, Heliövaara M, Reunanen A. Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *J Nutr* 137: 1447–54, 2007.

Moran DT, Rowley JC, Jafek BW. Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res* 253: 39–46, 1982.

Mori K, von Campenhouse H, Yoshihara Y. Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1801–12, 2000.

Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286: 711–715, 1999.

Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 297: 1–13, 1990.

Moser PB, Berdanier CD. Effect of early sucrose feeding on the metabolic patterns of mature rats. *J Nutr* 104: 687–94, 1974.

Mugnaini E, Wouterlood FG, Dahl AL, Oertel WH. Immunocytochemical identification of gabaergic neurons in the main olfactory bulb of the rat. *Arch Ital Biol* 122: 83–113, 1984.

Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* 71: 115–140, 2009.

N

- Nagata R, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A.** Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis [corrected]. *J Biol Chem* 279: 29031–42, 2004.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F.** Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8: 1–19, 2014.
- Naismith DJ.** Differences in the metabolism of dietary carbohydrates studied in the rat. *Proc Nutr Soc* 30: 259–65, 1971.
- Naka A, Riedl M, Luger A, Hummel T, Mueller CA.** Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267: 547–50, 2010.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ.** A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F625–31, 2006.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T.** Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 873: 181–7, 2000.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S.** A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194–8, 2001.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K.** Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243–260, 1999.
- Negróni J, Meunier N, Monnerie R, Salesse R, Baly C, Caillol M, Congar P.** Neuropeptide y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS One* 7: e45266, 2012.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T.** Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20: 7311–7318, 2000.
- Newman MP, Féron F, Mackay-Sim a.** Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 99: 343–50, 2000.
- Newman R, Winans SS.** An experimental study of the ventral striatum of the golden hamster. II. Neuronal connections of the olfactory tubercle. *J Comp Neurol* 191: 193–212, 1980.
- Nguyen AD, Herzog H, Sainsbury A.** Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 56–60, 2011.
- Nickell WT, Behbehani MM, Shipley MT.** Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Res Bull* 35: 119–123, 1994.
- Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM.** Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: similar shifts seen across age groups. *Obes Res* 10: 370–8, 2002.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek M a, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787–790, 2000.
- Noé J, Tareilus E, Boekhoff I, Breer H.** Sodium/calcium exchanger in rat olfactory neurons. *Neurochem Int* 30: 523–31, 1997.
- Nunez-Parra A, Cortes-Campos C, Bacigalupo J, Garcia MDLA, Nualart F, Reyes JG.** Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H⁺ (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia. *Chem Senses* 36: 771–80, 2011.

O

- Obrebowski a, Obrebowska-Karsznia Z, Gawliński M.** Smell and taste in children with simple obesity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 55: 191–6, 2000.

Obrosova IG. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics* 6: 638–47, 2009.

Okazaki M, Zhang H, Yoshida Y, Ichino K, Nakayama S, Oguchi K. Correlation between plasma fibrinogen and serum lipids in rats with hyperlipidemia induced by cholesterol free-high fructose or high cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 40: 479–89, 1994.

Olefsky JM, Crapo P. Fructose, xylitol, and sorbitol. *Diabetes Care* 3: 390–3, 1980.

Oster MH, Castonguay TW, Keen CL, Stern JS. Circadian rhythm of corticosterone in diabetic rats. *Life Sci* 43: 1643–5, 1988.

Owen SJ, Batzloff M, Chehrehasa F, Meedeniya A, Casart Y, Logue C-A, Hirst RG, Peak IR, Mackay-Sim A, Beacham IR. Nasal-associated lymphoid tissue and olfactory epithelium as portals of entry for *Burkholderia pseudomallei* in murine melioidosis. *J Infect Dis* 199: 1761–70, 2009.

P

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

Pagliassotti MJ, Cherrington a D. Regulation of net hepatic glucose uptake in vivo. *Annu Rev Physiol* 54: 847–60, 1992.

Palouzier-Paulignan B, Lacroix M-C, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard a K, Tucker K, Fadool DA. Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem. Senses* (July 25, 2012). doi: 10.1093/chemse/bjs059.

Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011: 351982, 2011.

Pangborn RM, Witherly SA, Jones F. Parotid and whole-mouth secretion in response to viewing, handling, and sniffing food. *Perception* 8: 339–46, 1979.

Patel J, Iyer A, Brown L. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys* 46: 66–72, 2009.

Patterson DS, Turner P, Smart J V. Smell threshold in diabetes mellitus. *Nature* 209: 625, 1966.

Pavlov IP. *The work of the digestive glands*. London: Griffin, 1902.

Payne J, Maher F, Simpson I, Mattice L, Davies P. Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia* 21: 327–31, 1997.

Pelosi P. Odorant-binding proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 199–228, 1994.

Peret J, Macaire I, Chanez M. Schedule of protein ingestion, nitrogen and energy utilization and circadian rhythm of hepatic glycogen, plasma corticosterone and insulin in rats. *J Nutr* 103: 866–74, 1973.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 165–9, 2000.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol a N, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996–10015, 1998.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36, 2002.

Pinching a J, Powell TP. The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 379–409, 1971a.

Pinching a J, Powell TP. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 305–345, 1971b.

Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81: 442–8, 1988.

Price JL, Powell TP. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7: 91–123, 1970a.

Price JL, Powell TP. The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7: 631–651, 1970b.

Price JL, Slotnick BM, Revial MF. Olfactory projections to the hypothalamus. *J Comp Neurol* 306: 447–461, 1991.

Prud’homme MJ, Lacroix MC, Badonnel K, Gougis S, Baly C, Salesse R, Caillol M. Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience* 162: 1287–98, 2009.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* 463: 3–33, 2003.

Pun RYK, Kleene SJ. Contribution of cyclic-nucleotide-gated channels to the resting conductance of olfactory receptor neurons. *Biophys J* 84: 3425–35, 2003.

Purkayastha S, Cai D. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Mol. Metab.* 2Elsevier: 356–363, 2013.

Q

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

R

Rapps N, Giel KE, Söhngen E, Salini A, Enck P, Bischoff SC, Zipfel S. Olfactory deficits in patients with anorexia nervosa. *Eur Eat Disord Rev* 18: 385–9, 2010.

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

Reaven GM, Risser TR, Chen YD, Reaven EP. Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. *J Lipid Res* 20: 371–8, 1979.

Reed JC, Huang Z. Apoptosis pathways and drug targets [Online]. *Nat. Rev.* 2004. <http://www.nature.com/reviews/poster/apoptosis>.

Rees D a, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22: 359–70, 2005.

Reiser S, Smith JC, Mertz W, Holbrook JT, Scholfield DJ, Powell a S, Canfield WK, Canary JJ. Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch. *Am J Clin Nutr* 42: 242–51, 1985.

Reiser S. Effect of dietary sugars on metabolic risk factors associated with heart disease. *Nutr Health* 3: 203–16, 1985.

Reisert J, Lai J, Yau K-W, Bradley J. Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* 45: 553–61, 2005.

Ren H, Lu TY, McGraw TE, Accili D. Anorexia and impaired glucose metabolism in mice with hypothalamic ablation of Glut4 neurons. *Diabetes* 64: 405–417, 2015.

Ren H, Yan S, Zhang B, Lu TY, Arancio O, Accili D. Glut4 expression defines an insulin-sensitive hypothalamic neuronal population. *Mol Metab* 3: 452–459, 2014.

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

Richardson BE, Vander Woude E a, Sudan R, Thompson JS, Leopold D a. Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obes Surg* 14: 967–9, 2004.

Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr* 4: 236–45, 2013.

Rippe JM. The metabolic and endocrine response and health implications of consuming sugar-sweetened beverages: findings from recent randomized controlled trials. *Adv Nutr* 4: 677–86, 2013.

Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840: 2709–2729, 2014.

Roessner V, Bleich S, Banaschewski T, Rothenberger A. Olfactory deficits in anorexia nervosa. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255: 6–9, 2005.

Rolls BJ, Van Duijvenvoorde PM, Rolls ET. Pleasantness changes and food intake in a varied four-course meal. *Appetite* 5: 337–348, 1984.

Ronnett G V, Cho H, Hester LD, Wood SF, Snyder SH. Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures. *J Neurosci* 13: 1751–8, 1993.

Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1029–45, 2003.

Rosenweig NS, Herman RH. Time response of jejunal sucrase and maltase activity to a high sucrose diet in normal man. *Gastroenterology* 56: 500–5, 1969.

Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13: 610–30, 1990.

Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270: 559–568, 1988.

Russell JW, Sullivan K a, Windebank a J, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6: 347–363, 1999.

S

Sajic M. Mitochondrial Dynamics in Peripheral Neuropathies. *Antioxid Redox Signal* 00: 1–20, 2014.

Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527–9, 1995.

Saltiel a R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517–29, 2001.

Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: Futuristic strategies based on these targets. *Int. J. Endocrinol.* 2014Hindawi Publishing Corporation2014.

Sanke H, Mita T, Yoshii H, Yokota A, Yamashiro K, Ingaki N, Onuma T, Someya Y, Komiya K, Tamura Y, Shimizu T, Ohmura C, Kanazawa A, Fujitani Y, Watada H. Relationship between olfactory dysfunction and cognitive impairment in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pr* 106: 465–473, 2014.

Sato T, Hirono J, Tonoike M, Takebayashi M. Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. *J Neurophysiol* 72: 2980–2989, 1994.

Sato Y, Ito T, Uda N, Kanisawa M, Noguchi Y, Cushman SW, Satoh S. Immunohistochemical localization of facilitated-diffusion glucose transporters in rat pancreatic islets. *Tissue Cell* 28: 637–43, 1996.

Savigner A, Duchamp-Viret P, Grosmaître X, Chaput M, Garcia S, Ma M, Palouzier-Paulignan B. Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J Neurophysiol* 101: 2898–906, 2009.

Scheurink AJ, Steffens AB, Bouritius H, Dreteler GH, Bruntink R, Remie R, Zaagsma J. Sympathoadrenal influence on glucose, FFA, and insulin levels in exercising rats. *Am J Physiol* 256: R161–8, 1989.

Schild D, Restrepo D. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78: 429–66, 1998.

Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low P a. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 52: 165–171, 2003.

Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda C a. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci* 14: 21873–86, 2013.

Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA* 292: 927–34, 2004.

Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269: 33–49, 2002.

Sciaccia L. Signaling Differences from the A and B Isoforms of the Insulin Receptor (IR) in 32D Cells in the Presence or Absence of IR Substrate-1. *Endocrinology* 144: 2650–2658, 2003.

Sclafani A, Rendel A. Food deprivation-induced activity in dietary obese, dietary lean, and normal-weight rats. *Behav Biol* 24: 220–8, 1978.

Scott JW, Brierley T. A functional map in rat olfactory epithelium. *Chem Senses* 24: 679–690, 1999.

Séguy M, Perret M. Changes in olfactory inputs modify the energy balance response to short days in male gray mouse lemurs. *Physiol Behav* 84: 23–31, 2005.

Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121: 2118–25, 2011.

Semchyshyn HM. Fructation in vivo: detrimental and protective effects of fructose. *Biomed Res Int* 2013: 343914, 2013.

Serizawa S, Ishii T, Nakatani H, Tsuboi A, Nagawa F, Asano M, Sudo K, Sakagami J, Sakano H, Ijiri T, Matsuda Y, Suzuki M, Yamamori T, Iwakura Y, Sakano H. Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat Neurosci* 3: 687–693, 2000.

Sestoft L, Fleron P. Determination of the kinetic constants of fructose transport and phosphorylation in the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 345: 27–38, 1974.

Shepherd GM. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52: 864–917, 1972.

Shimomura Y, Takahashi M, Shimizu H, Sato N, Uehara Y, Negishi M, Inukai T, Kobayashi I, Kobayashi S. Abnormal feeding behavior and insulin replacement in STZ-induced diabetic rats. *Physiol Behav* 47: 731–4, 1990.

Shipley MT, Adamek GD. The connections of the mouse olfactory bulb: A study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12: 669–688, 1984.

Singh VP, Aggarwal R, Singh S, Banik A, Ahmad T, Patnaik BR, Nappanveetil G, Singh KP, Aggarwal ML, Ghosh B, Agrawal A. Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Oxo-Nitrative Stress and Asthma-Like Changes in Lungs. *PLoS One* 10: e0129850, 2015.

Sklar PB, Anholt RRH, Snyder SH. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J Biol Chem* 261: 15538–15543, 1986.

Skoog SM, Bharucha AE. Dietary fructose and gastrointestinal symptoms: a review. *Am J Gastroenterol* 99: 2046–50, 2004.

Sleder J, Chen YD, Cully MD, Reaven GM. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 29: 303–5, 1980.

Slotnick B. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn. Sci.* 5: 216–222, 2001.

Smithson KG, Weiss ML, Hatton GI. Supraoptic nucleus afferents from the main olfactory bulb--I. Anatomical evidence from anterograde and retrograde tracers in rat. *Neuroscience* 31: 277–287, 1989.

Sodhi K, Puri N, Favero G, Stevens S, Meadows C, Abraham NG, Rezzani R, Ansinelli H, Lebovics E, Shapiro JL. Fructose Mediated Non-Alcoholic Fatty Liver Is Attenuated by HO-1-SIRT1 Module in Murine Hepatocytes and Mice Fed a High Fructose Diet. *PLoS One* 10: e0128648, 2015.

Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 627–647, 2005.

Sørensen LB, Møller P, Flint A, Martens M, Raben A. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1152–1166, 2003.

Sorge RE, Martin LJ, Isbester K a, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, Wieskopf JS, Acland EL, Dokova A, Kadoura B, Leger P, Mapplebeck JCS, McPhail M, Delaney A, Wigerblad G, Schumann AP, Quinn T, Frasnelli J, Svensson CI, Sternberg WF, Mogil JS. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11: 629–32, 2014.

Soria-Gómez E, Bellocchio L, Reguero L, Lepousez G, Martin C, Bendahmane M, Ruehle S, Remmers F, Desprez T, Matias I, Wiesner T, Cannich A, Nissant A, Wadleigh A, Pape H-C, Chiarlone AP, Quarta C, Verrier D, Vincent P, Massa F, Lutz B, Guzmán M, Gurden H, Ferreira G, Lledo P-M, Grandes P, Marsicano G. The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat Neurosci* 17: 407–15, 2014.

Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 20: 657–62, 2009.

Stafford LD, Welbeck K. High hunger state increases olfactory sensitivity to neutral but not food odors. *Chem Senses* 36: 189–98, 2011.

Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr* 88: 1733S–1737S, 2008.

Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *J Nutr* 139: 1236S–1241S, 2009.

Steinberg HO, Brechtel G, Johnson a, Fineberg N, Baron a D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94: 1172–9, 1994.

Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, Rabaglia ME, Yandell BS, Metz SA, Attie AD. Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. *Diabetes* 49: 1946–1954, 2000.

Storlien LH, Oakes ND, Pan DA, Kusunoki M, Jenkins AB. Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes* 42: 457–62, 1993.

Strotmann J, Breer H. Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol* 136: 357–69, 2011.

Sturton RG, Pritchard PH, Han LY, Brindley DN. The involvement of phosphatidate phosphohydrolase and phospholipase A activities in the control of hepatic glycerolipid synthesis. Effects of acute feeding with glucose, fructose, sorbitol, glycerol and ethanol. *Biochem J* 174: 667–70, 1978.

Sullivan SL, Dryer L. Information processing in mammalian olfactory system. *J Neurobiol* 30: 20–36, 1996.

Sun RQ, Wang H, Zeng XY, Chan SMH, Li SP, Jo E, Leung SL, Molero JC, Ye JM. IRE1 impairs insulin signaling transduction of fructose-fed mice via JNK independent of excess lipid. *Biochim Biophys Acta* 1852: 156–165, 2015.

Surwit RS, Seldin MF, Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN. Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes* 40: 82–7, 1991.

Suzuki M, Nomura C, Odaka H, Ikeda H. Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. *Jpn J Pharmacol* 74: 297–302, 1997.

T

Tappy L, Lê K a, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 26: 1044–9, 2010.

Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90: 23–46, 2010.

Taveau C, Chollet C, Waeckel L, Desposito D, Bichet DG, Arthus M-F, Magnan C, Philippe E, Paradis V, Fougelle F, Hainault I, Enhorning S, Velho G, Roussel R, Bankir L, Melander O, Bouby N. Vasopressin and hydration play a major role in the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats. *Diabetologia* 58: 1081–90, 2015.

Thiebaud N, Johnson MC, Butler JL, Bell G a, Ferguson KL, Fadool AR, Fadool JC, Gale AM, Gale DS, Fadool D a. Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J Neurosci* 34: 6970–84, 2014.

Thurston JH, Jones EM, Hauhart RE. Decrease and inhibition of liver glycogen phosphorylase after fructose. An experimental model for the study of hereditary fructose intolerance. *Diabetes* 23: 597–604, 1974.

Tirindelli R, Dibattista M, Pifferi S, Menini A. From pheromones to behavior. *Physiol Rev* 89: 921–956, 2009.

Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, Stolarczyk E, Blazquez AG, Klein C, Prigent M, Serradas P, Cuif M-H, Magnan C, Leturque A, Brot-Laroche E. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57: 555–62, 2008.

Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9: 36–45, 2008.

Tong J, Mannea E, Aimé P, Pfluger PT, Yi C, Castaneda TR, Davis HW, Ren X, Pixley S, Benoit S, Julliard K, Woods SC, Horvath TL, Sleeman MM, D'Alessio D, Obici S, Frank R, Tschöp MH. Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *J Neurosci* 31: 5841–6, 2011.

Topping DL, Mayes PA. The concentration of fructose, glucose and lactate in the splanchnic blood vessels of rats absorbing fructose. *Nutr Metab* 13: 331–8, 1971.

Topping DL, Mayes PA. Comparative effects of fructose and glucose on the lipid and carbohydrate metabolism of perfused rat liver. *Br J Nutr* 36: 113–26, 1976.

Toye a a, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill a, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes a, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 48: 675–86, 2005.

Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 332: 145–59, 2009.

Tsujino N, Sakurai T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 61: 162–76, 2009.

Tucker K, Cavallin MA, Jean-Baptiste P, Biju KC, Overton JM, Pedarzani P, Fadool DA. The Olfactory Bulb: A Metabolic Sensor of Brain Insulin and Glucose Concentrations via a Voltage-Gated Potassium Channel. *Results Probl Cell Differ* 52: 147–57, 2010.

Tuovinen CG, Bender AE. Some metabolic effects of prolonged feeding of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat. *Nutr Metab* 19: 161–72, 1975.

U

Ubink R, Hökfelt T. Expression of neuropeptide Y in olfactory ensheathing cells during prenatal development. *J Comp Neurol* 423: 13–25, 2000.

Ukhanov K, Corey E a, Brunert D, Klasen K, Ache BW. Inhibitory odorant signaling in Mammalian olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 103: 1114–1122, 2010.

Underwood AH, Newsholme EA. Properties of phosphofructokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis. *Biochem J* 95: 868–75, 1965.

Uram JA, Friedman L, Kline OL. Influence of diet on glucose tolerance. *Am J Physiol* 192: 521–4, 1958.

V

Vaag A, Lund SS. Non-obese patients with type 2 diabetes and prediabetic subjects: distinct phenotypes requiring special diabetes treatment and (or) prevention? *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 912–20, 2007.

Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen a J. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev* 18: 716–38, 1997.

Van Cauter E. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Horm Res* 34: 45–53, 1990.

Van den Berghe G. Metabolic effects of fructose in the liver. *Curr Top Cell Regul* 13: 97–135, 1978.

Van den Berghe G. Fructose: metabolism and short- term effects on carbohydrate and purine metabolic pathways. In: *Progress in Biochemical Pharmacology*. Basel, Switzerland: 1986, p. 1–32.

Vassalli A, Rothman A, Feinstein P, Zapotocky M, Mombaerts P. Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb. *Neuron* 35: 681–96, 2002.

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

Velasco A, Huerta I, Marin B. Plasma corticosterone, motor activity and metabolic circadian patterns in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chronobiol Int* 5: 127–35, 1988.

Ventura EE, Davis JN, Goran MI. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. *Obesity (Silver Spring)* 19: 868–74, 2011.

Vera ER, Battell ML, Bhanot S, McNeill JH. Effects of age and anesthetic on plasma glucose and insulin levels and insulin sensitivity in spontaneously hypertensive and Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 962–70, 2002.

Verkhatsky A, Fernyhough P. Mitochondrial malfunction and Ca²⁺ dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes. *Cell Calcium* 44: 112–122, 2008.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Antihypertensive effects of metformin in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1334–7, 1994.

Verschoor L, Chen YD, Reaven EP, Reaven GM. Glucose and fructose feeding lead to alterations in structure and function of very low density lipoproteins. *Horm Metab Res* 17: 285–8, 1985.

Vrána A, Fábry P, Kazdová L, Zvolánková K. Effect of the type and proportion of dietary carbohydrate on serum glucose levels and liver and muscle glycogen synthesis in the rat. *Nutr Metab* 22: 313–20, 1978a.

Vrána A, Fábry P, Kazdová L. Liver glycogen synthesis and glucose tolerance in rats adapted to diets with a high proportion of fructose or glucose. *Nutr Metab* 22: 262–8, 1978b.

Vrána A, Fábry P, Slabochová Z, Kazdová L. Effect of dietary fructose on free fatty acid release from adipose tissue and serum free fatty acid concentration in the rat. *Nutr Metab* 17: 74–83, 1974.

Vrána A, Fábry P. Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. *World Rev Nutr Diet* 42: 56–101, 1983.
Vuilleumier S. Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. *Am J Clin Nutr* 58: 733S–736S, 1993.

W

Wang C-H, Wang C-C, Wei Y-H. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1201: 157–65, 2010.
Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93: 47–60, 1998.
Wang H, Sun R-Q, Zeng X-Y, Zhou X, Li S, Jo E, Molero JC, Ye J-M. Restoration of autophagy alleviates hepatic ER stress and impaired insulin signalling transduction in high fructose-fed male mice. *Endocrinology* 156: 169–81, 2015.
Waterman RA, Romsos DR, Tsai AC, Miller ER, Leveille GA. Effects of dietary carbohydrate source on growth, plasma metabolites and lipogenesis in rats, pigs, and chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 150: 220–5, 1975.
Watt WC, Sakano H, Lee ZY, Reusch JE, Trinh K, Storm DR. Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB. *Neuron* 41: 955–967, 2004.
Wei J, Wayman G, Storm DR. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J Biol Chem* 271: 24231–5, 1996.
Weinstock RS, Wright HN, Smith DU. Olfactory dysfunction in diabetes mellitus. *Physiol Behav* 53: 17–21, 1993.
White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *Am J Clin Nutr* 88: 1716S–1721S, 2008.
White JS. Challenging the fructose hypothesis: new perspectives on fructose consumption and metabolism. *Adv Nutr* 4: 246–56, 2013.
Whitton PD, Hems D a. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats. *Biochem J* 150: 153–65, 1975.
Williams KW, Scott MM, Elmquist JK. Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *Eur J Pharmacol* 660: 2–12, 2011.
Winder WW, Booth FW, Fitts RH, Holloszy JO. Effect of exercise on response of liver lipogenic enzymes to a high fructose diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 1150–4, 1975.
Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GC, Lowe G, Gaggara a, Xia Z, Gold GH, Storm DR. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27: 487–97, 2000.
Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325–8, 2000.

Y

Yan C, Zhao a Z, Bentley JK, Loughney K, Ferguson K, Beavo J a. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9677–81, 1995.
Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci* : 1–14, 2009.
Yeomans MR. Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiol Behav* 89: 10–4, 2006.
Yki-Järvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes* 36: 892–6, 1987.
Yokoi M, Mori K, Nakanishi S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3371–3375, 1995.

Yoshida M, McKeown NM, Rogers G, Meigs JB, Saltzman E, D'Agostino R, Jacques PF. Surrogate markers of insulin resistance are associated with consumption of sugar-sweetened drinks and fruit juice in middle and older-aged adults. *J Nutr* 137: 2121–7, 2007.

Yu Y, Boyer NP, Zhang C. Three structurally similar odorants trigger distinct signaling pathways in a mouse olfactory neuron. *Neuroscience* 275: 194–210, 2014.

Z

Zemdeg J, Quesseveur G, Jarriault D, Pénicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High fat diet-induced metabolic disorders impairs serotonergic function and anxiety-like behaviours in mice. *Br. J. Pharmacol.* (October 16, 2015). doi: 10.1111/bph.13343.

Zhang X, Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5: 124–133, 2002.

Zilstorff-Pedersen K. Olfactory threshold determinations in relation to food intake. *Acta Otolaryngol* 45: 86–90, 1955.

Zou D-J, Chesler A, Firestein S. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat Rev Neurosci* 10: 611–618, 2009.

Zufall F, Leinders-Zufall T. Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* 17: 483–9, 2007.

Zufall F, Shepherd GM, Firestein S. Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide gated ion channel by intracellular calcium. *Proc Biol Sci* 246: 225–30, 1991.

Zuurbier CJ, Koeman A, Houten SM, Hollmann MW, Florijn WJ. Optimizing anesthetic regimen for surgery in mice through minimization of hemodynamic, metabolic, and inflammatory perturbations. *Exp Biol Med (Maywood)* 239: 737–746, 2014.